ISSN 2186-7976

March 5, 2015
平成２７年３月５日発行

Annual Meeting of the Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry, 2015

大会講演要旨集

■２０１５年度(平成２７年度)大会[岡山]■







公益社団法人日本農芸化学会

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

© Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry

目次

授賞式、受賞者講演、受賞者----------3
一般講演番号の見方----------7
一般講演プログラム----------8
一般講演要旨----------86
大会シンポジウムプログラム----------2, 141
大会シンポジウム要旨----------2, 149
ランチョンシンポジウムプログラム----------2, 290
ランチョンシンポジウム要旨----------2, 291
ランチョンセミナープログラム----------2, 294
ランチョンセミナー広告要旨----------2, 297

日本農芸化学会
(2015 年度)学会賞等授賞式，受賞者講演，受賞者一覧

日　時：2015 年 3 月 26 日(木)9 時 00 分～15 時 25 分(受付 8 時 00 分～)
場　所：ホテルグランヴィア岡山 4 階フェニックス(岡山県岡山市北区駅元町 1 番 5)
進行予定：

(9:00) 2015 年度学会賞等授賞式
　1　授賞選考委員長報告
　2　日本農芸化学会賞等授与
(9:20) 第 12 回農芸化学研究企画賞表彰式
　1　産学官学術交流委員長報告
　2　農芸化学研究企画賞表彰
(9:25) BBB 論文賞，Most-Cited Paper Award 及び Most-Cited Review Award 表彰式
　1　英文誌編集委員長報告
　2　総評
(9:35) 会長祝辞
(9:40) ＊＊＊＊＊＊　休憩 10 分間　＊＊＊＊＊＊
(9:50) 受賞者講演開始
(9:50) 日本農芸化学会賞受賞者講演(2 件，各 25 分)
(10:40) 日本農芸化学会功績賞受賞者講演(1 件，各 25 分)
(11:05) ＊＊＊＊＊＊　休憩 10 分間　＊＊＊＊＊＊
(11:15) 農芸化学技術賞受賞者講演(4 件，各 15 分)
(12:15) ＊＊＊＊＊＊　休憩 60 分間　＊＊＊＊＊＊
(13:15) 農芸化学奨励賞受賞者講演　前半(5 件，各 11 分＋1 分)
(14:15) ＊＊＊＊＊＊　休憩 10 分間　＊＊＊＊＊＊
(14:25) 農芸化学奨励賞受賞者講演　後半(5 件，各 11 分＋1 分)
(15:25) 終了予定
(18:30～20:30)懇親会：同会場

受賞者：

【日本農芸化学会賞】(2 件，50 音順)

植田　充美（京都大学大学院農学研究科）
「細胞表層活用の基盤開拓」
小林　達彦（筑波大学大学院生命環境科学研究科）
「微生物代謝および酵素の分子機構と機能開発」

【日本農芸化学会功績賞】(1 件)

水光　正仁（宮崎大学農学部）
「翻訳後修飾および薬物代謝における硫酸化の意義・機能に関する研究」

【農芸化学技術賞】(4 件，企業名 50 音順)

味の素株式会社(賛助会員枠)
「血漿中の遊離アミノ酸プロファイルを活用した新規疾病リスク評価法の開発」
サッポロビール株式会社(賛助会員枠)
「ビール泡品質向上への一貫した取組み」
南木　　昂・黒林　淑子・渡辺　広幸・前田　知子（長谷川香料株式会社）
「分析・合成・調香技術の総合による新規食品香料開発」

ポッカサッポロフード＆ビバレッジ株式会社（賛助会員枠）
「交流高電界殺菌法を利用した果汁製品の製造」

【農芸化学奨励賞】（10 件，50 音順）

蘆田　弘樹（神戸大学大学院人間発達環境学研究科）
「光合成 CO_2 固定酵素 RuBisCO の機能進化研究」

伊藤　貴文（福井県立大学生物資源学部）
「立体構造に基づく糖質関連酵素の反応機構の解明とポストゲノミクスへの新展開」

片山　秀和（東海大学工学部）
「甲殻類ペプチドホルモンに関する生物有機化学的研究」

佐分利　亘（北海道大学大学院農学研究院）
「糖質代謝酵素の分子機構の解明と有用糖質の効率合成への応用展開」

士反　伸和（神戸薬科大学）
「植物二次代謝生産における自己耐性と輸送の分子機構に関する研究」

高野　英晃（日本大学生物資源科学部）
「一般細菌が示す多様な環境応答の分子メカニズムに関する研究」

宮川　拓也（東京大学大学院農学生命科学研究科）
「植物のストレス応答・生長制御に関する構造生物学的研究」

三好　規之（静岡県立大学食品栄養科学部）
「食品成分と内因性分子による生活習慣病の促進メカニズムと予防に関する生物化学分析」

薮田　行哲（鳥取大学農学部）
「植物における光酸化的ストレス応答のシグナル伝達に関する研究」

吉永　直子（京都大学大学院農学研究科）
「昆虫の脂肪酸―アミノ酸縮合物（FACs）の生理・生態学的機能解析」

【第 12 回農芸化学研究企画賞】（2 件）

重点研究領域①　先導的生物活性物質研究と新技術開発
（1）革新的医薬医療を志向した生物活性物質の探索・合成・生産等の研究と新技術開発
（2）革新的農林水産物生産を志向した生物活性物質研究と新技術開発

浅見　行弘（北里大学大学院感染制御科学府）
「ゼブラフィッシュの受精卵感染モデル系を利用した抗感染症薬シーズの探索」

南　　博道（石川県立大学生物資源工学研究所）
「微生物発酵法による植物アルカロイド生産と生薬生理活性物質の創製」

【平成 27 年度日本農学賞受賞者】（本会推薦）

本会より推薦した下記の者が日本農学賞を受賞いたしました.

2015 年 4 月 5 日東京大学山上会館で開催される日本農学大会において，日本農学賞授与式並びに受賞者講演が予定されています.

受 賞 者：矢ヶ崎　一三（宇都宮大学特任教授，東京農工大学名誉教授）

受賞題目：農林水産物とその成分の保健作用に関する研究

【2014年(Vol.78)B.B.B. 論文賞(掲載順)】(12件)

pp.130～138 Yori Ozaki, Tomoya Takeda, Narumi Akanishi, Fumihiko Hakuno, Yuka Toyoshima, Shin-Ichiro Takahashi & Asako Takenaka
Insulin injection restored increased insulin receptor substrate (IRS)-2 protein during short-term protein restriction but did not affect reduced insulin-like growth factor (IGF)-I mRNA or increased triglyceride accumulation in the liver of rats

pp.420～429 Eriko Yoshizawa, Mai Kaizuka, Ayumi Yamagami, Mieko Higuchi-Takeuchi, Minami Matsui, Yusuke Kakei, Yukihisa Shimada, Masaaki Sakuta, Hiroyuki Osada, Tadao Asami & Takeshi Nakano
BPG3 is a novel chloroplast protein that involves the greening of leaves and related to brassinosteroid signaling

pp.695～700 Naoya Kataoka, Alisa S. Vangnai, Hiromitsu Ueda, Takahisa Tajima, Yutaka Nakashimada & Junichi Kato
Enhancement of (*R*)-1,3-butanediol production by engineered *Escherichia coli* using a bioreactor system with strict regulation of overall oxygen transfer coefficient and pH

pp.898～907 Hiraku Takada, Masato Morita, Yuh Shiwa, Ryoma Sugimoto, Shota Suzuki, Fujio Kawamura & Hirofumi Yoshikawa
Cell motility and biofilm formation in *Bacillus subtilis* are affected by the ribosomal proteins, S11 and S21

pp.989～997 Akihito Ochiai, Hiroshi Sugai, Kazuki Harada, Seiya Tanaka, Yohei Ishiyama, Kosuke Ito, Takaaki Tanaka, Toshio Uchiumi, Masayuki Taniguchi & Toshiaki Mitsui
Crystal structure of α-amylase from *Oryza sativa*: molecular insights into enzyme activity and thermostability

pp.1212～1220 Shuichi Shibuya, Yusuke Ozawa, Toshihiko Toda, Kenji Watanabe, Chisa Tometsuka, Takayuki Ogura, Yoh-ichi Koyama & Takahiko Shimizu
Collagen peptide and vitamin C additively attenuate age-related skin atrophy in *Sod1*-deficient mice

pp.1537～1541 Misumi Kataoka & Kazuhiko Ishikawa
Complete saccharification of β-glucan using hyperthermophilic endocellulase and β-glucosidase from *Pyrococcus furiosus*

pp.1584～1591 Ikuo Ikeda, Kanae Metoki, Takashi Yamahira, Masaki Kato, Nao Inoue, Koji Nagao, Teruyoshi Yanagita, Hitoshi Shirakawa & Michio Komai
Impact of fasting time on hepatic lipid metabolism in nutritional animal studies

pp.1662～1668 Mana Iizuka, Yuhya Wakasa, Hiroto Tsuboi, Hiromitsu Asashima, Tomoya Hirota, Yuya Kondo, Isao Matsumoto, Takayuki Sumida & Fumio Takaiwa
Prophylactic effect of the oral administration of transgenic rice seeds containing altered peptide ligands of type II collagen on rheumatoid arthritis

pp.1839～1849 Naiyanate Jaroensanti, Jung-Min Yoon, Yuji Nakai, Ikuya Shirai, Masato Otani, Seung-Hyun Park, Ken-ichiro Hayashi, Masatoshi Nakajima & Tadao Asami
Does the brassinosteroid signal pathway in photomorphogenesis overlap with the gravitropic response caused by auxin?

pp.1871～1878 Mina Fujitani, Shigenobu Matsumura, Daisaku Masuda, Shizuya Yamashita, Tohru Fushiki & Kazuo Inoue
CD36, but not GPR120, is required for efficient fatty acid utilization during endurance exercise

pp.2030～2035 Tadayoshi Kanao, Hisayuki Nakayama, Mizuki Kato & Kazuo Kamimura
The sole cysteine residue (Cys301) of tetrathionate hydrolase from *Acidithiobacillus ferrooxidans* does not play a role in enzyme activity

【Most-Cited Paper Award】 被引用回数　13 回

Vol.76, No.3, pp.501～505

Reiko Maeda, Tomoaki Ida, Hideshi Ihara & Tatsuji Sakamoto

Immunostimulatory Activity of Polysaccharides Isolated from *Caulerpa lentillifera* on Macrophage Cells

【Most-Cited Review Award】 被引用回数　16 回

Vol.77, No.3, pp.455～466

Tadasu Urashima, Epi Taufik, Kenji Fukuda & Sadaki Asakuma

Recent Advances in Studies on Milk Oligosaccharides of Cows and Other Domestic Farm Animals

一般講演番号の見方

○ 講演番号の

最初の１桁の数字は講演発表日

２ ⟶ ３月２７日（金）
３ ⟶ ３月２８日（土）
４ ⟶ ３月２９日（日）

次のアルファベットは建物記号、その次の数字二桁は、会場番号

Ａ　一般教育棟Ａ棟
Ｂ　一般教育棟Ｂ棟
Ｃ　一般教育棟Ｃ棟
Ｄ　一般教育棟Ｄ棟
Ｅ　一般教育棟Ｅ棟
Ｆ　教育学部講義棟
Ｇ　教育学部本館

（例：Ａ２１　→　一般教育棟Ａ棟２１会場）

次の桁の小文字アルファベットは

ａ　は　午前の部
ｐ　は　午後の部

次の数字は、その会場での講演の順番

たとえば、**２Ａ２１ｐ０５**は、
３月２７日（金）、一般教育棟Ａ棟２１会場、午後の部、５番目　の講演です。

○ 講演開始の時間は、次の通りです。

ａ［ａｍ］（午前）

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

ｐ［ｐｍ］（午後）

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

一般講演発表プログラム

1. 講演時間は1題につき，11分（発表8分，討論2分30秒，交代時間30秒）．
2. °は講演者（登壇者）を示す．
3. 座長は，大会プログラム集（冊子体）の25～27ページの座長一覧をご覧ください．
4. 講演番号1文字目（数字）は講演日（2: 3月27日，3: 3月28日，4: 3月29日），2～4文字目は講演会場（A21～G41），5文字目（英字小文字1字）のaは午前，pは午後，6～7文字目（数字2桁）は講演順番（01～20）．（例）「2A21p05」は，3月27日，A21会場，午後の部，5番目の講演となります．

||||||||||||||||||||| 第2日（3月27日） |||||||||||||||||||||

講演番号
開始時間　　演　　題　　発表者氏名（所属）

A21会場　午前の部（9:00～12:05）

微生物―物質生産－醸造，発酵（一次代謝産物）―

a01～a05 発表者の接続時間 8:50～9:00

2A21a01　低価値な再生可能資源から油脂を高生産する *Lipomyces* 属酵母のスクリーニング
9:00 °柳場まな，松本美穂，長沼孝文（山梨大院・医工総合・生命）

2A21a02　低価値な再生可能資源を *Lipomyces* 酵母の油脂生産に利用するための処理
9:11 °松本美穂，柳場まな，長沼孝文（山梨大院・医工総合・生命）

2A21a03　未精製グリセロールを用いた油脂生産酵母 *Lipomyces starkeyi* による高密度培養
9:22 °浜本友佳[1]，黒川博史[1]，長沼孝文[2]，二階堂雅則[1]，大寺基靖[1]，戸堀悦雄[1]（[1]ライオン株式会社，[2]山梨大院生命）

2A21a04　油糧微生物 *Mortierella alpina* への *Pythium* sp. 由来 *ω3* 不飽和化酵素遺伝子の導入によるエイコサペンタエン酸の常温生産
9:33 °菊川寛史[1]，中辻諒平[1]，浅井大貴[1]，櫻谷英治[1,2]，安藤晃規[1,3]，小川　順[1,3]（[1]京大院農・応用生命，[2]徳島大院・ソシオ，[3]京大・生理化学）

2A21a05　油糧微生物 *Mortierella alpina* 1S-4 株における Δ12 不飽和化酵素遺伝子破壊によるミード酸高生産株の構築
9:44 °盤若明日香[1]，菊川寛史[1]，安藤晃規[1,2]，櫻谷英治[1,3]，落合美佐[4]，清水　昌[1,5]，小川　順[1,2]（[1]京大院農・応用生命，[2]京大・生理化学ユニット，[3]徳島大院・ソシオ，[4]サントリーグローバルイノベーションセンター株式会社，[5]京都学園大･バイオ環境）

a06～a10 発表者の接続時間 9:55～10:05

2A21a06　油糧微生物 *Mortierella alpina* 1S-4 株における Δ6 不飽和化酵素遺伝子をターゲットとした分子育種株の構築
10:05 °阪本鷹行[1]，菊川寛史[1]，安藤晃規[1,2]，櫻谷英治[1,3]，落合美佐[4]，島　純[5]，清水　昌[1,6]，小川　順[1,2]（[1]京大院農・応用生命，[2]京大・生理化学ユニット，[3]徳島大院・ソシオ，[4]サントリーグローバルイノベーションセンター株式会社，[5]龍谷大，[6]京都学園大・バイオ環境）

2A21a07　脂質蓄積性の出芽酵母形質転換株によるパルミトオレイン酸生産
10:16 °神坂　泰，木村和義，植村　浩，山岡正和（産総研生物プロセス）

2A21a08　*Cryptococcus diffluens* 由来のガラクチュロン酸還元酵素発現組換え酵母による L-ガラクトン酸生産系の改良
10:27 °松原健生[1]，若林彩香[2]，濱田翔平[1]，岸田正夫[1]（[1]阪府大院生環科・応生科，[2]阪府大生環科・応生科）

2A21a09　混合糖を基質とした高効率乳酸発酵のための *Enterococcus mundtii* QU 25 株の分子育種
10:38 °藤原治子[1]，簗瀬弘明[2]，志波　優[3]，児島友子[2]，渡辺　智[2]，田代幸寛[1]，善藤威史[1]，千葉櫻拓[2]，門多真理子[2,4]，吉川博文[2,3]，園元謙二[1,5]（[1]九大院・農，[2]東農大・バイオ，[3]東農大・ゲノムセンター，[4]武蔵野大・環境，[5]九大・バイオアーク）

2A21a10　硫黄成分が 5- アミノレブリン酸の生産に及ぼす影響
10:49 °齊藤　優，山本泰嗣，藤本尚則（コスモ石油　中央研）

a12～a15 発表者の接続時間 11:11～11:21

2A21a11　講演取消

2A21a12　代謝改変大腸菌を用いたイタコン酸高発酵生産法の開発
11:21 °永田圭介，麻生祐司，小原仁実（京都工繊大院）

2A21a13　大腸菌を用いたアクリル酸発酵生産法の開発
11:32 °橋本彩加，麻生祐司，小原仁実（京都工芸繊維大学）

2A21a14　代謝工学的な手法を用いた，大腸菌によるプトレッシンの発酵生産
11:43 °入江加奈子，鈴木秀之（京都工繊大院応生）

2A21a15　組換え大腸菌を用いた 1-プロパノール発酵生産における通気条件の検討
11:54 °松原　充，浦野信行，山田尚平，藤居実咲，片岡道彦（阪府大院・生環科・応生科）

A21会場　午後の部（14:00～18:10）

微生物―物質生産－醸造，発酵（一次代謝産物）―

p01～p05 発表者の接続時間 13:50～14:00

2A21p01　リファンピシン耐性株による至適発酵温度の高温化
14:00 °川嶋草平，清　啓自，門倉利守，中里厚実，中山俊一（東京農業大学）

2A21p02　複合微生物系による有価物発酵生産（メタ発酵）における発酵諸条件の影響
14:11 °田代幸寛[1]，井ノ口翔太[1]，石橋侑子[1]，宮本浩邦[2]，奥川友紀[1]，酒井謙二[1]（[1]九大院・農，[2]日環科学）

2A21p03　ミュータンス菌型のレドックス代謝をもつ還元力高産生コリネ菌の開発
14:22 °竹野誠記[1]，見村晃紀[1]，三橋　敏[2]，池田正人[1]（[1]信州大農・応生科，[2]協和発酵バイオ）

2A21p04　還元力高産生コリネ菌によるペントース -リン酸経路非依存リジン発酵
14:33 °堀　一将[1]，大谷幸子[1]，三橋　敏[2]，竹野誠記[1]，池田正人[1]（[1]信州大農・応生科，[2]協和発酵バイオ）

2A21p05　*Corynebacterium glutamicum* におけるストレス応答性遺伝子の解析
14:44 °竹内孝志，山内健太郎，加藤朋久，児山雄太郎，佐藤美咲，橋本賢一，中松　亘，川崎　寿，夏目　亮（東電大・院・工）

p06～p10 発表者の接続時間 14:55～15:05

2A21p06　分子動力学シミュレーションに支援された Tween 40 による Corynebacterium glutamicum のグルタミン酸過剰生成誘導機構の解析
15:05 °澤田康之[1]，橋本賢一[2]，中松　亘[2]，曽我部正博[3]，川崎　寿[2]（[1]名大院医，[2]東京電機大工，[3]名大医メカノバイオロジー）

2A21p07　RNA-seq 法による酢酸菌 3 種の酢酸発酵時における代謝戦略の比較解析
15:16 °松原拓哉[1]，石川森夫[1]，兼崎　友[2]，Cristina Andres Barrao[1]，吉川博文[2,3]，小泉幸道[1]，貝沼（岡本）章子[1]（[1]東農大応生科･醸造，[2]東農大・ゲノムセンター，[3]東農大応生科・バイオ）

2A21p08　講演取消

2A21p09　酢酸菌 *Acetobacter pasteurianus* NBRC3283 株の酢酸発酵生理における RpoE の機能解析
15:38 °原田佳子[1]，石川森夫[2]，勝間田憲子[2]，佐藤契太[2]，

岸　幹也[3]，小泉幸道[2]，貝沼(岡本)章子[2]（[1]bits，[2]東農大応生科・醸造，[3]ミツカン・中研）

2A21p10　2-ケト-D-グルコン酸脱水素酵素の異種発現による *Gluconobacter japonicus* での効率的 2,5-ジケト-D-グルコン酸生産

15:49　◦片岡尚也，松谷峰之介，薬師寿治，松下一信（山口大農）

p11〜p15 発表者の接続時間 16:00〜16:10

2A21p11　酢酸菌 *Gluconobacter oxydans* の膜結合型キナ酸脱水素酵素の高発現

16:10　◦小松和貴[1]，　吉原　望[1]，　今村志穂実[2]，　片岡尚也[1]，薬師寿治[1]，足立収生[1]，松下一信[1]（[1]山口大農，[2]協和発酵バイオ）

2A21p12　酢酸菌 *Acetobacter pasteurianus* SKU1108 の持つ 2 種類の膜結合型アルデヒド脱水素酵素の機能解析

16:21　◦新納　俊[1]，　福成聖也[1]，　児玉知大[1]，　松谷峰之介[1]，片岡尚也[1]，　薬師寿治[1]，　Gunjana Theeragool[2]，　松下一信[1]（[1]山口大農，[2]カセサート大理）

2A21p13　高温適応育種された酢酸菌 *Acetobacter pasteurianus* の遺伝子工学的変異解析

16:32　◦谷本陽子[1]，　西倉慎顕[1]，　松谷峰之介[1]，　片岡尚也[1]，Gunjana Theeragool[2]，薬師寿治[1]，松下一信[1]（[1]山口大農，[2]Kasetsart 大理）

2A21p14　非温度制御グルタミン酸発酵に向けた耐熱性コリネ型細菌の開発

16:43　◦野中大輝[1]，　鶴岡史也[1]，　ナンタポーンナワラート[2]，松谷峰之介[1]，　片岡尚也[1]，　薬師寿治[1]，　松下一信[1]（[1]山口大農，[2]スラナリー工科大学）

2A21p15　酢酸菌に見いだされた初めての溶原性ファージ

16:54　◦小俣行輝[1]，　日比徳浩[2]，　中野　繁[2]，　天野昭一[1]，高野英晃[1]，上田賢志[1]（[1]日大生資科・生命セ，[2]株式会社 Mizkan Holdings 中央研究所）

p16〜p20 発表者の接続時間 17:05〜17:15

2A21p16　Characterization of unique cryptic plasmids in *Gluconacetobacter europaeus*

17:15　◦Wiwik Astuti[1]，　Naoki Akasaka[2]，　Yuri Ishii[1]，Hisao Sakoda[2]，Shinsuke Fujiwara[1]（[1]Kwansei Gakuin Univ.，[2]Marukan Vinegar.Co.Ltd.）

2A21p17　代謝改変酢酸菌によるショウジョウバエ誘引性素材の開発

17:26　◦合田慈子[1]，　赤坂直紀[2]，　石井友理[1]，　佐古田久雄[2]，藤原伸介[1]（[1]関西学院大理工，[2]マルカン酢）

2A21p18　東京都産パッションフルーツ果汁を用いた醸造酢の開発

17:37　◦保坂三仁，細井知弘，宮森清勝，西木秀人，三枝弘育（東京都立食技セ）

2A21p19　キムチの微生物群集構造に与える発酵温度と発酵期間の影響

17:48　◦鈴木彩香[1]，　天知誠吾[1]，　吉永朱里[1]，　大宮亜沙美[1]，李　営克[1]，　本間　崇[2]，　中村茉莉子[2]，　柳澤康平[2]，　安藤昭一[1]（[1]千葉大院，[2]美山）

2A21p20　豆乳凝固酵母 *Saccharomyces bayanus* SCY003 株によって生成された豆乳凝固物の物性と特徴

17:59　◦菅井竹彦[1]，　浦和　遥[1]，　金内　誠[1]，　畑中咲子[2]，石田光晴[1]（[1]宮城大食産，[2]宮城県産技センター）

A32 会場　午前の部（9:33〜11:54）

微生物―物質生産－発酵(二次代謝産物，抗生物質，ペプチド，生理活性物質)―

a04〜a05 発表者の接続時間 9:23〜9:33

2A32a03　講演取消

2A32a04　Porphyrins as required growth promoting compound(s) for uncultured bacteria ASN212 strain.

9:33　◦Mohammad Nazrul Islam Bhuiyan，Shinya Mitsuhashi，　Kengo Shigetomi，　Yoichi Kamagata，Makoto Ubukata（Graduate School of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo-city, Japan.）

2A32a05　昆虫病原性糸状菌ゲノムへのランダム遺伝子挿入による新規二次代謝物質の取得

9:44　◦佐藤功規[1]，　木下　浩[1]，　五十嵐康弘[2]，　井原史雄[3]，仁平卓也[1]（[1]阪大・生物工学国際交流セ，[2]富山県大・生工セ，[3]農研機構・果樹研）

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

2A32a06　複合培養における放線菌二次代謝の誘導要因の探索

10:05　◦浅水俊平[1]，尾崎太郎[1]，佐藤勝也[2]，尾仲宏康[1]（[1]東大院農，[2]原子力機構・量子ビーム）

2A32a07　*Streptomyces* sp. TP-A0584 由来ランチペプチド系化合物のゲノムマイニングによる同定

10:16　◦小野拓人，江畑一真，浅水俊平，尾崎太郎，尾仲宏康（東大院農）

2A32a08　goadsporin 生合成機構を利用した goadsporin 倍加ペプチドの生産

10:27　◦岡本悠志，尾崎太郎，浅水俊平，尾仲宏康（東大院農）

2A32a09　*Streptomyces* sp. TP-A0584 株由来ゴードスポリン生合成の *in vitro* 再構成

10:38　◦山下湖奈[1]，　尾崎太郎[1]，　浅水俊平[1]，　後藤佑樹[2]，菅　裕明[2]，尾仲宏康[1]（[1]東大院農，[2]東大院理）

2A32a10　二次代謝誘導物質ゴードスポリンの作用機構の解析

10:49　◦尾崎太郎，浅水俊平，尾仲宏康（東大院農）

a11〜a14 発表者の接続時間 11:00〜11:10

2A32a11　放線菌の潜在的二次代謝能活性化における集団培養法の有効性

11:10　◦高野未来[1]，保坂　毅[2]（[1]信州大院・農，[2]信州大・先鋭領域融合研究群）

2A32a12　抗生物質リンコマイシンが *Streptomyces* 属放線菌における二次代謝のエリシターとして働く仕組みの分子生物学的解析

11:21　◦今井　優[1]，　佐藤誠造[2]，　田中幸徳[3]，　下野和真[4]，越智幸三[3]，保坂　毅[5]（[1]信州大院・総合工，[2]日本水産・中研，[3]広工大・生命，[4]信州大・農，[5]信州大・先鋭領域融合研究群）

2A32a13　*Streptomyces* 属放線菌における伝達性線状プラスミドベクターを利用した 二次代謝産物生合成遺伝子の導入

11:32　◦小松　護，池田治生（北里大・北里生命研）

2A32a14　アラレマイシン生産菌 *Streptomyces* sp. A012304 の 2 種類の 5-アミノレブリン酸合成遺伝子ホモログの解析

11:43　◦岩井伯隆，森ひかる，和地正明（東工大院・生命理工・生物プロセス）

A32 会場　午後の部（14:00〜18:10）

微生物―物質生産－発酵(二次代謝産物，抗生物質，ペプチド，生理活性物質)―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

2A32p01　Cordycepin production by medicinal fungus Cordyceps militaris in static culture

14:00　◦Sari Nurmila[1]，　Tatsuya Kato[1,2]，　Enoch Y. Park[1,2]（[1]Shizuoka Univ.，[2]Research Institute of Green Science and Technology）

2A32p02　麹菌の 2 次代謝遺伝子発現を制御する Aospt3 と AohstD との関係

14:11　廣瀬雅人[1,2]，　河内護之[1,2]，　織田　健[1]，　◦岩下和裕[1,2]（[1]酒類研，[2]広大・先端研）

2A32p03　麹菌における *ustR* 遺伝子高発現による Ustiloxin B 生産と Ustiloxin B 生合成における KexB プロテアーゼの関与

14:22　◦吉見　啓[1]，　梅村舞子[2]，　長野希美[3]，　小池英明[2]，町田雅之[2]，阿部敬悦[1,4]（[1]東北大・未来研，[2]産総研・生物プロ

セス，[3]産総研・CBRC，[4]東北大院農）

2A32p04　抽出液面固定化システムにおける lovastatin 合成関連遺伝子の高発現

14:33　◦野村聖也，佐野元昭，小田　忍，大箸信一　（金沢工大ゲノム研）

2A32p05　呼吸阻害剤のアフラトキシン生産に与える影響と作用機構の解析

14:44　◦山本利義，飯村九林，作田庄平（東大農応生化）

p06〜p10 発表者の接続時間 14:55〜15:05

2A32p06　大腸菌の代謝工学による β-フェランドレン大量生産系の構築

15:05　◦末永美樹[1]，　萬年一斗[1]，　沓川　諒[1]，　茂木大介[1]，古谷昌弘[2]，下山武文[1]，高橋征司[1]，中山　亨[1]（[1]東北大院工，[2]積水化学　開発推進センター）

2A32p07　イソプレノイド生産に向けたシアノバクテリアの GGPP sytnhase の酵素学的解析

15:16　◦清田浩史[1,3]，　奥田裕紀子[2]，　平井優美[3]，　池内昌彦[1,2,4]（[1]東京大理，[2]東京大教養，[3]理研 CSRS，[4]CREST）

2A32p08　ラビリンチュラ類 *Aurantiochytrium limacinum* のペルオキシソームにおける脂肪酸代謝

15:27　◦合田初美[1]，　持永聖也[1]，　市村陽香[1]，　石橋洋平[1]，林　雅弘[2]，沖野　望[1]，伊東　信[1,3]（[1]九大院農，[2]宮大院農，[3]九大バイオアーク）

2A32p09　赤色海洋酵母が産生する希少カロテノイドの生理機能解析

15:38　◦佐藤　光[1]，津端翔二郎[1]，能木裕一[2]，浜本牧子[1]（[1]明治大院・農，[2]独立行政法人海洋研究開発機構）

2A32p10　アドニキサンチン光学異性体における抗アトピー効果への影響

15:49　◦高橋季之，永井秀忠（JX 日鉱日石エネルギー株式会社）

p11〜p15 発表者の接続時間 16:00〜16:10

2A32p11　*pgsE* 産物が γ-ポリグルタミン酸（PGA）の生産に与える影響 -各種のポリマー分子量解析法を用いた分子量の推定-

16:10　◦冨山敬史[1]，　猪井崇弘[1]，　梅名泰史[2,4]，　荻田　亮[1,3]，田中俊雄[1]，藤田憲一[1]（[1]阪市大・院理，[2]阪市大・複合先端研究機構，[3]阪市大・健康研セ，[4]JST さきがけ）

2A32p12　マンノシルエリスリトールリピッド量産酵母 Pseudozyma antarctica の遺伝子発現プロファイルの解析

16:21　◦森田友岳，小池英明，羽部　浩，北本　大（産総研）

2A32p13　乳酸菌発酵生産物質による口内細菌叢変化の解析

16:32　◦太田洋一[1]，　渡部晋三[2]，　岡田　勉[2]，　永山正人[3]，齋藤道雄[4]，岩田健一[1]（[1]芝工大院シ，[2]KS 西，[3]永山歯科，[4]齋藤歯科）

2A32p14　抗酵母活性を有する乳酸菌の選抜と抗酵母物質の特性解析

16:43　◦松浦雄幸，荒川健佑，宮本　拓（岡山大院環境生命）

2A32p15　*Lactobacillus helveticus* を用いた発酵豆乳に含まれる抗菌物質に関する研究

16:54　◦福留香菜子，荒川健佑，宮本　拓（岡山大院環境生命）

p16〜p20 発表者の接続時間 17:05〜17:15

2A32p16　モンゴル地域の伝統的発酵乳アイラグより分離した *Leuconostoc mesenteroides* 213M0 が産生するバクテリオシンの特性解析

17:15　◦吉田早紀，羽野知紘，荒川健佑，宮本　拓（岡山大院環境生命）

2A32p17　たくあん漬けから分離した乳酸球菌 *Lactococcus lactis* PJR24 が生産するバクテリオシンの精製と同定

17:26　◦木村宏和[1]，松崎弘美[2]（[1]尚絅大生活科学，[2]熊本県大環境共生）

2A32p18　Isolation of a marine *Lactobacillus* strain with bacteriocin-like activity

17:37　◦Hiroshi TANAKA[1]，　Kota TAKESHIMA[2]，Makoto MIYAGI[2]，　Akihiko KANAMOTO[3]，Shinya IKEMATSU[1]（[1]National Institute of Technology, Okinawa College, Bioresources Engineering, [2]National Institute of Technology, Okinawa College, Advanced Course, [3]OP BIO FACTORY Co., Ltd.）

2A32p19　環状バクテリオシン enterocin NKR-5-3B 生合成における環状化部位のアミノ酸残基の影響

17:48　◦杉野春貴[1]，　PEREZ Rodney Honrada[1]，　石橋直樹[1]，善藤威史[1]，中山二郎[1]，園元謙二[1,2]（[1]九大院農，[2]九大バイオアーク）

2A32p20　Production of ergothioneine by methylotrophic bacteria, *Methylobacterium* species

17:59　◦Kabir Md Alamgir[1]，Sachiko Masuda[1,2]，Akio Tani[1]（[1]Institute of Plant Science and Resources, Okayama University, [2]JST ALCA）

A34 会場　午前の部（9:11〜11:54）

微生物―物質生産－微生物変換，微生物酵素反応―

a02〜a05 発表者の接続時間 9:01〜9:11

2A34a02　Triacylglycerol を分泌する酵母変異株の解析

9:11　◦秦野琢之，藤井洋紀，岡田桃子，松崎浩明（福山大・生命工）

2A34a03　深海酵母が産生するフェノール代謝関連酵素 catechol 1,2-dioxygenase の酵素化学的特徴および遺伝子発現解析

9:22　◦前田剛志[1]，柴田光治[2]，能木裕一[3]，浜本牧子[1,2]（[1]明治大・農，[2]明治大院・農，[3]独立行政法人海洋研究開発機構）

2A34a04　耐熱性ニトリルヒドラターゼの性質検討

9:33　◦朴木佳那[1]，安川和志[1,2]，浅野泰久[1,2]（[1]富山県大工・生工研セ，[2]JST, ERATO）

2A34a05　Bacillus subtilis 由来のニトロ還元酵素とアゾ還元酵素の同定

9:44　◦坂原稜平，内野佑紀，清水大二郎，善野修平（前橋工科大工）

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

2A34a06　失われた中央代謝系ハブ酵素の発掘―「新規」PEP carboxykinase の同定とその生物間分布

10:05　◦千葉洋子[1,2]，神川龍馬[3,4]，野崎智義[2,1]（[1]筑波大院・生命環境，[2]感染研・寄生動物，[3]京大院・地球環境，[4]京大院・人間環境）

2A34a07　新規ステロイド 11 β 水酸化酵素のクローニングおよび機能解析

10:16　◦依田尚文[2]，　木村隆利[1]，　山本恭士[2]，　藤田靖也[2]，阪本　剛[2]，日比　慎[1]，小川　順[1]（[1]京大院農・応用生命，[2](株)三菱化学科学技術研究センター）

2A34a08　ピペロナール代謝酵素の諸性質と生理学的意義

10:27　◦土居志織，富田千晶，橋本義輝，小林達彦（筑波大院・生命環境）

2A34a09　リグナン代謝微生物の探索

10:38　◦藤木恵津子，熊野匠人，橋本義輝，小林達彦（筑波大院・生命環境）

2A34a10　膜結合型デキストラン合成酵素の発見とその機能解析

10:49　◦足立収生[1]，　アワーズロケA.[2]，　赤壁善彦[1]，　阿野嘉孝[3]，品川恵美子[4]，片岡尚也[1]，薬師寿治[1]，松下一信[1]（[1]山口大・農，[2]ラプラタ大学・発酵工学研，[3]愛媛大学・農，[4]宇部高専・物質工学）

a11〜a14 発表者の接続時間 11:00〜11:10

2A34a11　環状イミド化合物の立体選択的な加水分解反応を触媒する微生物酵素の探索

11:10　◦志澤宏明[1]，　野尻増俊[3]，　日比　慎[2]，　堀之内伸行[1]，

八十原良彦[3]，高橋里美[2]，小川　順[1]（[1]京大院農・応用生命，[2]京大院農・産業微生物，[3]株式会社カネカ　バイオテクノロジー開発研究所）

2A34a12　*Lactobacillus plantarum* AKU 1009a の不飽和脂肪酸飽和化経路に関わる水酸化脂肪酸脱水素酵素の機能解析

11:21　◦竹内道樹[1]，　朴　時範[2]，　北村苗穂子[1]，　内堀良重[1,3]，岸野重信[1]，小川　順[1,4]（[1]京大院農・応用生命，[2]京大院農・産業微生物，[3]日東薬品工業，[4]京大・生理化学ユニット）

2A34a13　*Lactobacillus acidophilus* 由来の新規不飽和脂肪酸水和酵素の同定と諸性質解明

11:32　◦平田晶子[1]，　竹内道樹[1]，　内堀良重[1,2]，　岸野重信[1]，小川　順[1]（[1]京大院農，[2]日東薬品工業）

2A34a14　漢方薬配糖体成分をアグリコンへ変換する乳酸菌の探索

11:43　内堀良重[1,2]，◦小佐田健吾[1]，岸野重信[1]，小川　順[1]（[1]京大院・農・応用生命，[2]日東薬品工業）

A34 会場　午後の部（14:00〜17:59）

微生物―物質生産－微生物変換，微生物酵素反応―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

2A34p01　*Chryseobacterium* sp. 5-3B 由来 *N*-アセチルトランスフェラーゼの発現と特性解析

14:00　◦尾関貴博[1]，田中耕生[2]，吉田健一[2]，竹中慎治[2]（[1]神戸大農，[2]神戸大院農）

2A34p02　*Eggerthella* sp. YY7918 由来のエクオール産生酵素ダイゼインレダクターゼの酵素学的性質

14:11　◦五島智子[1]，川田結花[2]，横山慎一郎[3]，鈴木　徹[2]（[1]岐阜大学応用生物科学部，[2]岐阜大学連合農学研究科，[3]岐阜県産業技術センター）

2A34p03　*Eggerthella* sp. YY7918 株のジヒドロダイゼインラセマーゼの解析

14:22　◦川田結花[1]，　五島智子[2]，　横山慎一郎[3]，　丹羽利夫[4]，鈴木　徹[1]（[1]岐阜大学連合農学研究科，[2]岐阜大学応用生物科学部，[3]岐阜県産業技術センター，[4]尚絅学院大）

2A34p04　大腸菌変異株を用いたセレン微粒子生成関連遺伝子の探索

14:33　◦田島寛隆[1,2]，　大場杏奈[1,2]，　大内田竜大[1]，　斎藤茂樹[1,2]，谷　泰史[1,2]，プラカッシュN.テジョ[3]，三原久明[1]（[1]立命館大生命科学，[2]立命館大 R-GIRO，[3]タパー大学）

2A34p05　有機溶剤耐性をもつ改変型カルボニル還元酵素の取得

14:44　◦松井美里，伊藤紀幸，川野　茂，八十原良彦（カネカ・バイオテクノロジー開発研）

p06〜p10 発表者の接続時間 14:55〜15:05

2A34p06　油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* の油脂蓄積関連遺伝子の発現解析

15:05　◦山崎晴丈[1]，　坂井真人[1]，　志田洋介[2]，　小笠原渉[2]，高久洋暁[1]（[1]新潟薬大応生科，[2]長岡技科大生物）

2A34p07　油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* における油脂低蓄積変異株の取得とその油脂生産関連遺伝子の発現解析

15:16　◦小黒雅智[1]，　山崎晴丈[1]，　志田洋介[2]，　小笠原渉[2]，高久洋暁[1]（[1]新潟薬大・応生科，[2]長岡技大・生物）

2A34p08　産業油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* における遺伝子破壊システムの開発とその利用

15:27　◦小黒芳史[1]，　山崎晴丈[1]，　志田洋介[2]，　小笠原渉[2]，高久洋暁[1]（[1]新潟薬大応生命，[2]長岡技科大）

2A34p09　機能性オリゴ糖ラクトビオン酸を生産する酢酸菌由来糖酸化酵素の同定

15:38　◦桐生高明，駒　大輔，木曽太郎，田中重光，中野博文，村上　洋（大阪市立工業研究所）

2A34p10　微生物による D-グルコース，D-グルコン酸から D-グルカル酸への変換反応経路の推定

15:49　◦村上　洋[1]，　靜間基博[1]，　田所宏基[2]，　正木久晴[2]，伊藤哲也[2]，桐生高明[1]，木曽太郎[1]，藤田孝輝[2]，三國克彦[2]（[1]阪市工研，[2]塩水港精糖）

p11〜p15 発表者の接続時間 16:00〜16:10

2A34p11　土壌メタゲノム由来 *Leifsonia* sp. S749 アルコール脱水素酵素（LSADH）類縁遺伝子の評価

16:10　◦風間美輝[1]，　狩谷理美[1]，　黒川純司[1]，　伊藤伸哉[1,2]（[1]富県大工，[2]富県大生工セ）

2A34p12　有機溶媒耐性菌を用いたキラルエポキシ化合物生産プロセスの開発

16:21　◦戸田　弘，伊藤伸哉（富県大生工セ）

2A34p13　シークヮーサー由来フラボノイド 3'-*O*-メチル基転移酵素（FOMT）の機能解析およびメチル化フラボノイド生産

16:32　◦伊藤伸哉[1,2]，鷲見のはら[2]，戸田　弘[1,2]（[1]富県大生工セ，[2]富県大工）

2A34p14　環境中の炭素分布とアルカンヒドロキシラーゼ（alk）遺伝子との関係解析

16:43　◦植田雄仁，向　真樹，ADHIKARI Dinesh，荒木希和子，久保　幹（立命館大学）

2A34p15　石油分解菌によるワックス分解能の解明

16:54　◦松浦太一，向　真樹，ADHIKARI Dinesh，荒木希和子，久保　幹（立命館大）

p16〜p19 発表者の接続時間 17:05〜17:15

2A34p16　超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* のキチン高分解・資化性株の創成

17:15　堀内あゆみ[1]，高橋直哉[1]，Jha Savyasachee[2]，◦金井　保[1,2]，跡見晴幸[1,2]（[1]京大院工，[2]科学技術振興機構 CREST）

2A34p17　乳酸菌由来 Aspartate : Alanine 交換輸送体（AspT）の基質依存的構造変化と輸送の解析

17:26　◦鈴木聡美[1]，木村拓也[1]，笹原綾子[1]，七谷　圭[2]，阿部敬悦[1,3]（[1]東北大・院・農・応用微生物，[2]東北大・院・工・応用生物物理学，[3]東北大・未来研）

2A34p18　*In vitro* 代謝工学を用いた NAD^+ サルベージ経路の構築

17:37　◦原　直矢，　中村安奈，　万袋木麻子，　本田孝祐，岡野憲司，大竹久夫（大阪大工）

2A34p19　長鎖 DNA の導入に利用可能な大腸菌-*Rhodococcus* シャトルベクターの構築

17:48　◦置田祥子，本田孝祐，畑中大希，岡野憲司，大竹久夫（大阪大工）

A36 会場　午前の部（9:11〜12:05）

微生物―細胞－情報伝達，細胞応答，ストレス応答―

a02〜a05 発表者の接続時間 9:01〜9:11

2A36a02　酵母に見出したフラボタンパク質 Tah18 依存的な NO 合成とその制御機構

9:11　◦吉川雄樹，那須野亮，渡辺大輔，高木博史（奈良先端大・バイオ）

2A36a03　酵母におけるフラボタンパク質 Tah18 依存的な細胞死誘導機構の解明

9:22　◦佐藤裕士，那須野亮，渡辺大輔，高木博史（奈良先端大バイオ）

2A36a04　分裂酵母における一酸化窒素シグナルとその生理的役割

9:33　INDRI Astuti Rika，◦渡辺大輔，高木博史（奈良先端大バイオ）

2A36a05　糸状菌 *Aspergillus nidulans* のプロリン/アルギニン代謝を介した NO 耐性機構

9:44　◦塚越まどか，桝尾俊介，周　勝敏，高谷直樹（筑波大院生命環境）

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

2A36a06　麹菌 *Aspergillus oryzae* の特異な光応答における AoVeA タンパク質の機能解析
10:05　◦川田純毅[1]，　丸山潤一[2]，　渡邉泰祐[1]，　外山博英[1]，北本勝ひこ[2]（[1]琉球大農・亜熱生資，[2]東大院・農生科・応生工）

2A36a07　酵母 TORC1 の in vitro での活性評価法の開発
10:16　◦谷川美頼，前田達哉（東京大学）

2A36a08　出芽酵母のリン酸飢餓応答におけるオートファジー誘導の役割とその制御機構の解析
10:27　◦横田浩人，五味勝也，新谷尚弘（東北大院農）

2A36a09　出芽酵母オートファジーにおける SNARE タンパク質の役割
10:38　◦菊地のぞみ，柚賀正樹，源田　博，五味勝也，新谷尚弘（東北大院・農・生物産業創成）

2A36a10　分裂酵母プロテインキナーゼ A は転写因子 Rst2 を介してスピンドルチェックポイント Mad1 の発現を制御している
10:49　酒井智健，川向　誠，◦松尾安浩（島根大・生物資源・生命工）

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

2A36a11　糸状菌における新規カーボンカタボライト抑制機構の発見
11:10　内田遼太，◦野原健弘，國武絵美，金丸京子，木村　真，小林哲夫（名古屋大）

2A36a12　麹菌 *Aspergillus oryzae* のタンパク質リン酸化酵素 PkaA は糖質加水分解酵素生産のカーボンカタボライト抑制に関与する
11:21　◦小川真弘[1]，國武絵美[2]，小林哲夫[2]，小山泰二[1]（[1]野田産研，[2]名大院生農）

2A36a13　環境センサー HysA を介した糸状菌ミトコンドリアの動態への影響
11:32　◦金丸京子，林　早紀，小島憲介，木村　真，小林哲夫（名大院生命農）

2A36a14　小胞体ストレス応答は麹菌のアミラーゼ高生産条件下での生育に必須である
11:43　◦田中瑞己，新谷尚弘，五味勝也（東北大院農）

2A36a15　麹菌マルトースパーミアーゼ分解におけるアレスチン様タンパク質 CreD の脱リン酸化の関与
11:54　◦松浦優佳，田中瑞己，平本哲也，新谷尚弘，五味勝也（東北大院農）

A36 会場　午後の部（14:11〜17:48）

微生物―細胞－情報伝達，細胞応答，ストレス応答―

p02〜p05 発表者の接続時間 14:01〜14:11

2A36p02　接合伝達性プラスミドのモデル環境下における挙動解析
14:11　◦片岡大亮[1]，飯田健義[2]，大熊盛也[3]，金原和秀[2]，新谷政己[2,3]（[1]静大工，[2]静大院工，[3]理研 BRC-JCM）

2A36p03　*Lactobacillus paracasei* における脱アセチル化酵素サーチュインの機能解析
14:22　◦新　穂高[1]，　郭　宣羚[1]，　田中尚人[2]，　岡田早苗[2]，遠藤明仁[1]，宮地竜郎[1]，中川純一[1]（[1]東農業大院･生産，[2]東農大･菌株）

2A36p04　超好熱菌 *Thermococcus kodakarensis* におけるポリアミンの細胞内局在及び濃度効果
14:33　◦井上貴央，中西千穂，岡田和真，藤原伸介（関西学院大院理工）

2A36p05　根粒菌の鉄・硫黄タンパク質生合成促進因子が植物相互作用に及ぼす影響
14:44　◦三井久幸（東北大院生命科）

p06〜p10 発表者の接続時間 14:55〜15:05

2A36p06　自然突然変異法で得られた抗菌性界面活性剤耐性大腸菌における変異部位の決定とその働きに関する研究
15:05　◦御厨真幸[1]，中田訓浩[2]，松村吉信[1,2]（[1]関西大・化学生命工，[2]関西大・ORDIST）

2A36p07　*Achromobacter denitrificans* YD35 株の一酸化窒素耐性機構の解析
15:16　◦長岡亜依[1]，平林美保[1]，土肥裕希[2]，高谷直樹[1]（[1]筑波大院生命環境，[2]岡山理大工）

2A36p08　大腸菌細胞における，キヌレニン抗体に反応する，疎水性の高いヒト SOD1 分子種の検出
15:27　◦黒川洋一，桜田真一，松井義隆（福井県大生物資源）

2A36p09　好気培養がカロテノイド生産乳酸菌のイソプレノイド生合成経路に与える影響
15:38　◦萩　達朗，小林美穂，野村　将（農研機構・畜草研）

2A36p10　エタノール生産細菌 Zymomonas mobilis 呼吸鎖の塩ストレス耐性への関与に関する研究
15:49　◦林　　毅，村田奈己，関村光平，下郡光貴，杉田　翔（別府大学食栄科）

p11〜p15 発表者の接続時間 16:00〜16:10

2A36p11　希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* の運動性胞子の走化性制御メカニズムの解析
16:10　◦木村知宏[1]，　手塚武揚[1]，　中村周吾[1]，　奥　寛雅[2]，大西康夫[1]（[1]東大院農生科・応生工，[2]群馬大院理工学府・理工）

2A36p12　希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* の遊走胞子べん毛の回転運動の解析
16:21　手塚武揚[2]，◦堺　隆之[1]，曽和義幸[3]，大西康夫[2]（[1]東大農・生命化学工学，[2]東大院農生科・応生工，[3]法政大・生命科学部）

2A36p13　*Stenotrophomonas maltophilia* のフェノール類に対する走性及びその測定における高感度化の検討
16:32　◦渡邉祐子，荷方稔之，渡辺大介，中屋敷凌，小野寺唯，柿井一男（宇都宮大・工）

2A36p14　青枯病菌 *Ralstonia solanacearum* のリン酸イオンに対する走性応答
16:43　◦寺本拓也[1]，　荷方稔之[1]，　緋田安希子[2]，　奥　正太[2]，柿井一男[1]，加藤純一[2]（[1]宇都宮大･工，[2]広島大･院先端物質科学･分子生命機能科学）

2A36p15　Studies on inhibitory effects of malic acid on plant infection of *Ralstonia solanacearum*
16:54　◦MATTANA TUNCHAI，　SHOTA OKU，　AKIKO HIDA，TAKAHISA TAJIMA，YUTAKA NAKASHIMADA，JUNICHI KATO（Hiroshima Univ., Grad. Sch. Adv. Sci. Matt.）

p16〜p18 発表者の接続時間 17:05〜17:15

2A36p16　イネ苗立枯細菌病菌 *Burkholderia plantarii* における三成分制御系 TroK, TroR1, TroR2 によるトロポロン合成制御システム
17:15　◦三輪瞬平[1]，　吉岡誠訓[1]，　紀平絵梨[1]，　仲曽根薫[2]，五十嵐雅之[3]，波多野和樹[3]，吉川博文[4,5]，兼崎　友[5]，江口陽子[1]，内海龍太郎[1]（[1]近大院農バイオ，[2]近大工，[3]微化研，[4]東京農大応生化バイオ，[5]東京農大ゲノム解析セ）

2A36p17　酸応答性ヒスチジンキナーゼセンサー EvgS の活性化と細胞内 pH
17:26　◦江口陽子，山中芽依，内海龍太郎（近畿大農）

2A36p18　Mode of Action of Bacterial Histidine Kinase Inhibitor, Waldiomycin in *Staphylococcus aureus*
17:37　◦MD FAKHRUZZAMAN[1]，Hirokazu Kino[1]，Yoichi Inukai[1]，Masayuki Igarashi[2]，Yoko Eguchi[1]，Ryutaro Utsumi[1]（[1]Grad. Sch. of Agric., Kinki Univ.，[2]Inst. Microb. Chem.）

A37 会場　午前の部（10:05〜12:05）

微生物―代謝－代謝調節，発酵生理，メタボローム―

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

2A37a06　Streptomyces coelicolor A(3)2 M145 における内在性 NO の生理的意義の解明
10:05　°小川翔大，　草間慎一朗，　杉浦　遼，　伊藤晋作，矢嶋俊介，祥雲弘文，佐々木康幸（東京農業大学）

2A37a07　放線菌の亜硝酸生産に関する解析
10:16　°本田紗英，小口　優，伊藤晋作，矢嶋俊介，祥雲弘文，佐々木康幸（東農大バイオ）

2A37a08　Streptomyces coelicolor の新規窒素代謝系の解明
10:27　°行岡揺弥，小口　悠，信田啓介，小林卓也，伊藤晋作，矢嶋俊介，祥雲弘文，佐々木康幸（東農大）

2A37a09　超好熱菌 *Thermococcus kodakarensis* のアミノ酸酸化代謝に関与する 2 種のインドールピルビン酸 : フェレドキシン酸化還元酵素ホモログの機能解析
10:38　°野原健太[1]，　折田和泉[1]，　中村　聡[1]，　今中忠行[2]，福居俊昭[1]（[1]東京工業大学，[2]立命館大学）

2A37a10　Autotrophic and heterotrophic accumulation of poly-β-hydroxybutyrate by a moderately thermophilic hydrogen-oxidizing bacterium Hydrogenophilus thermoluteolus TH-1
10:49　°Huu Tri NGUYEN[1]，Fumiko Ishizuna[2]，Yuya Sato[3]，Hiroyuki Arai[1]，Masaharu Ishii[1]（[1]Department of Biotechnology, Graduate school of Agriculture and Life Science, The University of Tokyo, [2]Technology Advancement Centre, Graduate school of Agriculture and Life Science, The University of Tokyo, [3]Research Institute for Environmental Management Technology, National Insitute of Advanced Industrial Science and Technology（AIST））

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

2A37a11　*Methylobacterium extorquens* AM1 のメタノール脱水素酵素 XoxF1 の熱安定性は補因子であるレアアースの種類に依存する
11:10　°日比野歩美[1]，　海老原章郎[1]，　谷　明生[2]，　三井亮司[3]，早川享志[1]，中川智行[1]（[1]岐阜大院応生，[2]岡山大植物研，[3]岡山理大理）

2A37a12　メチロトローフ酵母 *Pichia methanolica* のホルムアルデヒド脱水素酵素の発現とメタノール代謝制御
11:21　°若山敬嗣，山口早希子，早川享志，中川智行（岐阜大院応生）

2A37a13　出芽酵母の NADPH 供給系はアセトアルデヒドストレス耐性機構において重要な役割を持つ
11:32　°高木哲史[1]，　松山明加[1]，　佐藤優太[1]，　早瀬未来[1]，早川享志[1]，　河井重幸[2]，　村田幸作[3]，　奥　公秀[2]，　由里本博也[2]，阪井康能[2]，中川智行[1]（[1]岐阜大応生，[2]京都大院農，[3]摂南大理工）

2A37a14　大腸菌におけるメタボリックスイッチ制御機構の解明
11:43　°島田友裕[1]，山梨智也[2]，鮒　信学[2]，田中　寛[1]（[1]東工大資源研，[2]静県大食品栄養）

2A37a15　温度応答性高分子を用いた微生物代謝新規制御法の開発
11:54　°勝亦雄太，豊福雅典，小川和義，野村暢彦（筑波大学）

A37 会場　午後の部（14:11〜17:59）

微生物―代謝－代謝調節，発酵生理，メタボローム―

p02〜p05 発表者の接続時間 14:01〜14:11

2A37p02　*Burkholderia* sp. 5-2 株の L-グリセリン酸代謝に関わる L-glycerate dehydratase の解析
14:11　°根岸真衣子[1]，中村　顕[2]（[1]筑波大生命環境科学研究科，[2]筑波大生命環境系）

2A37p03　油脂生産酵母 *Yarrowia lipolytica* の長鎖アルコール資化に関わるアルコールデヒドロゲナーゼおよび長鎖アルコールオキシダーゼ遺伝子の同定と解析
14:22　°岩間　亮[1]，太田明徳[2]，堀内裕之[1]，福田良一[1]（[1]東大院・農生科・応生工，[2]中部大・応生・応化）

2A37p04　スフィンゴモナッド細菌株の有機炭素源非添加無機固体培地での生育に関与する推定アルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子 *adhX* の解析
14:33　°稲葉慎之介，平野　丈，宇井博紀，大坪嘉行，永田裕二，津田雅孝（東北大・院生命科）

2A37p05　分裂酵母 CoQ 欠損株が蓄積する中間体の解析
14:44　°柳井良太，赤井華子，西野耕平，戒能智宏，川向　誠（島根大生物資源）

p06〜p10 発表者の接続時間 14:55〜15:05

2A37p06　イソプレノイド合成経路を代謝改変した大腸菌変異株における鉄硫黄クラスター生合成系の機能解析
15:05　°田中尚志[1]，　金澤美秋[1]，　葛山智久[2]，　朝井　計[1]，高橋康弘[1]（[1]埼玉大院理工，[2]東大生セ）

2A37p07　枯草菌における鉄硫黄クラスター生合成オペロン（*sufCDSUB*）破壊株の構築と異種間での相補解析
15:16　°横山奈央[1]，　丸山ちひろ[1]，　野中ちひろ[1]，　葛山智久[2]，朝井　計[1]，高橋康弘[1]（[1]埼玉大・理工，[2]東京大・生物生産工学研究センター）

2A37p08　高度好熱菌 *Thermus thermophilus* におけるタンパク質アセチル化酵素及び標的タンパク質の同定と機能解析
15:27　°山本寛之，　吉田彩子，　富田武郎，　古園さおり，葛山智久，西山　真（東大生物工学セ）

2A37p09　*Corynebacterium glutamicum* における短鎖アシル化修飾を介したホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ（PEPC）の機能調節
15:38　°永野　愛[1,2]，水野裕太[2]，西山　真[1]，古園さおり[1]（[1]東京大学生物生産工学研究センター，[2]協和発酵バイオ株式会社）

2A37p10　ピルビン酸キナーゼ欠失が *Corynebacterium glutamicum* のリジン生産に与える影響
15:49　°横田　篤，柳瀬真紀，愛甲　徹，和田　大（北大院農）

p11〜p15 発表者の接続時間 16:00〜16:10

2A37p11　*Bifidobacterium longum* 105-A のメチオニン利用において *S*-リボシルホモシステインリアーゼが重要な役割を果たす
16:10　°和田　大，小松一喜，松本菜々恵，横田　篤（北大院農）

2A37p12　深海脱窒細菌 *Pseudomonas* sp. strain MT-1 の亜硝酸塩還元酵素の電子供与体の発現と精製
16:21　°榛村　惟[1]，　荒木琢磨[2]，　三本木至宏[3]，　掘越弘毅[4]，加藤千明[4]，為我井秀行[1,2]（[1]日大院総合基礎科，[2]日大文理，[3]広大院生物圏科，[4]海洋機構）

2A37p13　好冷好圧性細菌 *Shewanella violacea* DSS12 の無機ピロホスファターゼの発現と精製
16:32　°石坂　光[1]，　關　輝世[2]，　秋元理有[2]，　三本木至宏[3]，加藤千明[4]，為我井秀行[1,2]（[1]日大院総合基礎科，[2]日大文理，[3]広大院生物圏科，[4]海洋機構）

2A37p14　*Shewanella livingstonensis* Ac10 の生育温度による *c* 型シトクロムの発現の違い
16:43　°加藤隆大[1]，　迫田彩日[2]，　続木麻里子[1]，　門脇芽里[1]，川本　純[3]，栗原達夫[3]，為我井秀行[1,2]（[1]日大文理，[2]日本大院総合基礎科，[3]京大化研）

2A37p15　*Shewanella amazonensis* のシトクロム c_4 を用いた，異なる環境に生育する *Shewanella* 属細菌のシトクロム *c* 酸化酵素活性
16:54　°緑川亮太[1]，　加藤千明[2]，　三本木至宏[3]，　川本　純[4]，栗原達夫[4]，為我井秀行[1,5]（[1]日大院総合基礎科，[2]海洋機構，[3]広大院生物圏科，[4]京大化研，[5]日大文理）

p16〜p19 発表者の接続時間 17:05〜17:15

2A37p16　ユーグレナのワックスエステル生合成の駆動に必須の無機炭素固定経路
17:15　°西尾和樹[1]，小川拓水[1]，パデルムショークアチャラ[1]，岡澤敦司[1]，古橋　剛[2]，中澤昌美[1]，有田正規[3]，太田大策[1]（[1]阪府大院生命環境，[2]理研 CSRS，[3]国立遺伝研）

2A37p17　キノコ菌糸のシキミ酸経路を青色光刺激で制御する
17:26　°小嶋政信[1]，木村仁奈子[2]，三浦竜平[1]（[1]信州大院農，[2]信州大農）

2A37p18　青色光刺激によるシキミ酸蓄積能の高いキノコ菌糸のスクリーニング
17:37　°木村仁奈子[1]，小嶋政信[2]，市村昌紀[3]，三原　聡[3]（[1]信州大農，[2]信州大院農，[3]JA 中野市）

2A37p19　キノコ菌糸含有抗腫瘍活性物質並びに癌関連転移遺伝子発現抑制物質の探索
17:48　°三浦竜平，小嶋政信，藤井　博（信州大院農）

A41 会場　午前の部（9:11〜12:05）

微生物―細胞－分離，分類，生態―

a02〜a05 発表者の接続時間 9:01〜9:11

2A41a02　ブドウ滓サイレージからの乳酸菌の分離と性質
9:11　°小西啓太[1]，乙黒美彩[1]，岸本宗和[1]，古屋元宏[2]，柳田藤寿[1]（[1]山梨大院．ワイン研，[2]山梨県畜産試験場）

2A41a03　共培養による乳酸菌の新規分離法の開発(酵母エンハンス法)
9:22　°前田康太郎，乙黒美彩，岸本宗和，柳田藤寿（山梨大院．ワイン研）

2A41a04　モンゴル国産発酵食品及び花から分離した酵母と *Metschnikowia* 属の 2 新種について
9:33　°Jambaldorj Ulziichimeg，山崎敦史，鶴海泰久，安藤勝彦（製品評価技術基盤機構（NITE））

2A41a05　*Debaryomycetaceae* 科に属するインドネシア産新種酵母
9:44　°小林隆一[1]，Atit Kanti[2]，川崎浩子[1]（[1]製品評価技術基盤機構・NBRC，[2]LIPI, Indonesia）

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

2A41a06　MALDI-TOF MS を用いた *S10*-GERMS 法に基づく *Alicyclobacillus acidoterrestris* および *A.acidocaldarius* の識別
10:05　°鈴木真弓，細田晃文，田村廣人（名城大学）

2A41a07　分離源抽出液培地を用いた高温コンポストからの新規細菌の分離
10:16　°三浦ちはや，湯本　勲（北大農）

2A41a08　日本の高山マメ科植物から単離した根粒菌の系統と宿主特異性
10:27　°瀬尾直登，高梨功次郎，矢崎一史　（京都大学生存圏研究所）

2A41a09　超好熱好酸性アーキア *Sulfolobus* に感染する新規ウィルスの単離と性状解析
10:38　°酒井紀利人[1,2]，永吉佑子[1,2]，藤野泰寛[2,3]，土居克実[1,2]（[1]九大院生資環，[2]日本農芸化学会，[3]九大基幹教育院）

2A41a10　PHA(polyhydroxyalakanoate)合成耐熱性 Bacillus 属の分離と解析
10:49　°田中　優，水野康平（北九州高専）

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

2A41a11　汽水湖における孔径 0.22 μm のメンブレンフィルターを通過可能な細菌の探索と解析
11:10　°久志本晃弥[1]，福田洸平[3]，山村杏子[1]，石堂真輝[1]，金原和秀[1,2]，新谷政己[1,2]（[1]静大工，[2]静大院工，[3]静大創造科技院）

2A41a12　汽水湖における孔径 0.22 μm のメンブレンフィルターを通過可能な微生物群の菌叢解析
11:21　°福田洸平[1]，沼田　充[2]，三浦隆匡[2]，久志本晃弥[3]，山副敦司[2]，藤田信之[2]，金原和秀[1,3]，新谷政己[1,3]（[1]静大・創造科技院，[2]NITE，[3]静大・工）

2A41a13　深部地下油層環境における未培養細菌の機能解明
11:32　°原　英里[1]，眞弓大介[1]，玉澤　聡[1]，玉木秀幸[1]，前田治男[2]，若山　樹[2]，五十嵐雅之[2]，西川向一[3]，押部　洋[3]，白井良和[3]，坂田　将[1]，鎌形洋一[1]（[1]産総研，[2]国際石油開発帝石(株)，[3]東京ガス(株)）

2A41a14　深部地下油層環境から分離した新規 *Deferribacteres* 門鉄還元細菌の機能解析
11:43　°玉澤　聡[1]，眞弓大介[1]，持丸華子[1]，坂田　将[1]，前田治男[2]，若山　樹[2]，五十嵐雅之[2]，鎌形洋一[1]，玉木秀幸[1]（[1]産業技術総合研究所，[2]国際石油開発帝石株式会社）

2A41a15　好酸性の鉄酸化細菌 *Acidithiobacillus* sp. NU-1 株の生理学的特徴とゲノム解析
11:54　°上岡永佳，高妻篤史，渡邉一哉（東京薬科大生命科学）

A41 会場　午後の部（14:00〜18:10）

微生物―細胞－分離，分類，生態―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

2A41p01　食品腐敗原因 *Bacillus coagulans* における菌株識別法の評価
14:00　°佐藤　惇[1]，堀内あゆみ[1]，富山大輔[1]，中山素一[1]，湯井幸治[1]，宮本敬久[2]（[1]花王(株)安全性科学研，[2]九州大農）

2A41p02　タイ由来アルコール飲料用スターターの微生物叢解析
14:11　°村越美穂[1]，三澤涼太[1]，米田英伸[1,2]，Aran H-Kittikun[3]，浅野泰久[1,2]（[1]富山県大工・生工研セ，[2]JST，ERATO，[3]Prince of Songkla University）

2A41p03　外生菌根性オオサビハリタケ(*Hydnellum ferrugineum*)菌糸マットが直下の北方針葉樹林土壌微生物群集構造に与える影響
14:22　°礒田玲華[1]，宮本敏澄[1]，原新太郎[2]，Zackrisson Olle[3]，橋床泰之[1]（[1]北大院農，[2]東北大院農，[3]Swedish University of Agricultural Sciences）

2A41p04　ゴリラ特異的と考えられる新規乳酸菌 *Lactobacillus gorillae* の分離
14:33　°牛田一成[1]，土田さやか[1]，北原真樹[2]，大熊盛也[2]，ピエールフィリップベアングギマ[3]，藤田志歩[4]，山極寿一[5]（[1]京都府立大学院生命環境，[2]理研微生物材料開発室，[3]ガボン熱帯生態研究所，[4]鹿児島大学共同獣医，[5]京都大学院理）

2A41p05　ヒト皮膚常在細菌の多様性：健常者とアトピー性皮膚炎患者の比較
14:44　°佐藤綾子[1]，稲垣瑞穂[2]，澤野博之[1]，坪内芙美香[1]，林　将大[3]，田中香お里[3]，兼崎　友[4]，吉川博文[4]，鈴木　徹[2]（[1]岐阜大応用生物，[2]岐阜大連農，[3]岐阜大生命科学総合研究支援センター，[4]東農大応用生物）

p06〜p10 発表者の接続時間 14:55〜15:05

2A41p06　セルロースプレートと寒天培地の併用による土壌糸状菌の分離効果
15:05　°野中健一[1,2]，戸高　眠[3]，大村　智[1]，増間碌郎[1,2]（[1]北里大生命研，[2]北里大院感染制御，[3]極東製薬工業）

2A41p07　深海由来糸状菌の分離および抗真菌活性物質の探索
15:16　°志鷹和奈[1]，野中健一[2]，長野由梨子[3]，岩月正人[2]，丸山　正[1,3]，大村　智[2]（[1]北里大院海洋，[2]北里大生命研，[3]海洋研究開発機構）

2A41p08　*Arabidopsis thaliana* と *Nicotiana benthamiana* の根からの放線菌の分離とその抗生物質生産能の評価
15:27　°石垣祐二，白須　賢（理研 CSRS）

2A41p09　*Micromonosporaceae* 科放線菌の細胞壁ペプチドグリカンの構造解析
15:38　°武　晃[1]，中島琢自[2]，稲橋佑起[2]，大村　智[2]，

塩見和朗[1,2]，高橋洋子[2]，松本厚子[1,2]（[1]北里大院・感染制御，[2]北里大・生命研）

2A41p10　宿主の状態がプラスミドの接合伝達に及ぼす影響の解析

15:49　◦柳田晃輔[1]，松井一泰[1]，新谷政己[2]，水口(鈴木)千穂[1]，岡田憲典[1]，野尻秀昭[1]（[1]東大生物工学セ，[2]静大院・工）

p11〜p15 発表者の接続時間 16:00〜16:10

2A41p11　循環型浄化槽内における細菌共生関係の探索

16:10　◦川西賢吾，鈴木智順（東理大・応用生物）

2A41p12　循環型汚水浄化槽内で高い有機物分解能をもつ主要細菌群の特定へ向けた検討

16:21　◦榊原健太，鈴木智順（東理大・応用生物）

2A41p13　循環型浄化槽における脱窒菌の細菌叢解析と脱窒過程に与える環境要因の影響

16:32　◦岩井正幸，鈴木智順（東理大・応用生物）

2A41p14　循環型浄化槽における真核生物および細菌の有機物分解メカニズム解析

16:43　◦永井　茜，鈴木智順（東理大・応用生物）

2A41p15　循環型汚水浄化装置内の細菌叢遷移とタンパク質代謝系の解析

16:54　◦有見芳樹，小柳芽衣，鈴木智順（東理大　応用生物）

p16〜p20 発表者の接続時間 17:05〜17:15

2A41p16　異なる土壌環境におけるアンモニア酸化細菌およびアンモニア酸化古細菌の比較解析

17:15　◦中俣慶彦，鈴木智順（東理大・応用生物）

2A41p17　水稲根圏より分離したタイプ I メタン酸化細菌 *Methylomagnum ishizawai* gen. nov., sp. nov.

17:26　カァリファアシュラフ[1,2]，李　哲揆[1]，小木曾拓也[1]，上野千穂子[1]，ディアノウディエリ[1,3]，出町豊子[4]，片山新太[4]，◦浅川　晋[1]（[1]名古屋大院生命農，[2]エジプト　ベニ・スエフ大，[3]ブルキナファソ　国立科学技術研究センター，[4]名古屋大エコトピア科学研究所）

2A41p18　Comparation of N_2O-emitting bacteria and bacterial community between *Sphagnum fuscum* and *Sphagnum capilifolium* in the boreal peat

17:37　◦Yanxia NIE[1]，Teemu Tahvanainen[2]，Mengcen Wang[1,3]，Yasuyuki Hashidoko[1]（[1]Hokkaido University, [2]University of Eastern Finland, [3]Zhejiang University）

2A41p19　Isolation of polyphosphate-accumulating organisms through single cell analysis of microbial communities using fluorescence-activated cell sorting

17:48　◦Mia Terashima[1,2]，Kato Souichiro[1,2]，Yoichi Kamagata[1,2]（[1]Hokkaido Univ., [2]Bioproduction Research Institute AIST）

2A41p20　希土類元素含有磁性粒子を形成する磁性細菌の探索

17:59　◦下重裕一[1]，水木　徹[1]，中島義賢[1]，小林英城[2]，島村　繁[2]，井上　明[1]，前川　透[1]（[1]東洋大学，[2]海洋研究開発機構）

B21 会場　午前の部（9:11〜11:54）

微生物―遺伝子－構造，機能―

a02〜a05 発表者の接続時間 9:01〜9:11

2B21a02　歯周病原性細菌 *Eikenella corrodens* におけるゲノム再編による溶血活性の発現

9:11　◦高原沙里[1]，下川床愛[1]，野杁由一郎[2]，阿座上弘行[1]（[1]山口大農，[2]阪大歯）

2B21a03　σ^Eの欠失による大腸菌の致死性は TA システムトキシンの活性化により抑制される

9:22　大門康志[1]，◦成田新一郎[2]，秋山芳展[1]（[1]京都大学，[2]盛岡大学）

2B21a04　マグネシウムによる L34 リボソームタンパク質機能の相補

9:33　◦赤沼元気[1]，小林亜湖[1]，河村富士夫[2]，志波　優[3]，渡辺　智[4]，吉川博文[4]，石塚盛雄[1]（[1]中央大・理工，[2]立教大・理，[3]東農大・NGRC，[4]東農大・応生科）

2B21a05　Bacteroidetes 門微生物の窒素固定に関する諸解析

9:44　◦井上潤一[1,2]，本郷裕一[3]，坂本光央[1]，大島健志朗[4]，服部正平[4]，大熊盛也[1]（[1]理研 BRC-JCM，[2]シナプテック株式会社，[3]東工大院　生命理工，[4]東大院　新領域）

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

2B21a06　DNA 二重鎖切断領域の核膜近傍への移動における SWR1 および INO80 クロマチンリモデリング複合体の役割

10:05　◦尾間由佳子[1]，折原行希[2]，小西辰紀[1]，堀籠智洋[3]，Susan GASSER[3]，原田昌彦[1]（[1]東北大・院農，[2]東北大・農，[3]FMI）

2B21a07　DNA 損傷依存的姉妹染色分体間接着への核膜タンパク質の関与

10:16　◦折原行希[1]，尾間由佳子[2]，小西辰紀[2]，堀籠智洋[3]，Susan GASSER[3]，原田昌彦[2]（[1]東北大・農，[2]東北大・院農，[3]FMI）

2B21a08　プラスミノーゲン活性化乳酸菌およびその不活性変異株のプラスミド解析

10:27　◦野村　将，小林美穂，萩　達朗，鈴木チセ（農研機構畜草研）

2B21a09　新規 m5C MTase を発現する *Lactococcus* の各生育ステージにおける DNA メチル化割合の解析

10:38　◦小林美穂，萩　達朗，鈴木チセ，木元(新良)広実，守谷直子，野村　将（農研機構・畜草研）

2B21a10　酵母 *Yarrowia lipolytica* セントロメア領域への Cbf1 転写因子結合部位の同定

10:49　◦松岡正佳，廣重美咲，宮川あい，藤川義章，長濱一弘（崇城大生物生命）

a11〜a14 発表者の接続時間 11:00〜11:10

2B21a11　テロメアでの組換中間体の蓄積がスピンドルチェックポイントを活性化する機構

11:10　◦横尾悠希，中野明美，上野　勝（広島大学）

2B21a12　rDNA での複製中間体の蓄積が SAC を活性化する機構の解明

11:21　◦ンワイイー，中野明美，上野　勝（広島大学）

2B21a13　環状染色体の形成および維持に必要な遺伝子

11:32　◦上野　勝，田中大樹，杉原あさみ（広島大院）

2B21a14　*Aspergillus nidulans* におけるガラクトフラノース転移酵素の機能解析

11:43　◦片渕由佳子[1]，篠塚早紀[2]，泉　実[2]，浴野圭輔[1]，竹川　薫[3]，後藤正利[3]，野村善幸[1]，岡　拓二[1]（[1]崇城大・生物生命，[2]岡山大院・環境生命，[3]九大院・農）

B21 会場　午後の部（14:00〜18:10）

微生物―遺伝子－構造，機能―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

2B21p01　麹菌 *Aspergillus oryzae* の持つ 2 つの分泌型ホスホリパーゼ A_2オルソログの酵素学的性質

14:00　◦高柳亜由美[1]，宮川拓也[2]，大塚　淳[2]，田之倉優[2]，北本勝ひこ[1]，有岡　学[1]（[1]東大院・農生科・応生工，[2]東大院・農生科・応生化）

2B21p02　麹菌 *Aspergillus oryzae* の持つ細胞質型ホスホリパーゼ A_2様タンパク質 AoPlaA の機能解析

14:11　◦伊澤　翔，高柳亜由美，駒井紀之，小谷昌平，北本勝ひこ，有岡　学（東大院・農生科・応生工）

2B21p03　分裂酵母 *S. pombe* の発芽に関わる遺伝子の取得と解析

14:22　◦松崎彩子，東谷未来，中村太郎（大阪市大院理）

2B21p04　分裂酵母 MCM 結合タンパク質 Mcb1 の機能解析

14:33 ○刈谷真子[1]，SANTOSA Venny[1]，鐘巻将人[2]，田中克典[1]（[1]関西学院大・理工・生命，[2]国立遺伝研）

2B21p05　冬虫夏草（*Cordyceps militaris*）由来レクチンとその結合物質

14:44 ○竹島愛乃[1]，鈴木智大[2]，崔　宰熏[1]，道羅英夫[2]，加藤竜也[1,2]，朴　龍洙[1,2,3]，阿部伸一[4]，佐伯　潤[4]，小林夕香[5]，平井浩文[1,2]，河岸洋和[1,2,3]（[1]静大院農・応生化，[2]静大・グリーン研，[3]静大院・創造，[4]にちはら総合研究所，[5]J-オイルミルズ）

p06〜p10 発表者の接続時間 14:55〜15:05

2B21p06　*Sphingobium* sp. SYK-6 株のフェニルクマラン型リグニン二量体化合物代謝系遺伝子の単離と解析（第 3 報）

15:05 ○高橋健司[1]，上村直史[1]，菱山正二郎[2]，原　啓文[3]，笠井大輔[1]，片山義博[4]，福田雅夫[1]，梶田真也[5]，政井英司[1]（[1]長岡技科大・生物，[2]森林総研，[3]MJIIT, Univ. Tech., Malaysia，[4]日大・生資科，[5]東農工大院・BASE）

2B21p07　リグニン生合成中間体に作用する新規芳香環開裂酵素遺伝子の探索

15:16 ○小林　巽[1]，上村直史[1]，菱山正二郎[2]，笠井大輔[1]，福田雅夫[1]，菊地　淳[3]，梶田真也[4]，政井英司[1]（[1]長岡技科大・生物，[2]森林総研，[3]理研 PSC，[4]東農工大院・BASE）

2B21p08　コニフェリルアルデヒド二重結合還元酵素の部位特異的変異導入による改良

15:27 ○上村直史[1]，渡辺眞悟[1]，荒木拓馬[1]，菱山正二郎[2]，笠井大輔[1]，福田雅夫[1]，菊地　淳[3]，梶田真也[4]，政井英司[1]（[1]長岡技科大・生物，[2]森林総研，[3]理研 PSC，[4]東農工大院・BASE）

2B21p09　*Microbacterium* sp. におけるヒドラジド代謝遺伝子の解析

15:38 ○秋山友了[1]，多久和篤史[2]，石毛太一郎[3]，佐々木康幸[1]，伊藤晋作[1]，老沼研一[2]，高谷直樹[2]，矢嶋俊介[1]（[1]東農大応生科・バイオ，[2]筑波大・生命環境，[3]東農大・ゲノムセ）

2B21p10　*Pseudomonas stutzeri* KF716 のビフェニル・サリチル酸分解系をコードする可動性遺伝因子の解析

15:49 ○廣瀬　遼[1]，平井晋哉[1]，横井春比古[1]，木村信忠[2]，末永　光[2]，渡邊崇人[3]，山副敦司[4]，藤原秀彦[5]，古川謙介[5]（[1]宮崎大工・環境応用化，[2]産総研・生物プロセス，[3]京大・生存研，[4]NITE・バイオ，[5]別府大・食物栄養）

p11〜p15 発表者の接続時間 16:00〜16:10

2B21p11　*Halomonas* sp. O-1 の phasin タンパク質遺伝子 *phaP* の機能解析

16:10 ○木原崇博[1]，柘植丈治[2]，水野康平[1]（[1]北九州高専，[2]東工大）

2B21p12　好塩性アーキア *Haloferax volcanii* の脱窒関連遺伝子 *mcoA* および *pqqE2* の機能解析

16:21 ○荒木琢磨[1]，藤田純平[2]，吉松勝彦[2]，鮫島玲子[3]，藤原健智[1,2]（[1]静岡大大学院，[2]静岡大理，[3]静岡大農）

2B21p13　*Pseudomonas putida* の *cbpA* および *dnaJ* の機能解析

16:32 ○伊藤史浩[1]，足立佑貴[2]，福森文康[3]（[1]東洋大院・生命，[2]東洋大・生命，[3]東洋大・食環）

2B21p14　*Methylobacterium* 属細菌における KaiC タンパク質リン酸化の機能解析

16:43 ○藤澤健斗[1]，井口博之[1]，由里本博也[1]，小山時隆[2]，阪井康能[1,3]（[1]京大院農・応用生命，[2]京大院理・植物，[3]JST・ALCA）

2B21p15　*Bacillus thuringiensis* TK-E6 が産生する非 3-ドメイン型 Cry タンパク質の殺ボウフラ活性

16:54 ○根来綾子[1]，江草佳務[1]，上林智仁[1]，早崎君江[2]，岡本成平[2]，東　慶直[1,2]，早川　徹[3]，武部　聡[1,2]（[1]近畿大・生物理工，[2]近畿大・院・生物理工，[3]岡大・院・自然科学）

p16〜p20 発表者の接続時間 17:05〜17:15

2B21p16　生物に必須の tRNA-t^{6}A 修飾は *Thermus thermophilus* では必須ではない

17:15 ○川端祐佳[1]，澤田泰平[1]，北原一正[1]，小野瀬晃由[1]，星野貴之[2]，中村　顕[2]（[1]筑波大生命環境科学研究科，[2]筑波大生命環境系）

2B21p17　トランスポゾンを用いた *Lactobacillus casei* IGM393 株における免疫応答に関わる分子の検討

17:26 桝田和彌[1]，○石浜　峻[2]，金子真理恵[2]，冨田　理[3]，加藤光徳[2]，朝川陽介[2]，梶川揚申[2]，岡田早苗[2]，朝倉　宏[1]，五十君靜信[1]（[1]国立医薬品食品衛生研究所，[2]東農大応生科・化学，[3]農研機構食品総合研究所）

2B21p18　高温適応によって獲得した大腸菌耐熱化変異株の解析

17:37 ○加藤薫平[1]，石井あやな[1]，村田正之[1]，高坂智之[2]，山田　守[1]（[1]山口大学大学院 医学系研究科，[2]山口大学 農学部）

2B21p19　*Corynebacterium glutamicum* NCgl1221 メカノセンシティブチャネルの細胞内局在

17:48 ○小槌龍介，井上雄介，岩井伯隆，和地正明（東工大院・生命理工）

2B21p20　Evolution, distribution and structure of the carbazole degradation gene cluster in novel carbazole-degrading bacteria

17:59 ○Felipe VEJARANO[1]，Tatsuya MIKAMI[1]，Jun MATSUZAWA[1]，Mitsuru NUMATA[2]，Akira HOSOYAMA[2]，Atsushi YAMAZOE[2]，Chiho SUZUKI-MINAKUCHI[1]，Kazunori OKADA[1]，Hideaki NOJIRI[1]（[1]The Univ. of Tokyo，[2]NITE）

B41 会場　午前の部（9:22〜11:54）

微生物―遺伝子－発現制御，トランスクリプトーム―

a03〜a05 発表者の接続時間 9:12〜9:22

2B41a03　病原性真菌 *Cryptococcus neoformans* の PHO 遺伝子の発現制御

9:22 ○西澤正文[1]，兼崎　友[2]，吉川博文[3]，東江昭夫[4]（[1]慶應大・医・微生物，[2]東農大・生物資源ゲノム解析センター，[3]東農大・応生科，[4]千葉大・真菌医学研究センター）

2B41a04　黄麹菌 *Aspergillus oryzae* のセリンタイプカルボキシペプチダーゼ遺伝子のイントロン残存の配列依存性の解析

9:33 ○石田　健，久保島恵，上野絢子，森田寛人，前田　浩，岡本絢子，竹内道雄，山形洋平（東京農工大　応生科）

2B41a05　冬虫夏草（*Cordyceps militaris*）の感染過程における各種トランスクリプトーム解析

9:44 ○鈴木智大[1]，道羅英夫[1]，崔　宰熏[2]，加藤竜也[1,2]，朴　龍洙[1,2,4]，阿部伸一[3]，佐伯　潤[3]，平井浩文[1,2]，河岸洋和[1,2,4]（[1]静大・グリーン研，[2]静大農・応生化，[3]にちはら総研，[4]静大院・創造）

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

2B41a06　コリネ型細菌における ECF シグマ因子 SigE のイソブタノール応答性発現制御機構

10:05 辻本敏博[1]，○豊田晃一[2]，寺本陽彦[2]，乾　将行[1,2]（[1]奈良先端大・バイオ，[2]RITE）

2B41a07　コリネ型細菌における転写因子 AraR によるアラビノース応答制御機構

10:16 ○久下貴之[1,2]，寺本陽彦[2]，乾　将行[1,2]（[1]奈良先端大・バイオ，[2]RITE）

2B41a08　コリネ型細菌 RNase III による細胞分裂制御

10:27 ○前田智也[1]，田中裕也[1]，竹本訓彦[1]，乾　将行[1,2]（[1]RITE，[2]奈良先端大・バイオ）

2B41a09　コリネ型細菌における RNase J によるリジン生合成経路遺伝子の発現制御解析

10:38 ○濱本　渚[1]，田中裕也[2]，竹本訓彦[2]，乾　将行[1,2]（[1]奈良先端大・バイオ，[2]RITE）

2B41a10　コリネ型細菌における *dnaE* の校正修復機能の解析

10:49 ○小川昌規[1]，乾　将行[1,2]（[1]RITE，[2]奈良先端大・バイオ）

a11〜a14 発表者の接続時間 11:00〜11:10

2B41a11　*Corynebacterium glutamicum* RNase E/G ファミリー酵素の mRNA 認識機構の解析
11:10　○遠藤　諭，前田智也，岩井伯隆，和地正明（東工大院生命理工）

2B41a12　プラスミドと宿主染色体由来 MvaT 様因子のヘテロ二量体形成機構
11:21　○川妻孝平[1]，水口(鈴木)千穂[1]，寺田　透[2]，藤本　瑞[3]，岡田憲典[1]，野尻秀昭[1]（[1]東大・生物工学セ，[2]東大・農・応生工，[3]農生資研）

2B41a13　大腸菌 DNA 結合性転写因子 FimZ による定常期細胞の伸展化機構
11:32　○小川綾乃[1]，石浜　明[1,2]，山本兼由[1,2]（[1]法政大・理工・生命科学，[2]法政大・ナノテクセンター）

2B41a14　*Bifidobacterium longum* NCC2705 株における線毛関連遺伝子の破壊
11:43　○高橋真裕子[1]，滝口裕加[1]，野村　泉[2]，鈴木　徹[2]（[1]岐阜大学応用生物，[2]岐阜大学院連農）

B41 会場　午後の部（14:22〜17:59）

微生物―遺伝子ー発現制御，トランスクリプトーム―

p03〜p05 発表者の接続時間 14:12〜14:22

2B41p03　糸状菌 *Trichoderma reesei* におけるセロビオース応答性セルラーゼ誘導機構の解明
14:22　○会田宏樹[1]，平沢大樹[1]，新田美貴子[2]，塩屋幸樹[1]，志田洋介[1]，小笠原渉[1]（[1]長岡技科大・生物，[2]科学技術振興機構）

2B41p04　糸状菌 *Trichoderma reesei* における pH 応答転写調節因子 PacC の機能解析
14:33　○平沢大樹，会田宏樹，塩屋幸樹，志田洋介，小笠原渉（長岡技科大生物）

2B41p05　*Trichodema reesei* におけるセルラーゼ生産性に関与する推定 MFS トランスポーター 3405 の機能解析
14:44　○吉澤和将[1]，谷口大樹[1]，古川隆紀[2]，志田洋介[1]，小笠原渉[1]（[1]長岡技科大　生物，[2]エジンバラ大学）

p06〜p10 発表者の接続時間 14:55〜15:05

2B41p06　*Aspergillus oryzae* 金属プロテアーゼ(ADAM)遺伝子欠損が細胞壁と遺伝子発現に及ぼす影響
15:05　○小林拓嗣[1]，前田　浩[1]，古崎利紀[2]，石井一夫[2]，有江　力[2]，竹内道雄[1]，山形洋平[1]（[1]東京農工大院・応生科，[2]東京農工大・農学系ゲノム人材育成プログラム）

2B41p07　*Aspergillus aculeatus* dipeptidyl peptidase IV のストレス応答に関する解析
15:16　○遊亀翔太，國武絵美，谷　修治，炭谷順一，川口剛司（阪府大院・生環科）

2B41p08　超好熱菌 *Thermococcus kodakarensis* 低温誘導機構
15:27　○西川　諒[1]，籠谷さやか[1]，Sahara Tatit Novi[1]，秀瀬涼太[1]，今中忠行[2]，藤原伸介[1]（[1]関学大院理工，[2]立命館大生命科学）

2B41p09　病原糸状菌 *Aspergillus fumigatus* の胞子トランスクリプトーム解析から明らかになった低温培養着生胞子に特異的な二次代謝遺伝子クラスター
15:38　○萩原大祐，酒井香奈江，亀井克彦，五ノ井透，川本　進（千葉大学 真菌センター）

2B41p10　*Shewanella oneidensis* の電位応答のトランスクリプトーム解析
15:49　○廣瀬篤弥，高妻篤史，渡邉一哉（東京薬科大生命科学）

p11〜p15 発表者の接続時間 16:00〜16:10

2B41p11　メタノール酵母における 2 つの細胞表層ストレスセンサーの生理機能
16:10　○大澤　晋，由里本博也，阪井康能（京都大院農・応用生命科学）

2B41p12　メチロトローフ酵母における転写因子 Hap 複合体の分子機能解析
16:21　○小田沙織，由里本博也，阪井康能（京大院農）

2B41p13　転写産物の安定化によるモノカルボン酸輸送体遺伝子 JEN1 のグルコース抑制の遅延
16:32　○竹越祐太郎，松本耕助，五味勝也，新谷尚弘（東北大院農）

2B41p14　光センサー型転写調節蛋白質 LitR の機能に関与するアミノ酸残基の同定とその立体構造の決定
16:43　見世　光，丸山貴史，萩原健太，上田賢志，○高野英晃（日大生資科・生命セ）

2B41p15　*Burkholderia multivorans* における光誘導的な遺伝子発現に関わる ECF 型シグマ因子の役割
16:54　○角　　悟，上田賢志，高野英晃（日大生資科・生命セ）

p16〜p19 発表者の接続時間 17:05〜17:15

2B41p16　*Streptomyces griseus* 由来 small non-coding RNA の過剰発現は異種 *Streptomyces* 属放線菌の増殖の低下と二次代謝の活性化を引き起こす
17:15　○手塚武揚，大西康夫（東大院農生科・応生工）

2B41p17　希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* における胞子形成制御遺伝子 *ssgM* の機能解析
17:26　○安久都卓哉，手塚武揚，大西康夫（東大院農生科・応生工）

2B41p18　放線菌 *Actinoplanes missouriensis* の胞子嚢開裂に必要な遺伝子の RNA-Seq 解析による探索
17:37　○安田理沙，毛利佳弘，手塚武揚，大西康夫（東大農）

2B41p19　放線菌 *Streptomyces rochei* における抗生物質生産制御カスケードの解析
17:48　○岩國美由季，鈴木敏弘，佐々木浩晃，山本章治，木梨陽康，荒川賢治（広島大院・先端研）

B33 会場　午前の部（9:11〜11:54）

環境―バイオマス，バイオマス変換，バイオ燃料，バイオ化成品―

a02〜a05 発表者の接続時間 9:01〜9:11

2B33a02　海洋バイオマス資化酵母の合成生物学的育種
9:11　○佐々木勇輔[1,2,3]，高木俊幸[2,3]，森坂裕信[2,3]，黒田浩一[2,3]，植田充美[2,3]（[1]京大院・総合生存，[2]京大院農・応用生命，[3]JST, CREST）

2B33a03　シュガープラットホーム創製に向けた *Clostridium cellulovorans* の分子育種
9:22　○稲森貴子，石高彰人，油屋駿介，森坂裕信，黒田浩一，植田充美（京大院農）

2B33a04　メカノセンシティブチャネル遺伝子のリジン生産菌への導入効果
9:33　○三井岳志，小西智之，橋本賢一，矢部　勇，川崎　寿（東電大・院・工）

2B33a05　*Corynebacterium alkanolyticum* 由来キシロシダーゼとキシロオリゴ糖トランスポーターの機能解析
9:44　○渡邉　彰[1]，平賀和三[1]，須田雅子[1]，湯川英明[1]，乾　将行[1,2]（[1]RITE，[2]奈良先端大・バイオ）

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

2B33a06　コリネ型細菌が有するシキミ酸トランスポーターの同定とその発現制御解析
10:05　○久保田健[1]，田中裕也[1]，竹本訓彦[1]，平賀和三[1]，湯川英明[1]，乾　将行[1,2]（[1]RITE，[2]奈良先端大・バイオ）

2B33a07　コリネ型細菌による芳香族化合物前駆体シキミ酸の高生産

10:16 ○小暮高久[1]，須田雅子[1]，平賀和三[1]，乾　将行[1,2]（[1]RITE，[2]奈良先端大・バイオ）

2B33a08　コリネ型細菌による 1,3- ジヒドロキシアセトンを介したグリセロール生成経路の同定

10:27 ○城島　透[1]，　猪狩尊史[1]，　郡司　渉[1]，　茂木康浩[1]，須田雅子[1]，湯川英明[1]，乾　将行[1,2]（[1]RITE，[2]奈良先端大・バイオ）

2B33a09　カルビン回路の新機能：通性独立栄養細菌 *Ralstonia eutropha* における糖質由来脱炭酸炭素の固定とポリ(3-ヒドロキシブタン酸)生合成への再利用

10:38 清水理恵[1]，　傳寶雄大[2]，　中山泰宗[2]，　馬場健史[2]，中村　聡[1]，福崎英一郎[2]，○福居俊昭[1]（[1]東工大院生命理工，[2]阪大院工）

2B33a10　分裂酵母プロテアーゼ遺伝子多重破壊株による 3-ヒドロキシプロピオン酸の高生産

10:49 ○陶山明子[1]，漆原正浩[2]，竹川　薫[1]（[1]九大院・農・生命機能，[2]旭硝子(株)）

a11〜a14 発表者の接続時間 11:00〜11:10

2B33a11　産業用酵母のゲノムシャッフリングによる高温及び酸耐性の付与と高効率キシロース発酵

11:10 ○岩本　遼，猪熊健太郎，蓮沼誠久，近藤昭彦（神戸大学）

2B33a12　*Thermobifida fusca* 由来糖質分解酵素から成る人工セルロソームによるバイオマス分解

11:21 ○篠田　優[1]，　本田紘樹[1]，　草野大貴[1]，　黒崎正浩[1]，平野勝紹[1]，春木　満[1]，平野展孝[1,2]（[1]日大・工・生命応化，[2]JST・PRESTO）

2B33a13　アミラーゼ表層提示酵母によるシアノバクテリア *Arthrospira platensis* からの高濃度エタノール生産

11:32 ○藍川晋平[1,2]，　猪熊健太郎[3]，　佐々木建吾[3]，　蓮沼誠久[2,3]，近藤昭彦[1,2]（[1]神戸大院・工，[2]JST・CREST，[3]神戸大・自科）

2B33a14　組み換え大腸菌を用いた非天然芳香族アミン類の発酵生産

11:43 ○桝尾俊介，周　勝敏，高谷直樹（筑波大生命環境）

B33 会場　午後の部（14:00〜17:48）

環境―バイオマス，バイオマス変換，バイオ燃料，バイオ化成品―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

2B33p01　組換え大腸菌を用いた高光学活性(*R*)-3-ヒドロキシブタン酸の生産における CoA 転移酵素高活性変異体の効果

14:00 ○三吉大地[1]，　瀬戸　望[1]，　松本謙一郎[1]，　大井俊彦[1]，田口精一[1,2]（[1]北大院・工，[2]JST-CREST）

2B33p02　組換え大腸菌を利用した高光学純度(*S*)-3-ヒドロキシブタン酸の生産

14:11 瀬戸　望[1]，○大井俊彦[1,2]，松本謙一郎[1]，田口精一[1,2]（[1]北大院・工，[2]JST-CREST）

2B33p03　大腸菌転写制御因子欠失株を用いた P(LA-co-3HB)の高生産化

14:22 ○児玉　悠[1]，　門屋亨介[1,2]，　松本謙一郎[1]，　田口精一[1,2]（[1]北大院・工，[2]JST-CREST）

2B33p04　組み換え体大腸菌で生産する資源循環型微生物ポリマーの高生産化に関与する新規遺伝子の探索

14:33 ○門屋亨介[1,2]，　松本謙一郎[1]，　大井俊彦[1]，　田口精一[1,2]（[1]北大院・工，[2]JST-CREST）

2B33p05　Production of poly(lactate-*co*-hydroxybutyrate) from *Miscanthus*-derived sugars

14:44 ○Camila UTSUNOMIA[1]，　Jian SUN[1]，Ken'ichiro MATSUMOTO[1]，Toshihiko OOI[1,2]，Seiichi TAGUCHI[1,2]（[1]Grad. Sch. Chem. Sci. Eng., Hokkaido Univ., [2]JST-CREST）

p06〜p10 発表者の接続時間 14:55〜15:05

2B33p06　Characterization of the substrate specificity of a poly(enriched lactate-*co*-3-hydroxybutyrate)depolymerase

15:05 ○Jian SUN[1]，　Ken'ichiro MATSUMOTO[1]，Ryosuke KADOYA[1]，　Yuta TABATA[2,3]，　Toshihiko OOI[1,4]，Hideki ABE[2,3]，Seiichi TAGUCHI[1,4]（[1]Grad. Sch. Eng., Hokkaido Univ., [2]IGSSE. Tokyo Inst. of Tech., [3]RIKEN-CSRS, [4]JST-CREST）

2B33p07　組換え大腸菌によるグリコール酸ベースポリマー合成とポリマーの物性評価

15:16 ○平出幸和[1]，　斯波哲史[1]，　孫　健[1]，　大井俊彦[1]，田口精一[1]，松本謙一郎[1,2]（[1]北大院・工，[2]JST・さきがけ）

2B33p08　中鎖脂肪酸を切り出すチオエステラーゼ遺伝子と アシルキャリアープロテイン遺伝子の同時導入による *Chlamydomonas reinhardtii* の 脂肪酸の炭素鎖長の改変

15:27 ○稲葉　遊，中東憲治，伊藤卓朗，冨田　勝（慶応大学先端生命研）

2B33p09　木質バイオマスのエーテル型リグニン－糖結合構造の解析

15:38 ○西村裕志[1]，神谷明宏[2]，片平正人[2]，渡辺隆司[1]（[1]京都大生存研，[2]京都大エネ理工研）

2B33p10　*Trichoderma reesei* に存在するソホロース合成能をもつ *β*-glucosidase の特定と解析

15:49 ○郭　博洋，野崎功一，水野正浩，天野良彦（信州大院・生命機能・ファイバー工学）

p11〜p15 発表者の接続時間 16:00〜16:10

2B33p11　*Trichoderma reesei* における 2 種類の *β*-glucosidase 遺伝子破壊株の作製とセルラーゼ生産における影響

16:10 ○畠中理志，野崎功一，郭　博洋，水野正浩，天野良彦（信州大院・理工）

2B33p12　超好熱細菌由来 sHSP 遺伝子導入による発酵細菌の耐熱性強化

16:21 ○徳島　梓，原田尚志，岡本賢治，簗瀬英司（鳥大院生応工）

2B33p13　Na^+/H^+ antiporter 遺伝子導入による発酵細菌の酢酸耐性強化

16:32 ○大戸裕史，滝上はる香，原田尚志，岡本賢治，簗瀬英司（鳥大院生応工）

2B33p14　*Zymomonas mobilis* の菌体外酵素生産活性化因子の解析

16:43 ○山本知慧，　原田尚志，　岡本賢治，　簗瀬英司（鳥大院生応工）

2B33p15　C5・C6 糖並行発酵性 *Zymobacter palmae* の発酵転換による 2,3-Butandiol 高効率生産

16:54 ○久本晴加，吉岡優希，原田尚志，岡本賢治，簗瀬英司（鳥取大院生応工）

p16〜p18 発表者の接続時間 17:05〜17:15

2B33p16　SUMO の発現は複数の発酵阻害物による酵母の増殖遅延を改善する

17:15 ジャヤコディーラヒル[1,2]，　門脇真史[1]，　柘植圭介[3]，堀江健太[1]，鈴木章弘[1,2]，林　信行[1,2]，○北垣浩志[1,2]（[1]佐賀大農，[2]鹿児島大農，[3]佐賀県工業技術センター）

2B33p17　ブタノール生産菌 *Clostridium beijerinckii* を宿主とした *Clostridium cellulovorans* のセルロソーム遺伝子クラスターの発現

17:26 ○平松愛子[1]，　黒田浩一[2]，　植田充美[2]，　田丸　浩[1,3,4]，三宅英雄[1,3,4]（[1]三重大学院・生資，[2]京大院・農・応用生命，[3]三重大・生命支セ，[4]三重大・新産業）

2B33p18　キシリトール資化性を導く変異型 *Saccharomyces cerevisiae* 株の分離とその特徴づけ

17:37 谷　龍典[1]，　田口久貴[1]，　藤森一浩[2]，　佐原健彦[2]，扇谷　悟[2]，鎌形洋一[2]，○赤松　隆[1]（[1]崇城大･生物生命，[2]産総研･生物プロセス）

C31 会場　午前の部（9:00〜11:54）

環境―環境保全，浄化技術工学，バイオレメディエーション―

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

2C31a01　カリウム輸送タンパクの高発現による大腸菌セシウム取り込み能の向上
9:00 ○金田祥宜[1]，加藤創一郎[1,2,3]，北川　航[1,2]，寺島美亜[1]，浅野行蔵[1]，鎌形洋一[1,2]（[1]北大院・農，[2]産総研・生物プロセス，[3]東大・先端研）

2C31a02　非放射性同位体を用いたきのこ・野菜等におけるセシウムの挙動解析
9:11 ○本條秀子，中山和美（東京電力福島復興本社）

2C31a03　脂肪酸合成経路を介した糖および炭酸ガスからの共重合ポリエステルの生合成に関する研究
9:22 ○脇田　和[1]，外村彩夏[1]，西村綾乃[2]，柘植丈治[3]，福居俊昭[4]，田中賢二[5]，松崎弘美[1,2]（[1]熊本県立大院環境共生，[2]熊本県立大環境共生，[3]東工大院総理工，[4]東工大院生命理工，[5]近大産理工）

2C31a04　耐酸性乳酸菌 *Lactobacillus acetotolerans* HT の乳酸脱水素酵素遺伝子のクローニングと生分解性共重合ポリエステルの生合成
9:33 ○後藤早希[1]，外村彩夏[1]，田口精一[2]，松本謙一郎[2]，田中賢二[3]，松崎弘美[1,4]（[1]熊本県大院環境共生，[2]北大院工，[3]近大産理工，[4]熊本県大環境共生）

2C31a05　組換え大腸菌による糖からの生分解性共重合ポリエステルの生合成
9:44 ○外村彩夏[1]，西村綾乃[2]，後藤早希[1]，脇田　和[1]，田口精一[3]，松本謙一郎[3]，柘植丈治[4]，田中賢二[5]，松崎弘美[1,2]（[1]熊本県大院環境共生，[2]熊本県大環境共生，[3]北大院工，[4]東工大院総理工，[5]近大産理工）

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

2C31a06　アナモックスリアクターのパイロシーケンス解析
10:05 ○石川　秀，多田羅昌浩，上野嘉之（鹿島技術研究所）

2C31a07　A rapid soil genesis and microbiota succession on recently exposed volcanic deposits in Miyake-jima, Japan
10:16 ○Yong GUO[1]，Akinori HIRANO[1]，Ken HOSOKAWA[1]，Reiko FUJIMURA[1]，Yoshinori SATO[2]，Tomoyasu NISHIZAWA[1]，Takashi KAMIJO[3]，Hiroyuki OHTA[1]（[1]Ibaraki Univ. College of Agriculture, [2]National Research Institute for Cultural Properties Tokyo, [3]Faculty of Life and Environmental Science, Univ. of Tsukuba）

2C31a08　海洋生物資源の時空間摂動を評価する環境代謝分析アプローチ
10:27 ○菊地　淳[1,2,3]，伊達康博[1,2]，朝倉大河[1,2]，坂田研二[1]，伊藤研吾[1,2]，魏　菲菲[1]（[1]理研 CSRS，[2]横市院･生命医，[3]名大院･生命農）

2C31a09　環境微生物と対流を用いた新規水処理装置の開発
10:38 ○永野陽祐[1]，向　真樹[1]，ディネシュアディカリ[1]，篠崎彰大[1]，荒木希和子[1]，久保　幹[1]，平井敏治[2]，窪喜千恵美[3]，今井　浩[3]（[1]立命館大学，[2]メタルファンテック，[3]ワコール）

2C31a10　鉄腐食性硝酸塩還元菌 *Prolixibacter* sp. MIC1-1 の鉄腐食能の解析
10:49 ○飯野隆夫[1]，伊藤公夫[2]，若井　暁[3]，鶴丸博人[3]，大熊盛也[1]，原山重明[4]（[1]理研 BRC-JCM，[2]新日鐵住金･先端技研，[3]NITE・NBRC，[4]中大・理工）

a11〜a14 発表者の接続時間 11:00〜11:10

2C31a11　最確数法・制限酵素断片長多型解析法の活性汚泥中の微生物群集解析への利用
11:10 ○堀西直人[1]，赤星裕美[2]，渡邊克二[1,2]（[1]福岡工業大学大学院，[2]福岡工業大学）

2C31a12　油脂高分解処理開放系での投入菌株の分別識別化・半定量の試み
11:21 ○平野達也[1]，稲垣泰治[1]，倉根隆一郎[1]，稲川顕嗣[2]（[1]中部大学，[2]シーシーアイ株式会社）

2C31a13　嫌気・好気環境下での石油汚染土壌のバイオレメディエーションにおける菌叢解析
11:32 ○酒井晴奈，向　真樹，アディカリディネッシュ，荒木希和子，久保　幹（立命館大）

2C31a14　*Pseudomonas* sp. HI-70 株の大環状アルコール分解系の解析
11:43 ○佐藤ゆう，岩木宏明，長谷川喜衛（関西大 化学生命工）

C31 会場　午後の部（14:11〜17:59）

環境―環境保全，浄化技術工学，バイオレメディエーション―

p02〜p05 発表者の接続時間 14:01〜14:11

2C31p02　*Pseudokirchneriella subcapitata* に対する銀ナノ粒子の毒性
14:11 ○川瀬俊悟，神山明穂，高橋祐樹，長坂征治（東洋大学）

2C31p03　銀ナノ粒子を用いた可視光応答型光半導体の病原細菌に対する抗菌効果
14:22 ○田尻晋太郎[1]，宮崎　愛[1]，伊東謙吾[2]，田中賢二[1]（[1]近大産理工生環科，[2]伊都研究所）

2C31p04　固体表面の防カビ性能を評価するための新規なバイオアッセイ
14:33 ○小田　忍[1]，竹内　侑[1]，黒澤　渉[1]，水谷　勉[2]，木村　誠[2]，今井俊夫[3]，山口芳美[4]，大箸信一[1]（[1]金沢工大ゲノム研，[2]水谷ペイント(株)，[3]ニチハ(株)，[4](株)島田商会）

2C31p05　酸化あるいは還元作用を付与した各種溶媒あるいは雰囲気を基盤とする環境負荷低減技術の開発と応用
14:44 ○田村健治[1]，苅野　仁[2]，本田祐美[3]（[1]首都大・産技高専品川，[2](有)イオン化学，[3]環美健ライフ研）

p06〜p10 発表者の接続時間 14:55〜15:05

2C31p06　山形県米沢市の高活性型ポリ塩化ビフェニル分解細菌の単離と *bph* オペロン解析
15:05 ○太田茉莉紗[1,2]，高塚由美子[1]，櫻間晴子[1]，原富次郎[1]（[1]山形大院理工，[2]アプリザイム(株)）

2C31p07　講演取消

2C31p08　クロロフェノール分解菌 *Ralstonia pickettii* DTP0602 の後期分解遺伝子の解析
15:27 ○畢　貞，八田　貴（岡山理大工）

2C31p09　有機塩素系芳香族化合物ペンタクロロフェノール分解菌群 IK25 の機能解析
15:38 ○Yee Lii Mien[1]，沼田　充[2]，堀嵜允文[1]，細山　哲[2]，山副敦司[2]，八田　貴[3]，水口(鈴木)千穂[1]，岡田憲典[1]，山根久和[4]，野尻秀昭[1]（[1]東大･生物工学セ，[2]NITE，[3]岡山理大･工，[4]帝京大･バイオ）

2C31p10　微生物によるトリクロサンの除去
15:49 ○齋藤さや[1]，小森谷友絵[2]，吉野　悟[2]，坂本恵一[2]（[1]日大生産工(院)，[2]日大生産工）

p11〜p15 発表者の接続時間 16:00〜16:10

2C31p11　海洋由来の 1,4- ジオキサン分解性微生物
16:10 ○松井稜太郎[1]，椎葉　究[1]，鎌田泰彰[1]，榊原風太[2]，高木和広[2]（[1]東京電機大理，[2]農業環境技術研究所）

2C31p12　2,6-ジニトロフェノール分解菌 *Burkholderia* sp. KU-64 株の分離と分解系遺伝子の解析
16:21 ○小早　希，岩木宏明，長谷川喜衛（関西大 化学生命工）

2C31p13　*Sphingomonas bisphenolicum* AO1 株におけるビスフェノール A(BPA) 分解遺伝子の探索と BPA 分解能の安定化に向けた研究
16:32 ○中川直也[1]，木場　悟[1]，松村吉信[1,2]（[1]関西大学化学生命

工，[2]関西大学 ORDIST）

2C31p14　海洋性フタル酸ジエチルヘキシル分解菌の分離と分解系遺伝子の解析

16:43　◦小西健太，岩木宏明，長谷川喜衛（関西大　化学生命工）

2C31p15　放線菌 RHA1 株のビフェニル代謝に関与するタンパク質の新規同定と解析

16:54　◦愛宕祐基[1]，　福田雅夫[2]，　原　啓文[3]，　二見淳一郎[1]（[1]岡山大院・自科，[2]長岡技科大，[3]マレーシア工科大）

p16〜p19 発表者の接続時間 17:05〜17:15

2C31p16　Anaerobic Benzene-Degrading Mechanism of *Azoarcus* sp. DN11

17:15　◦YU ZHAI[1]，Chiho SUZUKI-MINAKUCHI[1]，Lii Mien Yee[1]，Yuki KASAI[2]，　Yoh TAKAHATA[3]，　Kazunori OKADA[1]，Hideaki NOJIRI[1]（[1]The Univ. of Tokyo, [2]Chuo Univ., [3]Taisei Corp.）

2C31p17　*Rhodococcus erythropolis* IAM1399 のヒ素耐性遺伝子群の機能解析

17:26　◦宮内啓介[1]，平田一真[1]，福田雅夫[2]，遠藤銀朗[1]（[1]東北学院大工，[2]長岡技大工）

2C31p18　ナメコ菌床栽培におけるゼオライトの放射性セシウム移行抑制効果

17:37　◦武井利之[1]，村松康行[2]（[1]福島県林研セ，[2]学習院大学）

2C31p19　生物学的処理および光触媒・boron-doped diamond 電極ハイブリッド式汚水浄化システムの構築とその殺菌性能および有機物分解能の評価

17:48　◦佐藤俊貴[1]，　落合　剛[2,3]，　森戸祐幸[4]，　藤嶋　昭[2,3]，鈴木智順[1,2]（[1]東理大・応用生物，[2]東理大・総研，[3]神奈川科学技術アカデミー，[4]ユーヴィックス株式会社）

C25 会場　午前の部（9:11〜12:05）

生物化学工学―ペプチド・タンパク質工学―

a02〜a05 発表者の接続時間 9:01〜9:11

2C25a02　Developing drug delivery and therapy platform using virus like particles displaying short chain fragment region and interleukin-2 against colon carcinoma

9:11　◦Vipin Kumar Deo，Tatsuya Kato，Park Enoch Y（Shizuoka Univ.）

2C25a03　細胞膜透過ペプチド：ポリヒスチジン(H16)の細胞内挙動の解析

9:22　◦小竹彩香，徳田佳久，河野　強，岩崎　崇（鳥取大農）

2C25a04　ポリヒスチジン(H16)修飾リポソームの開発と機能解析

9:33　◦品川松美，小竹彩香，河野　強，岩崎　崇（鳥取大農）

2C25a05　植物・酵母細胞に対するポリヒスチジンの細胞壁・細胞膜透過の解析

9:44　◦木村さやか，河野　強，薮田行哲，岩崎　崇（鳥取大農）

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

2C25a06　FT-IR ATR によるタンパク質三次構造変化の簡易定量化

10:05　鈴木克生，◦吉田洋一（宇部興産(株)）

2C25a07　蛍光レドックスプローブ Redoxfluor の高感度変異体の開発

10:16　◦北村万里[1]，寶関　淳[1,2]，阪井康能[1,2]（[1]京大院農，[2]京大・生理化学）

2C25a08　赤・遠赤色光スイッチ型 cAMP 合成酵素の開発

10:27　◦伏見圭司[1]，榎本　元[2]，池内昌彦[2]，成川　礼[1,3]（[1]静大・理学，[2]東大・教養，[3]JST・さきがけ）

2C25a09　部位特異的多箇所へのハロゲン化チロシン導入による新規タンパク質安定化法

10:38　◦大竹和正[1]，山口　純[1]，春木　満[2]，坂本健作[1]（[1]理化学研究所　ライフサイエンス技術基盤研究センター，[2]日大工）

2C25a10　アルギニン側鎖グアニジノ基に導入したフルオラス Boc 基(FBoc 基)の脱保護条件の検討

10:49　◦赤司里奈，稲津敏行（東海大工）

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

2C25a11　米 α-アミラーゼ由来ペプチドのアミノ酸置換による抗菌活性の増大とそれらの作用機構の解明

11:10　◦野本貴史，高橋清志，中道俊一，落合秋人，田中孝明，谷口正之（新潟大自然研）

2C25a12　納豆抽出物からのカチオン性抗菌ペプチド成分の調製とその特性解析

11:21　◦幡本晃太，亀田光裕，松嶋健太，落合秋人，田中孝明，谷口正之（新潟大自然研）

2C25a13　大腸菌細胞内発現系を用いた抗体融合タンパク質の効率化に関する研究

11:32　◦本間啓介[1]，　加藤晃代[1]，　兒島孝明[1]，　上田　宏[2]，中野秀雄[1]（[1]名大院生命農，[2]東工大資源研）

2C25a14　大腸菌無細胞/生細胞タンパク質発現系を用いたロシンジッパー付加による Fab 合成の効率化

11:43　◦福井貫介[1]，　山本広晃[1]，　加藤晃代[1,2]，　兒島孝明[1]，中野秀雄[1]（[1]名大院・生命農，[2](公財)科技財団）

2C25a15　大腸菌生細胞/無細胞発現系によるウサギモノクローナル抗体の作製

11:54　◦加藤晃代[1,2]，　橋村　大[2]，　永井里美[2]，　兒島孝明[2]，中野秀雄[2]（[1](公財)科技財団，[2]名大院生命農）

C25 会場　午後の部（14:00〜18:10）

生物化学工学―ペプチド･タンパク質工学，酵素工学･生物反応工学，その他―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

2C25p01　Long-time refolding による凝集性ニューロセルピンの調製

14:00　◦久留宮綾人，中村麻子，恩田真紀（大阪府大・理・生物科学）

2C25p02　コムギ無細胞合成系を基盤とした旨味/甘味受容体タンパク質の合成とモノクローナル抗体の作製

14:11　◦栄谷紘一[1]，　竹田浩之[1]，　小澤龍彦[2]，　村口　篤[2]，三坂　巧[3]，森下　了[4]，澤崎達也[1]（[1]愛媛大 プロテオサイエンスセンター，[2]富山大院医学薬学研究部，[3]東京大院農学生命科学研究科，[4]株式会社セルフリーサイエンス）

2C25p03　翻訳終結因子 RF-1 欠損大腸菌のタンパク質発現系および無細胞タンパク質合成系を利用したモノメチルリジンのヒストンタンパク質への部位特異的複数導入

14:22　◦高橋美穂子[1,2]，柳沢達男[1,3]，向井崇人[1,2]，佐藤　心[1,2]，若森昌聡[1,2]，白水美香子[1,2]，坂本健作[1,2]，梅原崇史[1,2,4]，横山茂之[2,3]（[1]理研CLST，[2]理研SSBC，[3]理研 横山構造生物学研，[4]さきがけ）

2C25p04　酵母シグナルペプチドライブラリからの *Phanerochaete chrysosporium* 由来エンドグルカナーゼ分泌シグナルの選択

14:33　◦森　昭博[1]，　原　翔一[1]，　菅原知宏[1]，　兒島孝明[1]，岩崎雄吾[1]，　河原崎泰昌[2]，　佐原健彦[3]，　扇谷　悟[3]，　中野秀雄[1]（[1]名大院・生命農・生命技術，[2]静岡県大院生活健康・食栄，[3]産総研）

2C25p05　カイコ *N* 型 糖鎖付加経路改変に向けたカイコ内のヒト由来糖転移酵素発現に関する研究

14:44　◦加子夏未[1]，　加藤竜也[1,2]，　近藤幸子[3,4]，　矢木宏和[3]，加藤晃一[3,4,5]，朴　龍洙[1,2]（[1]静岡大学大学院農学研究科応用生物化学専攻，[2]静岡大学　グリーン科学技術研究所，[3]名古屋市立大学，[4]グライエンス，[5]自然科学研究機構・岡崎統合バイオサイエンスセンター）

p06〜p10 発表者の接続時間 14:55〜15:05

2C25p06　組換えカイコを用いた機能性タンパク質固定化シルクの開発

15:05 炭谷めぐみ，藤井-村松理香，朝岡 愛，皆葉正臣，渡辺裕文，中島健一，飯塚哲也，立松謙一郎，瀬筒秀樹，◦石橋 純（農生資研）

2C25p07 固定化パパインを用いたオリゴチロシンペプチドの合成

15:16 ◦三橋 純[1]，中山 勉[1,2]，奈良井朝子[2]（[1]日獣大院 獣生科，[2]日獣大 応生）

2C25p08 パパインを用いて合成した Tyr-Tyr とチロシナーゼの反応

15:27 ◦奈良井朝子[1]，工藤直翼[1]，堺 恵一[1]，三橋 純[2]，中山 勉[1,2]（[1]日獣大 応生，[2]日獣大院 獣生科）

2C25p09 *S. cerevisiae* 胞子の酵素カプセルとしての応用

15:38 ◦中西秀樹[1]，SHI Libing[1]，ZHAO Qiang[1]，舘川宏之[2]，高 暁冬[1]（[1]江南大・生物工程，[2]東大院・農生科・応生化）

2C25p10 糖鎖の酵素合成技術

15:49 ◦柳原芳充，上田真澄（三洋化成工業）

p11〜p15 発表者の接続時間 16:00〜16:10

2C25p11 液面固定化システムによる糸状菌胞子の生産に対する疎水性樹脂の効果

16:10 ◦城戸良介，小田 忍，大箸信一（金沢工大ゲノム研）

2C25p12 油脂資化性酵母 *Meyerozyme guiliermondii* TY-89 の培養特性

16:21 ◦佐藤香子[1]，竹園 恵[1]，中島敏明[2]，茂野俊也[3]，小野寺正幸[1]（[1]新潟工大院生産開発工学，[2]筑波大院生命環境科学，[3]つくば環微研）

2C25p13 亜リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子を用いた抗生物質を利用しない微生物の選択的培養

16:32 ◦廣田隆一，神田圭輔，小野敏志，石田丈典，池田 丈，黒田章夫（広島大院・先端研）

2C25p14 培養器の気相環境に着目した新規微生物スクリーニングシステムの開発

16:43 ◦高橋将人，青柳秀紀（筑波大院・生命環境）

2C25p15 Baliosperumum montanum 由来ヒドロキシニトリルリアーゼの立体選択性および触媒効率の改変

16:54 ◦川原寛弘[1,2]，浅野泰久[1,2]（[1]富山県大工･生工研セ，[2]JST, ERATO）

p16〜p20 発表者の接続時間 17:05〜17:15

2C25p16 インフルエンザウイルスの高頻度変異タンパク質ヘマグルチニンに対するハイスループットな新規阻害剤スクリーニングの系の構築

17:15 ◦西岡良将[1]，山田純希[1]，三浦夏子[2]，重盛智大[1]，黒田浩一[1]，植田充美[1]（[1]京都大農，[2]アメリカ国立衛生研究所）

2C25p17 H5 亜型高病原性鳥インフルエンザウイルスの迅速診断キットの開発

17:26 ◦庄屋雄二[1]，石田有希子[1]，豊浦雅義[1]，丸 勇史[1]，吉國義明[1]，内田裕子[2]，西藤岳彦[2]，金 武祚[1]（[1](株)ファーマフーズ，[2](独)農研機構・動衛研）

2C25p18 *Ralstonia* sp.NT-80 由来エステラーゼの部位特異的アミノ酸置換と機能解析

17:37 ◦久保田和貴，太田友彦，岩間祐介，並木謙太，月村 亘，赤沼元気，石塚盛雄（中央大学）

2C25p19 細胞増殖抑制活性を有する非天然アミノ酸含有ジペプチド誘導体の構造と活性との相関

17:48 ◦田村 丹[1]，岩崎 崇[2]，森 信寛[2]，有馬二朗[2]（[1]鳥取大院農，[2]鳥取大農）

2C25p20 *Bacillus* sp. TB-90 由来ウリカーゼ高活性化変異体 P287G の構造機能解析

17:59 ◦林 祐太[1]，伊藤貴文[1]，西矢芳昭[2]，岸本高英[3]，日ビ隆雄[1]（[1]福井県大生物，[2]摂南大理工，[3]東洋紡敦賀バイオ）

C22 会場 午前の部（9:00〜12:05）

酵素—タンパク質・ペプチド代謝関連酵素，アミノ酸代謝関連酵素—

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

2C22a01 シイタケ由来菌体外酸性プロテアーゼ遺伝子のクローニング

9:00 ◦福田泰久，岩永卓也，松下朋加，寺下隆夫，白坂憲章（近大農）

2C22a02 膵島分離に用いる *Clostridium histolyticum* 由来の臨床用組換え neutral protease の調製と，新規特異的基質の設計

9:11 ◦前田 浩[1,2]，村山和隆[3]，渡邉君子[1]，後藤昌史[1,4]，山形洋平[1,2]（[1]東北大学 NICHe，[2]東京農工大学農，[3]東北大学医工，[4]東北大学医）

2C22a03 カルパインの基質切断部位の特異性解明に向けた網羅的解析

9:22 ◦大内史子[1]，進藤真由美[2]，秦 勝志[1]，小野弥子[1]，反町洋之[1]（[1]都医学研・カルパイン PJ，[2]都医学研・基盤技術研究センター）

2C22a04 筋特異的カルパイン CAPN3 の分子間相補による活性化

9:33 ◦小野弥子[1]，進藤真由美[1]，土井奈穂子[1]，北村ふじ子[1]，Gregorio Carol C.[2]，反町洋之[1]（[1]公財・東京都医学総合研究所，[2]アリゾナ大学医学部）

2C22a05 アンギオテンシン変換酵素 2 基質の開発と応用

9:44 ◦高橋砂織[1]，畠 恵司[1]，熊谷久美子[2]（[1]秋田県総食研，[2](株)ペプチド研）

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

2C22a06 Clan PA に属する Exopeptidase family S46 の構造機能相関の解明

10:05 ◦鈴木義之[1]，阪本泰光[2]，田中信忠[3]，小笠原渉[1]（[1]長岡技科大生物，[2]岩手医大薬学，[3]昭和大薬学）

2C22a07 米ぬか由来の歯周病菌プロリルトリペプチジルペプチダーゼ阻害タンパク質

10:16 ◦安形博菜[1]，西村 仁[1]，中嶋義隆[1]，伊藤 潔[2]，芳本 忠[1]（[1]摂南大理工，[2]摂南大薬）

2C22a08 エリンギ由来セリンペプチダーゼ：特定の非触媒ドメイン残基の酸化と変異がアミノリシス活性を変える

10:27 ◦東海彰太[1]，余米良介[2]，森 信寛[2]，有馬二朗[2]（[1]鳥取大院農，[2]鳥取大農）

2C22a09 D-アミノ酸アミド加水分解酵素の構造と誤作動 " ペプチド結合形成能 " との相関

10:38 ◦宮谷一紗，森 信寛，有馬二朗（鳥取大農）

2C22a10 ヒト γ-グルタミルトランスペプチダーゼ(GGT)の反応機構依存的阻害剤 －活性回復を指標とした基質特異性の評価－

10:49 ◦尾崎文音，李 春杰，渡辺文太，平竹 潤（京大化研）

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

2C22a11 *Lactobacillus otakiensis* 由来 D-分岐鎖アミノ酸ラセマーゼの性質と生体内での役割

11:10 ◦前田純平[1]，牟田口祐太[2]，清水泰博[1]，大島敏久[3]，土居克実[1]（[1]九大院・生資環，[2]秋田県大・生資科，[3]大工大・工）

2C22a12 微生物における真核生物型セリンラセマーゼの分布と生化学的解析

11:21 ◦窪田高秋，島村 繁，小林 徹，出口 茂（海洋研究開発機構）

2C22a13 セリンラセマーゼが触媒する D-セリンデヒドレーション反応の触媒機構

11:32 ◦松岡 舞, 伊藤智和, 邊見 久, 吉村 徹（名大院生命農）

2C22a14 Volvox 目緑藻における Alanine racemase の存在

11:43 ◦二重作和宏[1]，小田真弓[1]，谷川 実[1]，西村克史[1,2]（[1]日大理工，[2]日大短大）

2C22a15 緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* 由来アラニンラセ

マーゼ遺伝子のクローニングと発現
11:54 ○平戸祐喜[1], 佐久田綾[1], 小田真弓[1], 谷川　実[1], 西村克史[1,2]（[1]日大理工, [2]日大短大）

C22 会場　午後の部（14:11〜17:59）

酵素―アミノ酸代謝関連酵素―

p02〜p05 発表者の接続時間 14:01〜14:11

2C22p02　シイタケ（*Lentinula edodes*）における GABA 生成に関与する酵素について
14:11 ○岩本和子, 福田泰久, 白坂憲章（近畿大農応生化）

2C22p03　好熱好酸性古細菌 *Sulfolobus tokodaii* シスタチオニン γ-シンターゼ基質複合体の X 線結晶解析
14:22 ○佐藤　暖[1], 川村あやか[1], 花田尚子[1], 山田哲也[2], 志波智生[1], 稲垣賢二[2], 原田繁春[1]（[1]京都工繊大院応生, [2]岡山大院環境生命）

2C22p04　高度好熱菌 *Thermus thermophilus* 由来のホモイソクエン酸脱水素酵素の基質・補酵素複合体の結晶構造
14:33 ○高橋賢人, 富田武郎, 葛山智久, 西山　真（東大生物工学セ）

2C22p05　NAD 生合成経路 NadA/NadB/NadC 複合体の可能性
14:44 ○木村あすみ[1], 芦田裕之[2], 丸田隆典[1], 石川孝博[1], 澤　嘉弘[1]（[1]島根大学生資, [2]島根大学・総合科学研究支援セ）

p06〜p10 発表者の接続時間 14:55〜15:05

2C22p06　高度好熱菌 *Thermus thermophilus* におけるアミノ酸シグナル応答機構の解析
15:05 ○久保田哲央, 松下　創, 富田武郎, 葛山智久, 西山　真（東大生物工学セ）

2C22p07　超好熱・好酸性古細菌 *Sulfolobus acidocaldarius* におけるリジン生合成経路の調節機構
15:16 ○秋山　渚, 富田武郎, 葛山智久, 西山　真（東大生物工学セ）

2C22p08　リジン生合成酵素 LysY とキャリアタンパク質 LysW の複合体結晶構造解析
15:27 ○清水　哲, 富田武郎, 葛山智久, 西山　真（東大生物工学セ）

2C22p09　*Thermus thermophilus* 由来リジン生合成系酵素 LysK の結晶構造解析
15:38 ○藤田理美, 長谷部文人, CHO Su-Hee, 富田武郎, 葛山智久, 西山　真（東大生物工学セ）

2C22p10　紫外吸収分光法と X 線結晶構造解析によるリジル-tRNA 合成酵素と L-リジンの結合の解析およびその誘導適合機構に対する洞察
15:49 ○滝田禎亮[1], 三上文三[2], 井上國世[1]（[1]京大院・農・食生科, [2]京大院・農・応生科）

p11〜p15 発表者の接続時間 16:00〜16:10

2C22p11　超好熱アーキア *Thermococcus litoralis* DSM 5473 の L-アスパラギン酸オキシダーゼ：性質と反応速度論的解析
16:10 ○鷲尾　翼[1], 老川典夫[1,2]（[1]関大・理工学研究科, [2]関大・化学生命工）

2C22p12　*Pyrococcus horikoshii* 由来 L-アスパラギン酸オキシダーゼの基質認識
16:21 ○小川真梨奈[1], 芦田博之[2], 丸田隆典[1], 石川孝博[1], 澤　嘉弘[1]（[1]島根大学生物資源科学, [2]総合科学研究支援センター）

2C22p13　糸状菌 *Trichoderma viride* 由来 L-リシン α-オキシダーゼの異種発現系の構築と X 線結晶構造解析について
16:32 ○天野万里[1], 橋本義輝[2], 齋藤結希[2], 小林達彦[2], 近藤裕輝[3], 今田勝巳[3], 日下部均[4], 田村　隆[1], 稲垣賢二[1]（[1]岡山大院・環境生命, [2]筑波大院・生命環境, [3]大阪大院・理, [4](株)エンザイム・センサ）

2C22p14　*Rhodococcus* 属放線菌由来低基質特異性 L-アミノ酸酸化酵素の 遺伝子クローニングと発現系の構築
16:43 ○村上佳穂[1], 田港　静[1], 橋本義輝[2], 小林達彦[2], 山田美和[3], 礒部公安[3], 田村　隆[1], 稲垣賢二[1]（[1]岡山大院・環境生命, [2]筑波大院・生命環境, [3]岩手大・農）

2C22p15　海洋細菌 *Marinomonas mediterranea* 由来 L-リシン ε-オキシダーゼの 大腸菌発現系の構築
16:54 ○赤地周作[1], 松井大亮[2,3], 浅野泰久[2,3], 田村　隆[1], 稲垣賢二[1]（[1]岡山大院・環境生命, [2]富山県大工・生工研セ, [3]JST・ERATO）

p16〜p19 発表者の接続時間 17:05〜17:15

2C22p16　Arthrobacter globiformis 由来モノアミンオキシダーゼとヒスタミンオキシダーゼの基質認識
17:15 ○竹島大貴[1], 芦田裕之[2], 丸田隆典[1], 石川孝博[1], 澤　嘉弘[1]（[1]島根大 生資, [2]島根大 総合科学支援セ）

2C22p17　*Flavobacterium indicum* DSM 17447 の好熱性スレオニンデヒドロゲナーゼ：性質と反応速度論的解析
17:26 ○井上　淳[1], 老川典夫[1,2]（[1]関大・理工学研究科, [2]関大・化学生命工）

2C22p18　極限環境微生物のイソプロピルリンゴ酸脱水素酵素の耐圧性と熱安定性
17:37 ○濱島裕輝[1], 永江峰幸[2,3], 渡邉信久[2,3], 牧野　龍[1], 今井竹夫[1], 山田康之[1], 加藤千明[4]（[1]立教大学, [2]名古屋大学, [3]名大シンクロトロン, [4]海洋研究開発機構）

2C22p19　酵母の抗酸化酵素 N-acetyltransferase Mpr1 の立体構造に基づいた機能向上
17:48 ○平瀬冴華, 那須野亮, 渡辺大輔, 高木博史（奈良先端大バイオ）

E32 会場　午前の部（9:11〜12:05）

酵素―糖質代謝関連酵素―

a02〜a05 発表者の接続時間 9:01〜9:11

2E32a02　*Neurospora crassa* のフィトセラミド型中性スフィンゴ糖脂質合成に関わる新奇糖転移酵素 α-1,2-glucosyltransferase の同定
9:11 ○谷　泰史[1,2], 山下泰典[1], 三原久明[1]（[1]立命館大･生命科学･生物工, [2]立命館大・R-GIRO）

2E32a03　深海底泥由来 *Bacillus niacini* JAM F8 の hyaluronate lyase 遺伝子の同定
9:22 ○倉田淳志[1], 西村みどり[1], 西尾美紀[1], 平井晴奈[1], 小林　徹[2], 岸本憲明[1]（[1]近畿大農, [2]独立行政法人海洋研究開発機構）

2E32a04　*Cobetia* sp. 由来新規アルギン酸リアーゼに関する特性評価
9:33 ○藤瀬麻紗子[1], 八木寿梓[2], 鈴木宏和[1], 大城　隆[1]（[1]鳥取大院・工, [2]鳥取大・工・GSC）

2E32a05　*Shewanella* sp. 由来アルギン酸リアーゼに関する特性評価
9:44 ○八木寿梓[1], 藤瀬麻紗子[2], 森川祐未[3], 鈴木宏和[2], 大城　隆[2]（[1]鳥取大・工・GSC, [2]鳥取大院・工, [3]鳥取大・工）

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

2E32a06　ulvan 分解関連遺伝子のクローニングと機能解析
10:05 ○高橋　亮[1], 大西浩平[2]（[1]高知大院農, [2]高知大総研セ）

2E32a07　Characterization of the recombinant cellobiose 2-epimerase from *Rhodothermus marinus* and site-directed mutagenesis of the catalytic residues
10:16 ○Nongluck Jaito[1], Wataru Saburi[2], Hirohiko Muto[3], Takaaki Fujiwara[4], Min Yao[4], Haruhide Mori[2]（[1]Graduate School of Agriculture, Hokkaido Univ., [2]Research Faculty of Agriculture, Hokkaido Univ., [3]School of Agriculture, Hokkaido Univ., [4]Research Faculty of Advanced Life Science, Hokkaido Univ.）

2E32a08　*Rhodothermus marinus* JCM9785 由来セロビオース 2-エピメラーゼの基質結合部位周辺アミノ酸残基の機能解析

10:27　○武藤洋彦[1]，　佐分利亘[2]，　藤原孝彰[3]，　姚　閔[3]，森　春英[2]（[1]北海道大・農，[2]北海道大院・農，[3]北海道大院・先端生命）

2E32a09　基質結合タンパク質依存的 ABC トランスポーターによる多糖認識

10:38　○丸山如江[1]，　立石　彬[1]，　金子あい[2]，　三上文三[2]，橋本　渉[2]，村田幸作[1]（[1]摂南大理工，[2]京大院農）

2E32a10　*Paenibacillus* 属細菌由来細胞表層キチナーゼ ChiW の組換えタンパク質発現と細胞表層結合ドメインの応用

10:49　○伊藤貴文[1]，　日ビ隆雄[1]，　横内佳奈[1]，　高宮杏奈[1]，藤井　豊[2]，武藤　明[3]，木元　久[1]（[1]福井県大・生物資源，[2]福井大・医，[3]福井工大・工）

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

2E32a11　グライコシンターゼ反応を利用したシロイヌナズナ由来 β-グルコシダーゼ Bglu15 のアグリコン特異性の解析

11:10　○菅原好美[1]，　佐分利亘[1]，　谷口沙希[1]，　今井亮三[1,2]，森　春英[1]（[1]北海道大院農，[2]北海道農業研究センター）

2E32a12　メタゲノム由来 β- グルコシダーゼ Td2F2 の生成物阻害耐性メカニズムの解析

11:21　○松沢智彦[1]，内山　拓[2]，城　俊徳[2]，Jenny Manninen[2]，伏信進矢[2]，矢追克郎[1]（[1]産総研 生物プロセス，[2]東大院農）

2E32a13　*Clostridium thermocellum* 由来の糖質加水分解酵素 GH5 触媒モジュールの基質結合特性

11:32　並河有紀[1]，○苅田修一[1]，須藤真子[2]，市川俊輔[1]（[1]三重大地域イノベ，[2]三重大生資）

2E32a14　キチンオリゴ糖脱アセチル化酵素の活性ドメインの機能解析

11:43　○神澤沙耶[1]，　平野貴子[2]，　池嶋聖史[2]，　坂木祐太[1]，田代　充[3]，袴田　航[1,2]，西尾俊幸[1,2]（[1]日大院生資科・生物資源利用，[2]日大生資科・生命化，[3]明星大院理工科・化学）

2E32a15　*Bacillus subtilis* 由来 levansucrase による sucrose 類似体の合成および受容体特異性に関する研究

11:54　○渡辺基志，木村淳夫，奥山正幸（北大院農）

E32 会場　午後の部（14:11〜17:59）

酵素—糖質代謝関連酵素—

p02〜p05 発表者の接続時間 14:01〜14:11

2E32p02　1,2-β-オリゴグルカンホスホリラーゼを用いた直鎖状 1,2-β- グルカンの合成法の構築

14:11　○豊泉大幸[1]，　阿部紘一[1]，　中島将博[1]，　中井博之[2]，北岡本光[3]，田口速男[1]（[1]東理大院理工，[2]新潟大学院，[3]食総研）

2E32p03　*Listeria innocua* 由来 β-Glucosidase の機能解析と基質複合体の構造解析

14:22　○吉田龍太[1]，　中島将博[1]，　宮永顕正[2]，　中井博之[3]，北岡本光[4]，田口速男[1]（[1]東理大院理工，[2]東工大，[3]新潟大，[4]農研機構・食総研）

2E32p04　1,2-β-グルカナーゼの同定と機能解析

14:33　○阿部紘一[1]，　中島将博[1]，　豊泉大幸[1]，　山下哲郎[2]，中井博之[3]，北岡本光[4]，田口速男[1]（[1]東理大院・理工，[2]岩手大・農，[3]新潟大・農，[4]農研機構・食総研）

2E32p05　新規 1,2-β-グルカン分解酵素の単離同定及び機能解析

14:44　○田中信清[1]，　阿部紘一[1]，　中島将博[1]，　成川　恵[1]，北岡本光[2]，中井博之[3]，山下哲郎[4]，田口速男[1]（[1]東理大院理工，[2]農研機構・食総研，[3]新潟大農，[4]岩手大農）

p06〜p10 発表者の接続時間 14:55〜15:05

2E32p06　根粒菌 *Sinorhizobium* sp. 97507 株由来ソルボース脱水素酵素の大腸菌組換え発現及びその諸性質評価

15:05　○荒木俊雄，田村　隆，稲垣賢二（岡山大院・環境生命）

2E32p07　*Cellulomonas parahominis* 由来 L-リボースイソメラーゼの基質複合体構造解析および四量体形成の必要性の解明

15:16　○寺見優司[1]，　上地敬子[1]，　森本兼司[1]，　吉田裕美[2]，神鳥成弘[2]，高田悟郎[1]（[1]香川大希少糖研究セ，[2]香川大総合生命研究セ）

2E32p08　*Thermus thermophilus* HB8 由来トレハロースシンターゼの諸性質の検討

15:27　○岡本尚樹[1]，　寺見優司[1]，　上地敬子[1]，　神鳥成弘[2]，高田悟郎[1]（[1]香川大希少糖研究セ，[2]香川大総合生命研究セ）

2E32p09　*Bacillus selenitireducens* MLS10 由来カリウムイオン依存性トレハロースホスホリラーゼ

15:38　○仁平高則[1]，　斉藤由華[2]，　知久和寛[1]，　北岡本光[3]，大坪研一[1,2]，中井博之[1,2]（[1]新潟大・農，[2]新潟大院・自然科，[3]農研機構・食総研）

2E32p10　古細菌トレハラーゼの発現と諸性質の解析

15:49　○坂口政吉[1]，　下平　賢[1]，　石田慎之介[1]，　雨宮美虹[1]，本田翔太郎[1]，菅原康里[1]，小山文隆[1]，川喜田正夫[1,2]（[1]工学院大工，[2]東京都医学研）

p11〜p15 発表者の接続時間 16:00〜16:10

2E32p11　コヘシン－ドックリン相互作用解析を基にした *Clostridium cellulovorans* のセルロソームの評価

16:10　○長屋千晶[1]，　石川　岳[1]，　田中礼士[1]，　柴田敏行[1,2]，黒田浩一[3]，植田充美[3]，田丸　浩[1,2,4]，三宅英雄[1,2,4]（[1]三重大院・生資・生物圏生命，[2]三重大・新産業，[3]京大院・農・応用生命，[4]三重大・生命支セ）

2E32p12　*Clostridium cellulovorans* が生産するセルロソームを構成する酵素群の同定

16:21　○石川　岳[1]，長屋千晶[1]，江坂康平[3]，田中礼士[1]，柴田敏行[1,2]，森坂裕信[3]，　黒田浩一[3]，　植田充美[3]，　田丸　浩[1,2,4]，　三宅英雄[1,2,4]（[1]三重大院・生資・生物圏生命，[2]三重大・新産業，[3]京大院・農・応用生命，[4]三重大・生命支セ）

2E32p13　*Clostridium thermocellum* 由来セルロソーム二次骨格の機能解析

16:32　○平野勝紹[1]，　高橋祐介[1]，　田中清志[1]，　二瓶　哲[1]，白澤智行[1]，長谷川裕樹[1]，篠田　優[1]，春木　満[1]，平野展孝[1,2]（[1]日大・工・生命応化，[2]JST・PRESTO）

2E32p14　結晶性セルロースを分解する担子菌由来新規酵素の解析

16:43　○市川すみれ[1]，　藤田将幸[1]，　田口悟朗[1]，　稲冨　聡[2]，下坂　誠[1]（[1]信州大・繊維・応生系，[2]ホクトきのこ総合研）

2E32p15　マツタケ由来菌体外セルラーゼ遺伝子のクローニング

16:54　○大沼広宜[1]，　福田泰久[1]，　楠田瑞穂[2]，　寺下隆夫[1]，白坂憲章[1]（[1]近大農，[2]大阪府大）

p16〜p19 発表者の接続時間 17:05〜17:15

2E32p16　セルロース資化性放線菌 Cellulomonas fimi 由来のセルラーゼの性状解析

17:15　○内山　拓[1]，　内橋貴之[2]，　金子　哲[3]，　中村彰彦[1]，五十嵐圭日子[1]，安藤敏夫[2]，鮫島正浩[1]（[1]東大院農生科，[2]金沢大理工，[3]食総研）

2E32p17　超好熱性アーキア Thermococcus kodakarensis における多糖分解経路の解析

17:26　○白石拓也[1]，松原光平[3]，佐藤喬章[1,2]，Siebers Bettina[3]，跡見晴幸[1,2]（[1]京大工，[2]JST，CREST，[3]デュースブルグ-エッセン大）

2E32p18　好塩性アーキアにおける新規糖代謝経路の解明

17:37　○佐藤喬章[1,2]，　法土咲菜恵[1]，　吉井祐太[1]，　跡見晴幸[1,2]（[1]京大院・工，[2]JST, CREST）

2E32p19　超好熱アーキア *Sulfolobus tokodaii* strain 7 由来 ST0452 タンパク質へ導入された変異の UDP-GlcNAc 合成活性に与える影響の解析

17:48　○本田裕樹[1,2]，　臧　茜[3]，　清水泰博[1]，　大島敏久[4]，張　子蓮[5]，河原林裕[1,6]（[1]九州大院・農，[2]九州大・WPI-I2CNER，[3]九州大・農，[4]大阪工大・生命工学，[5]廈門大学，[6]産総研健康工学）

D12 会場　午前の部（9:11〜12:05）

有機―天然物ーケミカルバイオロジー，作用機構―

a02〜a05 発表者の接続時間 9:01〜9:11

2D12a02　新規脳梗塞治療薬 SMTP の非臨床および臨床開発
9:11 ○蓮見惠司[1,2]，　西村直子[2]，　長谷川啓子[2]，　澤田裕伸[2]，鈴木絵里子[1]（[1]農工大応用生命化学，[2]株式会社ティムス）

2D12a03　新規脳梗塞治療薬 SMTP の抗炎症作用機序の解析
9:22 ○鈴木絵里子[1]，　松本直欣[1]，　蓮見惠司[1,2]（[1]東農工大農，[2]株式会社ティムス）

2D12a04　新規微量ハイスループットスクリーニング法による海藻抽出物のアミロイド β 凝集阻害活性の評価
9:33 ○徳楽清孝[1]，　大柄俊貴[1]，　高橋倫人[1]，　安井　肇[2]，上井幸司[1]（[1]室蘭工大工，[2]北大水）

2D12a05　アミロイド β 凝集阻害活性の向上を目的としたクルクミン誘導体の構造活性相関研究
9:44 ○二階堂由莉，菊池真理，今野博行（山形大院理工・バイオ化学）

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

2D12a06　リン脂質カルジオリピンのシトクロム c に対する結合部位の同定
10:05 ○安部真人，田邊有貴恵，三芳秀人（京大農）

2D12a07　出芽酵母ミトコンドリア VDAC におけるユビキノン結合部位の同定
10:16 ○奥田絢香，村井正俊，三芳秀人（京都大農）

2D12a08　ミトコンドリア複合体－ I におけるアセトゲニンの結合部位の同定
10:27 ○平野桂太郎，安部真人，三芳秀人（京都大農）

2D12a09　アミロライド類縁体のミトコンドリア複合体-I における結合部位の同定
10:38 ○伊藤　剛，村井正俊，森坂裕信，三芳秀人（京都大農）

2D12a10　ミトコンドリア複合体 -I のピンポイント化学修飾
10:49 ○桝谷貴洋，村井正俊，森坂裕信，三芳秀人（京大院･農･応用生命）

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

2D12a11　コレラ菌ナトリウム輸送型 NADH-ユビキノン酸化還元酵素（Na^+-NQR）におけるユビキノン結合部位の同定
11:10 ○二ノ倉聡[1]，　村井正俊[1]，　BARQUERA Blanca[2]，三芳秀人[1]（[1]京大院農・応用生命，[2]レンセラー工科大学）

2D12a12　スピロソルビシリノール A 結合タンパク質の探索
11:21 ○水野麻里奈[1]，　谷口友梨[1]，　志村聡美[1]，　松永大輝[1]，明畠佑典[1]，　草柳友恵[1]，　九十田千子[1]，　水品善之[2,3]，　紙透伸治[1]，菅原二三男[1]（[1]東京理大・理工，[2]神戸学院大・栄養，[3]神戸学院大・LSC）

2D12a13　電位依存性ナトリウムチャネルのサブタイプを識別するテトロドトキシン類縁体の探索
11:32 ○千葉雪絵[1]，　塚本匡顕[1]，　長由扶子[1]，　安立昌篤[2]，榊原　良[2]，　所　聖太[2]，　中崎敦夫[2]，　石川裕生[2]，　西川俊夫[2]，山下まり[1]，此木敬一[1]（[1]東北大院農，[2]名古屋大院農）

2D12a14　アミロイド β 42 ダイマーの合成と活性評価
11:43 ○徳田真樹[1]，　村上一馬[1]，　鈴木天志[1]，　花木瑞穂[1]，岩崎真実[2]，久米利明[2]，入江一浩[1]（[1]京都大院農，[2]京都大院薬）

2D12a15　Thermostability of phosphoserine phosphatase with intermolecular disulfide bond from *Hydrogenobacter thermophilus*, TK-6
11:54 ○KeugTae KIM[1]，　Yoko CHIBA[2]，　Hiroyuki ARAI[1]，Masaharu ISHII[1]（[1]Tokyo Univ., [2]Tsukuba Univ.）

D12 会場　午後の部（14:00〜18:10）

有機―天然物ーケミカルバイオロジー，作用機構―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

2D12p01　ポリ-ガンマ-グルタミン酸生合成促進活性を有する納豆菌由来の ComX フェロモンの発見
14:00 ○林　峻輔，宇佐美翔平，中村優太，尾崎弘貴，岡田正弘（中部大院応生）

2D12p02　ポリ-ガンマ-グルタミン酸生合成促進活性を有する納豆菌由来の ComX フェロモンの化学合成
14:11 ○中村優太，宇佐美翔平，林　峻輔，尾崎弘貴，岡田正弘（中部大院応生）

2D12p03　翻訳後修飾によりトリプトファンがイソプレニル化された新規ペプチドの探索
14:22 ○宇佐美翔平，林　峻輔，中村優太，尾崎弘貴，岡田正弘（中部大院応生）

2D12p04　光反応性 O-benzyl-D-serine 誘導体の合成
14:33 ○吉田卓真[1]，橋床泰之[2]，橋本　誠[2]（[1]北大農，[2]北大院農）

2D12p05　味覚認識機構解明を指向した光反応性 phenylthiourea 類の合成
14:44 ○石田明子[1]，橋床泰之[2]，橋本　誠[2]（[1]北大農，[2]北大院農）

p06〜p10 発表者の接続時間 14:55〜15:05

2D12p06　Aplysiatoin 単純化アナログのアミド誘導体の合成と活性
15:05 ○花木祐輔[1]，　柳田　亮[2]，　菅原貴弘[3]，　相田美砂子[3]，徳田春邦[4]，鈴木信孝[4]，入江一浩[1]（[1]京大院農，[2]香川大農，[3]広大院理，[4]金沢大院医）

2D12p07　Aplysiatoxin の PKC C1 ドメイン認識部位の構造活性相関研究
15:16 ○芦田能基[1]，柳田　亮[2]，川浪康弘[2]，入江一浩[3]（[1]香川大院農，[2]香川大農，[3]京大院農）

2D12p08　日本産フサコケムシからの新規 Bryostatin 類の単離と活性
15:27 村木謙介[1]，　○柳田　亮[1]，　高田　舞[1]，　川浪康弘[1]，入江一浩[2]（[1]香川大農，[2]京大院農）

2D12p09　環状リポペプチド Burkholdine 様化合物の合成と抗真菌活性
15:38 鐙佳奈子，佐々木康裕，○今野博行（山形大院理工）

2D12p10　子嚢菌 *Lachnum palmae* からの新規含ハロゲン化合物の構造
15:49 ○繁森英幸[1]，　田辺友佳[2]，　松本拓矩[2]，　細矢　剛[3]，伴田　洋[4]，佐藤寛泰[5]，城　始勇[5]（[1]筑波大生命環境，[2]筑波大院生命環境，[3]国立科学博物館植物研，[4]北里大薬，[5]株式会社リガク）

p11〜p15 発表者の接続時間 16:00〜16:10

2D12p11　カタユウレイボヤにおける薬剤の毒性評価系の構築
16:10 ○溝谷優治，伊藤　俊，堀田耕司，田代　悦，岡浩太郎，井本正哉（慶大）

2D12p12　*in silico* 及び天然物スクリーニングによる新規アンドロゲン受容体アンタゴニストの探索
16:21 ○齋藤　駿，藤巻貴宏，榊原康文，田代　悦，井本正哉（慶應大理工）

2D12p13　抗がん剤耐性と EMT の関係に着目した MET 誘導物質の探索系構築
16:32 ○田代　悦，大嶽弘之，奈良部進，井本正哉（慶大･理工）

2D12p14　フコキサンチン及びフコキサンチノールに対するポリクローナル抗体の作製と性状
16:43 ○上野美紗，野村　駿，長由扶子，此木敬一，山下まり（東北大院農）

2D12p15　シコニン類の光学異性体比の特徴を利用した（*R*）-shikonin 及び（*S*）-shikonin の効率的生産

16:54 ○松本恵実[1,2]，牧岡富広[2]，柳瀬笑子[1]，中塚進一[1,2]（[1]岐阜大院連農，[2]長良サイエンス株式会社）

p16〜p20 発表者の接続時間 17:05〜17:15

2D12p16　ES 細胞の分化を阻害する化合物の探索

17:15 ○藤巻雄太[1,2]，小林大貴[1,4]，西村はる菜[1]，斎藤臣雄[3]，長田裕之[3]，中尾洋一[2]，吉田　稔[1,4]（[1]理研 化学遺伝，[2]早大院先進理工，[3]理研 CSRS，[4]科技機構）

2D12p17　可逆的 tight junction 開口物質の探索

17:26 ○神田祐輔[1]，南雲陽子[1]，紙透伸治[2]，菅原二三男[2]，臼井健郎[1]（[1]筑波大院生命環境，[2]東理大理工）

2D12p18　ミトコンドリア分裂阻害剤の探索

17:37 ○吉田圭佑，南雲陽子，臼井健郎（筑波大院・生命環境）

2D12p19　γチューブリン特異的阻害剤の探索と発見

17:48 ○知念拓実[1]，塩田秀也[2]，Peng LIU[3]，Elmar SCHIEBEL[3]，早川一郎[4]，木越英夫[2]，臼井健郎[1]（[1]筑波大院・生命環境，[2]筑波大院・数理物質，[3]ハイデルベルグ大学・分子生物学研究所，[4]岡山大院・自然科学）

2D12p20　抗ウイルス活性を示すインドール誘導体の細胞内における作用標的の解析

17:59 ○荒井詩織[1]，唐津　悠[2]，袴田　航[1,2]，平野貴子[2]，西尾俊幸[1,2]（[1]日大院生資科，[2]日大生資科・生命化）

E11 会場　午前の部（9:11〜11:54）

有機―天然物－生合成，代謝―

a02〜a05 発表者の接続時間 9:01〜9:11

2E11a02　Cremeomycin のジアゾ基形成に関与する新規亜硝酸生合成経路

9:11 ○菅井佳宣，勝山陽平，大西康夫（東大院・農生科・応生工）

2E11a03　*Streptomyces cremeus* における Cremeomycin 生合成に関与する新規亜硝酸脱離酵素 CreG の X 線結晶構造解析

9:22 勝山陽平[1]，○東山洋輔[2]，佐藤優花里[3]，菅井佳宣[1]，千田美紀[3]，千田俊哉[3]，大西康夫[1]（[1]東大院・農生科・応生工，[2]東大農・生命化学工学，[3]高エネ機構・物構研・PF・構造生物）

2E11a04　*Streptomyces* sp. JE-08 由来シクロペンタ［*b*］ピリジン環構造を有するポリケタイド JBIR-70 の生合成

9:33 ○太島有香[1]，勝山陽平[1]，泉川美穂[2]，大野翔登[1]，荒川孝俊[1]，伏信進矢[1]，新家一男[3]，大西康夫[1]（[1]東大院・農生科・応生工，[2]JBIC，[3]AIST）

2E11a05　SARP ファミリー転写活性因子の過剰発現による Streptomyces sp. JE-08 の休眠生合成遺伝子の活性化

9:44 ○杜丹ヤオ[1]，勝山陽平[1]，新家一男[2]，大西康夫[1]（[1]東大院・農生科・応生工，[2]産業技術総合研究所）

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

2E11a06　β-アミリン合成酵素：L734 および V483 部位のかさ高さが環化反応に及ぼす影響

10:05 ○中川和也，仲田知佳，伊藤遼介，仲野千秋，星野　力（新潟大農）

2E11a07　β-アミリン合成酵素：M729 部位のかさ高さが環化反応に及ぼす影響

10:16 ○仲田知佳[1]，中川和也[2]，伊藤遼介[1]，天利佳奈子[2]，仲野千秋[1]，星野　力[1,2]（[1]新潟大院自，[2]新潟大農）

2E11a08　病原性結核菌に特異的に存在する Rv3378c の X 線構造解析とその触媒機構

10:27 Hsiu-Chien Chan[2]，Xinxin Feng[3]，Tzu-Ping Ko[4]，○仲野千秋[1]，星野　力[1]，Eric Oldfield[3]，Rey-Ting Guo[2]（[1]新潟大院自，[2]中国科学院天津工業生物技術研究所，[3]イリノイ大学化学科，[4]中央研究院生物化学研究所）

2E11a09　麹菌異種発現系を利用したインドールジテルペン，ペニトレムの生合成研究-1

10:38 ○松本知之[1]，劉　成偉[2]，田上紘一[1]，南　篤志[2]，鈴木秀幸[3]，五味勝也[4]，及川英秋[2]（[1]北大院総化，[2]北大院理，[3]かずさ DNA，[4]東北大農）

2E11a10　麹菌異種発現系を利用したインドールジテルペン，ペニトレムの生合成研究-2

10:49 ○劉　成偉[1]，田上紘一[2]，松本知之[2]，南　篤志[1]，鈴木秀幸[3]，五味勝也[4]，及川英秋[1]（[1]北大院理，[2]北大院総化，[3]かずさ DNA，[4]東北大農）

a11〜a14 発表者の接続時間 11:00〜11:10

2E11a11　安定同位体標識生合成中間体を用いた麻痺性貝毒生合成研究

11:10 ○土屋成輝[1]，長由扶子[1]，此木敬一[1]，長澤和夫[2]，大島泰克[3]，山下まり[1]（[1]東北大院農，[2]東京農工大院工，[3]東北大院生命科学）

2E11a12　麻痺性貝毒の予想生合成中間体 E' の探索と精製

11:21 ○吉岡廉平[1]，長由扶子[1]，土屋成輝[1]，此木敬一[1]，小柴生造[2]，大島泰克[3]，山下まり[1]（[1]東北大院農，[2]東北大東北メディカル・メガバンク機構，[3]東北大院生命科学）

2E11a13　ダイズ葉に flavonoid 類を誘導する FACs

11:32 ○青木謙太[1]，中田　隆[1]，吉永直子[1]，寺石政義[1]，奥本　裕[1]，小野　肇[1]，西田律夫[1]，森　直樹[1]，シュメルツエリック[2]（[1]京都大農，[2]カリフォルニア大学サンディエゴ校）

2E11a14　ハイグロマイシン B 処理によるルシラクタエン生産糸状菌 Fusarium sp. RK97-94 における二次代謝生産誘導

11:43 ○加藤　翔[1,2]，本山高幸[1]，鎌倉高志[2]，長田裕之[1]（[1]理研抗生物質，[2]東理大）

E11 会場　午後の部（14:11〜17:59）

有機―天然物－生合成，代謝―

p02〜p05 発表者の接続時間 14:01〜14:11

2E11p02　FD-891 生合成に関わるシトクロム P450 酸化酵素 GfsF の結晶構造解析

14:11 ○宮永顕正，古谷　隆，工藤史貴，江口　正（東工大院理工）

2E11p03　ヌクレオシド系抗生物質アリステロマイシン生合成に関わる Orf2 の機能解析

14:22 ○角田　毅，高島　惇，宮永顕正，工藤史貴，江口　正（東工大院理工）

2E11p04　配糖体エンジニアリングを見据えた柑橘由来 α-ラムノース転移酵素の特性解析

14:33 ○大橋貴生，長谷川友香，三崎　亮，藤山和仁（大阪大学）

2E11p05　*Candida versatilis* SN-18 株由来マンニトールデヒドロゲナーゼの機能解析

14:44 ○石牧優規，水島大貴，加藤　順，荻原　淳，春見隆文（日大 生資利用）

p06〜p10 発表者の接続時間 14:55〜15:05

2E11p06　フェロモン活性を有するトゲナシシロトビムシ由来ピリドピラジンの生合成前駆体

15:05 ○清水伸泰，糸井瑞希，荻野佳稀（京都学園大バイオ環境）

2E11p07　クサギカメムシにおけるトリデカン生合成経路とそれに関わる酵素

15:16 ○藤盛春奈，田母神繁，阿部　誠，野下浩二（秋田県大・生資科）

2E11p08　*Pseudomonas* spp. によるクマリンの分解代謝－メリロト酸からの代謝追跡

15:27 ○田村　駿，島崎真実，今井政裕，小野田光希，岡田貴博，清水文一（東洋大生命）

2E11p09　カイガラムシ色素の生合成遺伝子に関する研究

15:38 ○豊田将大[1]，山城敬範[1]，菊池直也[1]，片山琢也[2]，堀内裕之[2]，鈴木道生[1]，長澤寛道[1]，作田庄平[1]（[1]東大院農生科・応生化，[2]東大院農生科・応生工）

2E11p10　Comparative analysis of oligonucleotide primers for high-throughput screening of NRPS genes in actinomycetes

15:49　◦Dana Ulanova[1], Tomas Bakal[2], Kian-Sim Goo[1], Lucie Najmanova[2]（[1]Kochi Univ., [2]Institute of Microbiology, AS CR）

p11〜p15 発表者の接続時間 16:00〜16:10

2E11p11　メタン生成アーキア由来のシス型プレニルトランスフェラーゼホモログに触媒される head-to-tail 型および non-head-to-tail 型縮合

16:10　◦小川拓哉，吉村　徹，邊見　久（名大院生命農）

2E11p12　大腸菌におけるアーキア膜脂質の生合成強化

16:21　◦森　　健，磯部圭祐，吉村　徹，邊見　久　（名大院生命農）

2E11p13　麹菌アシル CoA 合成酵素欠失株による遊離脂肪酸の高生産

16:32　◦玉野孝一[1]，ブルーノケネス[2]，小池英明[1]，石井智子[1]，三浦　愛[1]，山根倫子[1]，梅村舞子[1]，ベーカースコット[2]，町田雅之[1]（[1]産総研生物プロセス，[2]パシフィックノースウエスト国立研）

2E11p14　バラ香気成分 2-Phenylethanol の高温期特異的な生成に関する転写解析

16:43　◦平田　拓[1]，大西利幸[2,3]，鈴木秀幸[4]，渡辺直治[1]（[1]静岡大・創造，[2]静岡大・農，[3]静岡大・グリーン，[4]かずさ DNA 研究所）

2E11p15　オオムギに含まれるセロトニン二量体合成酵素の性状解析

16:54　◦坂口七瀬[1]，八木佑香里[2]，中島廣光[2]，石原　亨[2]（[1]鳥取大院農，[2]鳥取大農）

p16〜p19 発表者の接続時間 17:05〜17:15

2E11p16　低酸素癌細胞選択的毒性物質 rakicidin 類の生合成研究

17:15　◦石川愛理沙[1]，小牧久幸[2]，市川夏子[2]，パンバングレッドワタナライ[3]，五十嵐康弘[1]（[1]富山県立大学，[2](独)製品評価技術基盤機構，[3]マヒドン大学）

2E11p17　植物病原菌 *Bipolaris coicis* の生産する植物毒素 radicinin の生合成

17:26　◦西田直人[1]，北野生薫[1]，赤木靖典[2]，児玉基一朗[2]，藪田行哲[2]，石原　亨[2]，中島廣光[2]（[1]鳥取大院農，[2]鳥取大農）

2E11p18　ヤマカガシ属ヘビ *Rhabdophis pentasupralabialis* が頸腺に蓄積するステロイド毒

17:37　◦吉田達哉[1]，城野哲平[2]，竹内寛彦[3]，吉永直子[1]，小野　肇[1]，西田律夫[1]，丁　　利[2]，唐　並忠[2]，森　　哲[3]，森　直樹[1]（[1]京都大農，[2]成都生物研究所，[3]京都大理）

2E11p19　有毒イモリからのテトロドトキシンの推定生合成中間体の探索

17:48　◦工藤雄大，長由扶子，此木敬一，山下まり（東北大院農）

E21 会場　午前の部（9:00〜12:05）

有機―医薬，農薬，その他―

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

2E21a01　γ-BHC 類縁体・関連化合物の合成と活性

9:00　◦永崎果鈴[1]，田中啓司[2]，尾添嘉久[3]，松田一彦[1]，森本正則[1]，栗原紀夫[4]（[1]近畿大農，[2]近畿大農＆名古屋大エコトピア科研，[3]島根大生資，[4]京都大）

2E21a02　1 位置換 γ-BHC 類縁体のラセミ体光学分割とそれら鏡像異性体の［3H］EBOB 結合阻害活性

9:11　◦田中啓司[1]，永崎果鈴[2]，松田一彦[2]，尾添嘉久[2]，森本正則[3]，栗原紀夫[4]（[1]近畿大農＆名古屋大エコトピア科研，[2]近畿大農，[3]島根大生資，[4]京都大）

2E21a03　希少糖の貯穀害虫に対する成長阻害活性

9:22　◦瀬尾晃平[1]，廣島　恵[1]，手林慎一[1]，佐藤正資[2]，秋光和也[2]，何森　健[3]（[1]高知大農，[2]香川大農，[3]香川大希少糖）

2E21a04　D-アラビノース：線虫成長阻害試験で見つかった新規な生物活性希少糖

9:33　◦佐藤正資[1]，砂古口博文[1]，吉原明秀[2]，新谷知也[3]，大隈一裕[3]，何森　健[2]（[1]香川大農，[2]香川大希少糖研究セ，[3]松谷化学工業(株)）

2E21a05　デオキシ - ケトヘキソース異性体の線虫成長阻害活性

9:44　◦砂古口博文[1]，吉原明秀[2]，新谷知也[3]，大隈一裕[3]，何森　健[2]，佐藤正資[1]（[1]香川大農，[2]香川大希少糖研究セ，[3]松谷化学工業(株)）

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

2E21a06　D-プシコース処理線虫におけるストレス応答タンパク質の遺伝子発現

10:05　◦山口大貴[1]，吉原明秀[2]，新谷知也[3]，大隈一裕[3]，何森　健[2]，佐藤正資[1]（[1]香川大農，[2]香川大希少糖研究セ，[3]松谷化学工業(株)）

2E21a07　抗 HIV 活性を有する EFdA の合成

10:16　◦福山　圭[1]，大類　洋[2]，桑原重文[1]（[1]東北大院農，[2]横浜薬大）

2E21a08　抗インフルエンザウイルス活性を有する核酸誘導体 EdAP の合成研究

10:27　◦林　　瑛[1]，竹内倫文[1]，櫻庭彩子[1]，ノングラックスリウィライジャロエン[2]，志村聡美[1]，林　京子[3]，鈴木康夫[2]，紙透伸治[1]，菅原二三男[1]，大類　洋[4]（[1]東理大院・理工，[2]中部大・生命健康，[3]富山大・医薬，[4]横浜薬科大・薬）

2E21a09　化学アゴニスト選択的 TRPM8 アンタゴニストであるボアカンジンの類縁化合物を用いた構造-活性相関研究

10:38　◦寺田祐子[1]，北島満里子[2]，田口芙悠美[2]，高山廣光[2]，堀江俊治[3]，渡辺達夫[1]（[1]静県大食，[2]千葉大薬，[3]城西国際大薬）

2E21a10　ヒゲナミン配糖体の骨格筋糖取り込み促進活性に関する構造活性相関研究

10:49　◦木村駿介，加藤英介，川端　潤（北大院農）

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

2E21a11　16 員環ラクトン構造を有する bryostatin 単純化アナログの開発

11:10　◦中川　優[1,2]，Katherine E. Near[1]，Daryl Staveness[1]，Paul A. Wender[1]（[1]スタンフォード大，[2]名大院生命農）

2E21a12　Cytotoxic activity of ether type of lignin

11:21　◦Tuti Wukirsari，Hisashi Nishiwaki，Kosuke Nishi，Takuya Sugahara，Satoshi Yamauchi（Ehime Univ.）

2E21a13　ピラン環化合物の合成と構造活性相関

11:32　◦田中祐希[1]，牧田裕史[1]，川井　悟[1]，常盤野哲生[2]，吉澤結子[2]（[1]東電大理工，[2]秋田県立生資科）

2E21a14　スチルベン類の合成及び構造活性相関

11:43　◦中村　翼[1]，川井　悟[1]，常盤野哲生[2]，吉澤結子[2]（[1]東電大理工，[2]秋田県大生資料）

2E21a15　アクリドン類の合成と前骨髄性白血病細胞 HL-60 に対する増殖抑制活性

11:54　◦岸本真帆[1]，川井　悟[1]，常盤野哲生[2]，吉澤結子[2]（[1]東電大理工，[2]秋田県大生資科）

E21 会場　午後の部（14:00〜18:10）

有機―その他，合成，反応機構―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

2E21p01　ハスモンヨトウ幼虫の食害に対するダイズ毛茸の化学的応答

14:00　◦中田　隆[1]，網干貴子[2]，吉永直子[1]，石原　亨[3]，寺石政義[1]，SCHMELZ Eric[4]，小野　肇[1]，西田律夫[1]，奥本　裕[1]，森　直樹[1]（[1]京大院農，[2]山形大農，[3]鳥取大農，[4]カリフォルニア大学サンディエゴ校）

2E21p02　Ficifolidione 類縁体の 4 位に関する構造活性相関
14:11　°藤原敏美，西脇　寿，碇めぐみ，福島菜央，菅原卓也，山内　聡，首藤義博（愛媛大学）

2E21p03　非天然型アミノ酸誘導体イソニトリルの合成と付着阻害活性に関する構造-活性相関の考察
14:22　°高嶋脩平[1]，　野方靖行[2]，　吉村えり奈[3]，　千葉一裕[1]，北野克和[1]（[1]東京農工大，[2]電中研，[3]セレス）

2E21p04　連続 LC-MS 分析を指向したリン酸塩吸着のためのチタニアによる磁性マイクロ粒子の表面修飾
14:33　°若松弘起[1]，　芥川一成[1]，　秋山佳丈[2]，　高橋　豊[3]，飯島志行[4]，岡田洋平[5]，神谷秀博[5]，千葉一裕[1]（[1]東農工大院農，[2]信州大繊維，[3]エムエス・ソリューションズ(株)，[4]横国大環情院，[5]東農工大院 BASE）

2E21p05　ツバキ科植物由来のジヒドロレスベラトロールグルコシドを基盤とするメラニン生成調節剤の分子設計
14:44　°大出知里[1]，　島田　亙[2,3]，　横田真理子[3]，　二瓶賢一[1,2]（[1]宇都宮大農，[2]農工大院連農，[3]コスモステクニカルセンター）

p06〜p10 発表者の接続時間 14:55〜15:05

2E21p06　ジヒドロレスベラトロールの化学的配糖体化と生理活性評価
15:05　°島田　亙[1,2]，横田真理子[2]，二瓶賢一[3]（[1]農工大院連農，[2]コスモステクニカルセンター，[3]宇都宮大農）

2E21p07　5-レゾルシノール型ロドデンドロール誘導体の化学合成と生理活性評価
15:16　°岩舘丈央[1]，　島田　亙[1,2]，　横田真理子[2]，　二瓶賢一[1,3]（[1]農工大院連農，[2]コスモステクニカルセンター，[3]宇都宮大農）

2E21p08　ヤマモガシ科植物由来のレゾルシノール配糖体およびその誘導体の有機合成と生理活性評価
15:27　°松本大志，中島拓弥，二瓶賢一（宇都宮大農）

2E21p09　天然有機化合物 pradimicin を用いたマンノース認識金ナノ粒子の創成
15:38　°榎本　賢[1]，　五十嵐康弘[2]，　佐々木正秀[1]，　清水弘樹[1]（[1]産総研・生物プロセス研究部門，[2]富山県立大学）

2E21p10　下部ユニットをアセチル化したフラバン-3-オール 2 量体の合成と生物活性評価
15:49　°法島太一[1]，　濱田義知[2]，　中島範行[3]，　齊藤安貴子[1,2]（[1]大阪電通大工・環境，[2]大阪電通大院工・先端，[3]富山県立大・工）

p11〜p15 発表者の接続時間 16:00〜16:10

2E21p11　プロアントシアニジンの構造 - 活性相関研究：上部ユニット B 環の水酸基の重要性
16:10　°濱田義知[1]，　綾野義博[1]，　小芦貴弘[1]，　伊藤孝太郎[2]，徳永将大[2]，高野将太[2]，中島範行[3]，齊藤安貴子[1,2]（[1]大阪電通大院工，[2]大阪電通大工，[3]富山県立大工）

2E21p12　アントシアニン誘導体のラジカル酸化反応
16:21　°森　拓哉，神谷春菜，柳瀬笑子（岐阜大学）

2E21p13　ウーロンテアニン類の化学的合成
16:32　°小川和樹，廣瀬紗弓，柳瀬笑子（岐阜大応用生物科学）

2E21p14　テアフラビン類の合成収率の改善
16:43　°内田和宏，小川和樹，柳瀬笑子（岐阜大応生）

2E21p15　クマリンを合成素子とした 3-oxykoaburagenin の全合成
16:54　°今井祥平[1]，尾山公一[2]，渡邊紀之[1]，吉田久美[1]（[1]名大院・情科，[2]名大・物国セ）

p16〜p20 発表者の接続時間 17:05〜17:15

2E21p16　グリカールに対する β 選択的 Ferrier 反応の開発とその応用
17:15　岡崎隼人，植田裕二，花屋賢悟，庄司　満，°須貝　威（慶應大薬）

2E21p17　固相-液相間を移動するテフロン担持型ミディアムフルオラスメタセシス触媒の開発
17:26　°杉山祐也，小林佑基，犬飼紗絵，濱本博三，塩入孝之，松儀真人（名城大農）

2E21p18　フルオラス Fmoc 保護を基点とするトリペプチドのミクスチャー合成とそれらの ACE 阻害活性
17:37　°遠藤菜月，杉山祐也，渡辺量子，濱本博三，塩入孝之，松儀真人（名城大農）

2E21p19　昆虫麻痺活性を示す環状ペプチド PF1171 類の全合成と三次元構造解析
17:48　°増田裕一[1]，　田中　錬[1]，　甲斐健次[2]，　Ganesan A.[3]，土井隆行[1]（[1]東北大薬，[2]大阪府大生命，[3]イースト・アングリア大学）

2E21p20　海洋ペプチド homophymine B の合成研究：直鎖部に含まれる異常アミノ酸の合成
17:59　°東海林由憲，吉野　諒，今野博行（山形大院理工）

E23 会場　午前の部（9:22〜12:05）

有機―天然物－単離構造決定－動物，天然物－単離構造決定－植物―

a03〜a05 発表者の接続時間 9:12〜9:22

2E23a03　フジヤスデ *Anaulaciulus* sp に存在する 2-alkanone 類の同定
9:22　°桑原保正[1,2]，田辺　力[3]，浅野泰久[1,2]（[1]富山県大工・生工研セ，[2]JST, ERATO，[3]熊本大・教育）

2E23a04　クサギカメムシ採餌行動解発因子の同定と触角内におけるその分解
9:33　°野下浩二，田母神繁（秋田県大・生資科）

2E23a05　アワダチソウグンバイの性フェロモンの由来とセイタカアワダチソウ揮発成分の若虫に対する誘引活性
9:44　°渡邊綺咲，清水伸泰（京都学園大バイオ環境）

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

2E23a06　ヒロヘリアオイラガ幼虫分泌液由来の TRPV1 活性物質の探索
10:05　°平川祥成，水谷祐輔，野呂真奈美，今井邦雄，勝崎裕隆（三重大院生資）

2E23a07　ヒロヘリアオイラガ幼虫由来 Iratin Pll-2 のジスルフィド結合解析
10:16　°野呂真奈美，平川祥成，西尾昌洋，今井邦雄，勝崎裕隆（三重大院生資）

2E23a08　シオカラトンボの翅・体表の微細構造の形状とその成分
10:27　°横尾敬行[1]，　森田沙代[1]，　吉永直子[1]，　野村周平[2]，平井悠司[3]，吉岡伸也[4]，森　直樹[1]（[1]京大院農・応用生命，[2]国立科学博物館，[3]千歳科学技術大学・バイオマテリアル，[4]阪大・生命機能）

2E23a09　巻貝の貝殻形態形成におけるキチナーゼの機能解析
10:38　°米澤　舞[1]，　小暮敏博[2]，　遠藤一佳[2]，　清水啓介[2]，作田庄平[1]，鈴木道生[1]（[1]東大院農，[2]東大院理）

2E23a10　Investigation of tetrodotoxin in pufferfish and screening of bioactive compounds in marine invertebrates from Solomon Islands
10:49　°Clyde Gorapava PUILINGI，　Yuta KUDO，　Keiichi KONOKI，　Yuko CHO，　Mari YOTSU-YAMASHITA（Tohoku Univ.）

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

2E23a11　ネコブセンチュウの誘引現象に関与する生理活性物質の探索
11:10　°吉田翔太郎[1]，開出智美[1]，岩堀英晶[2]，近藤竜彦[1]（[1]名大農，[2]九州沖縄農業研究センター）

2E23a12　ネコブセンチュウの誘引現象に関与する宿主根由来物質の精製
11:21　°西川博崇[1]，　小川　舞[1]，　村瀬　潤[1]，　岩堀英晶[2]，近藤竜彦[1]（[1]名大院生命農，[2]九州沖縄農業研究センター）

2E23a13　新規ストリゴラクトン zealactone の単離および構造決定

11:32 ○謝　肖男[1]，　来生貴也[1]，　米山香織[1]，　内田健一[2]，横田孝雄[2]，野村崇人[1]，米山弘一[1]（[1]宇都宮大学・バイオサイエンス教育研究センター，[2]帝京大学・バイオサイエンス学科）

2E23a14　紫外線照射イネ葉に蓄積するアミド化合物とイネいもち病菌に対する抗菌活性

11:43 ○堀江清孝[1]，　酒井健吾[2]，　奥木美咲[2]，　戸嶋浩明[1,2]，長谷川守文[1,2]（[1]東京農工大学，[2]茨城大学）

2E23a15　Synthesis of deoxy-D-allose fatty acid ester and its biological activity on plant growth

11:54 ○Md Tazul Islam Chowdhury，　Hikaru Ando，Ryo C. Yanagita，Yasuhiro Kawanami（Kagawa Univ.）

E23 会場　午後の部（14:00〜17:59）

有機―天然物－単離構造決定－植物―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

2E23p01　久慈産琥珀に含まれる spirolactone 構造を有する酵母 Ca^{2+}- シグナル伝達阻害物質

14:00 ○清水栄作[1]，　越野広雪[2]，　高橋優太[1]，　新田久男[3]，木村賢一[1]（[1]岩手大院農，[2]理研，[3]久慈琥珀(株)）

2E23p02　白亜紀のミャンマー産琥珀に含まれる酵母 Ca^{2+} シグナル伝達阻害物質の単離精製

14:11 ○内田武史[1]，　越野広雪[2]，　高野侑恵[1]，　新田久男[3]，木村賢一[1]（[1]岩手大院・農，[2]理研，[3]久慈琥珀(株)）

2E23p03　ジャバラ果皮主成分ナリルチンの生物変換反応とその機能性

14:22 ○大田時帆[1]，　奥野祥治[1]，　河野良平[2]，　野村幸子[2]，宇都宮洋才[2]，前野覚大[2]（[1]和歌山高専，[2]和歌山県医大）

2E23p04　光学活性 Taxifolin の大量生産法および異性化速度の検討

14:33 宮田健吾，○中塚宏志，中塚進一（長良サイエンス株式会社）

2E23p05　未熟黒大豆種皮に含まれる flav-2-en-3-ol 3-glucoside の単離とアントシアニンへの変換反応に関する研究

14:44 ○林　英美，吉田久美，近藤忠雄（名古屋大）

p06〜p10 発表者の接続時間 14:55〜15:05

2E23p06　合成した助色素類を用いたアジサイ青色錯体の構造研究

15:05 ○山田智美，尾山公一，近藤忠雄，吉田久美（名古屋大学）

2E23p07　トキワレンゲの α-グルコシダーゼ阻害成分

15:16 ○加藤奈々，河辺聡子，我如古菜月，伊東秀之（岡山県大保福）

2E23p08　男性型脱毛症の防止を目的とした紫リュエリアからのテストステロン還元酵素阻害物質の探索

15:27 ○須賀久世，上西雄大，加藤英介，川端　潤（北大院農）

2E23p09　ローズバッツエキスパウダーからのジペプチジルペプチダーゼ IV 阻害物質の探索

15:38 ○上西雄大[1]，　加藤英介[1]，　稲垣洋介[2]，　黒川美保子[2]，川端　潤[1]（[1]北大院農，[2]キューサイ(株)開発部）

2E23p10　Search and identification of intestinal maltase inhibitors from *Caesalpinia sappan* (L.) wood

15:49 ○ARSININGTYAS INES SEPTI，　EISUKE KATO，JUN KAWABATA（Graduate School of Agriculture, Hokkaido Univ.）

p11〜p15 発表者の接続時間 16:00〜16:10

2E23p11　包括的二次元 GCMS を用いた産地間におけるワカメ香気成分の比較解析

16:10 ○山下哲郎[1,2]，　新田祝子[2]，　浜田　修[1]，　前川雄二[1]，宮崎雅雄[2]（[1]岩手大三陸復興推進機構，[2]岩手大農）

2E23p12　ハマウツボ科帰化雑草 3 種の成分と生物活性から見た国内分布拡大リスク

16:21 ○森本正則，石田実希，松田一彦（近畿大院農）

2E23p13　アレチオグルマ地上部滲出物中のセスキテルペン類の構造解析と生物活性

16:32 ○森田　遼，森本正則，松田一彦（近畿大院農）

2E23p14　マカ(*Lepidium meyenii*)に含有される脂肪酸とその糖取り込み促進活性

16:43 ○片山紳司，加藤英介，川端　潤（北大院農）

2E23p15　松葉(*Pinus sylvestris*)からの膵リパーゼ阻害物質の探索

16:54 ○竹本彩乃，川端　潤，加藤英介（北大院農）

p16〜p19 発表者の接続時間 17:05〜17:15

2E23p16　57 種のビルマ伝統医薬抽出物の生理活性について

17:15 ○仁科淳良[1]，　浮谷基彦[1]，　深津　誠[1]，　纐纈　守[2]，渡邊　剛[3]，フェイニュン[4]（[1]日大理工，[2]岐阜大工，[3]タマ生化学，[4]パセイン大）

2E23p17　ヘンナの抗肥満および抗糖尿病効果

17:26 ○大城　華，ファムティベトゥ，石井貴広，多和田眞吉（琉球大農）

2E23p18　はぶ草(*Senna occidentalis* L.)種子の有効成分の検索と生理活性について

17:37 ○元矢倫子[1]，元矢知志[2]，岡田芳治[1]，野村正人[1]（[1]近畿大学，[2]島根大学）

2E23p19　生薬“細辛(サイシン)”からの塩味惹起物質の単離と同定

17:48 ○奥　直也，岩崎春香，五十嵐康弘　（富山県大生工・生工セ）

D23 会場　午前の部（9:00〜12:05）

植物―植物ホルモン，成長調節物質―

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

2D23a01　ソルガムにおける GR24 水酸化反応の立体特異性と位置選択性

9:00 ○石輪俊典[1]，上野琴巳[1]，中嶌　瞳[1,2]，水谷正治[1]，滝川浩郷[1,2]，杉本幸裕[1,2]（[1]神戸大院農，[2]JST/JICA, SATREPS）

2D23a02　ミヤコグサおよびタルウマゴヤシにおけるカーラクトン MAX1 酸化産物のストリゴラクトンへの変換

9:11 ○秋山康紀[1]，　佐渡愛香[1]，　徳永珠美[1]，　謝　肖男[2]，米山弘一[2]（[1]阪府大院・生命環境，[2]宇都宮大・バイオサイエンス教育研究センター）

2D23a03　酵母異種発現系によるミヤコグサおよびタルウマゴヤシ MAX1 酵素の機能解析

9:22 ○森　愛美[1]，　謝　肖男[2]，　野村崇人[2]，　米山弘一[2]，秋山康紀[3]（[1]阪府大・生命環境，[2]宇都宮大学バイオサイエンス教育研究センター，[3]阪府大院・生命環境）

2D23a04　機能選択的ストリゴラクトンミミック『デブラノン』の選択性に関する詳察

9:33 ○福井康祐，間下大樹志，中村英光，浅見忠男　（東大院農生科応生化）

2D23a05　植物病害抵抗性の抑制化合物の構造展開

9:44 ○栗本哲哉，姜　　凱，徐　銀卿，中村英光，浅見忠男（東大院・農生科）

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

2D23a06　種子の二次休眠を打破する新奇アブシジン酸受容体アンタゴニスト

10:05 ○三村尚毅[1]，　岡本昌憲[2]，　朝比奈尚紀[3]，　川島徳晃[3]，大西敏幸[1,3,4]，轟　泰司[1,3,4]（[1]静大院農，[2]鳥取大乾燥地研究センター，[3]静大農，[4]静大グリーン研）

2D23a07　6-nor-ABA と 7'-nor-ABA の ABA 受容体サブタイプ選択性

10:16 ○竹内　純[1]，大西利幸[1]，轟　泰司[1,2,3]（[1]静大院農，[2]静大院創造，[3]静大グリーン研）

2D23a08　ABA 代謝不活性化酵素 CYP707A を阻害する新奇ア

ブシナゾール

10:27 ○増田淳也[1]，久保尻由貴[1]，轟　泰司[1,2]（[1]静岡大院農，[2]静大グリーン研）

2D23a09　ブラシノライドアゴニスト/アンタゴニストのインシリコスクリーニング

10:38 ○杉浦愛理，瀧本征佑，南　沙紀，中川好秋，宮川　恒（京大院農）

2D23a10　新奇エチレン様活性物質 KUT15 の生理作用解析

10:49 ○堅固山裕子[1,2]，北畑信隆[3]，鈴木優志[1,2]，安藤卓也[1,2]，浅見忠男[1,2]（[1]東大院・農生科・応生化，[2]科学技術振興機構・CREST，[3]東理大・理・応用生物科学科）

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

2D23a11　カルシウム依存性タンパク質キナーゼ CPK33 は FD をリン酸化しフロリゲン複合体形成を制御する

11:10 ○川本　望[1]，笹部美知子[2]，遠藤　求[1]，町田泰則[3]，荒木　崇[3]（[1]京大・院・生命，[2]弘前大・農学生命，[3]名大・院・理）

2D23a12　新規植物カルス誘導化合物 FPX と新規植物成長促進化合物 PPG の発見と機能解析

11:21 ○田中翔太[1,2]，藤岡昭三[1]，久城哲夫[2]，長田裕之[1,3]，浅見忠男[4,5]，中野雄司[1,3,5]（[1]理研，[2]明治大院・農芸化学，[3]理研・CSRS，[4]東大院・農化生，[5]JST CREST）

2D23a13　植物新規アシルスペルミジン類の探索と機能解析

11:32 ○山野博之[1]，岩川純也[1]，山岸卓矢[1]，彦坂政志[1]，中村英光[1]，前田　哲[2]，森　昌樹[2]，浅見忠男[1]（[1]東京大農，[2]農業生物資源研究所）

2D23a14　オカボノクロアブラムシによるハルニレゴール形成の適応的意義に関する研究

11:43 ○武井麻美[1]，伊藤晋作[2]，石毛太一郎[3]，田中啓介[3]，鈴木義人[1]（[1]茨城大・農，[2]東農大・応生科・バイオ，[3]東農大・ゲノムセ）

2D23a15　ジャスモン酸輸送体による非傷害部位における傷害応答抑制機構

11:54 ○石丸泰寛[1]，及川貴也[1]，鈴木健史[1]，松浦英幸[2]，高橋公咲[2]，浜本　晋[3]，魚住信之[3]，清水崇史[4]，瀬尾光範[4]，太田啓之[5]，上田　実[1]（[1]東北大理，[2]北海道大農，[3]東北大工，[4]理研 CSRS，[5]東工大生命理工）

D23 会場　午後の部（14:00〜18:10）

植物―植物ホルモン，成長調節物質，植物工学－育種，物質生産，形質転換―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

2D23p01　バレイショ塊茎形成におけるジャスモン酸類の働き

14:00 ○井上悠敬[1,2]，高橋公咲[1,2]，崎浜靖子[1,2]，松浦英幸[1,2]（[1]日本農芸化学会，[2]北海道大学）

2D23p02　12- オキソファイトジエン酸（OPDA）の代謝産物の合成と植物界におけるその存在

14:11 ○内山　明[1]，大鹿　遵[1]，梶原章志[1]，井之口曜[2]，高橋公咲[3]，松浦英幸[3]（[1]北海道大学院農学院，[2]北海道大学農学部，[3]北海道大学大学院農学研究院）

2D23p03　ビール酵母抽出物が誘導する植物の病害応答機構の生物有機化学的研究

14:22 ○矢口賢臣[1]，木南朋久[2]，岩渕千賀子[2]，北川隆徳[2]，安原貴臣[2]，高橋公咲[1]，松浦英幸[1]（[1]北大院農，[2]アサヒグループホールディングス株式会社）

2D23p04　サツマイモ不定根形成に関わる制御因子の同定

14:33 ○伊藤　茜[1]，田部記章[2,4]，小林宏太[2,4]，大鳥久美[2,4]，田茂井政宏[1,2,4]，横田明穂[3,4]，重岡　成[1,2,4]（[1]近畿大・院・バイオ，[2]近畿大・農・バイオ，[3]奈良先端大・先端科技セ，[4]JST, CREST）

2D23p05　シロイヌナズナ熱ショック転写因子 HsfA2 過剰発現によるサツマイモの酸化ストレス耐性強化

14:44 ○小林宏太[1,5]，田部記章[1,5]，大鳥久美[1,5]，伊藤　茜[2]，高安聡子[4,5]，菊池　彰[4,5]，横田明穂[3,5]，田茂井政宏[1,2,5]，重岡　成[1,2,5]（[1]近畿大・農・バイオ，[2]近畿大院・農・バイオ，[3]奈良先端大・先端科技セ，[4]筑波大・遺伝子，[5]JST, CREST）

p06〜p10 発表者の接続時間 14:55〜15:05

2D23p06　抗菌タンパク質を発現するイネカルスの解析

15:05 ○増村威宏[1,2]，菊田桃香[1]，佐生　愛[1]，重光隆成[1]，森田重人[1,2]，佐藤　茂[1,2]（[1]京都府大生命環境，[2]京都農技セ・生資セ）

2D23p07　実用珪藻 *Chaetoceros gracilis* における代謝工学：リシノール酸生産株の作出と蓄積条件の検討

15:16 ○安部竜樹[1]，梶川昌孝[1]，伊福健太郎[1]，小川　順[2]，福澤秀哉[1]（[1]京大院・生命，[2]京大院・農）

2D23p08　*p* VEC ペプチドの植物細胞透過性における N 末端疎水性領域の役割

15:27 ○林　真由，宮下正弘，宮川　恒（京大院農）

2D23p09　ムギネ酸類生合成に関与している酵素の局在

15:38 ○古賀悠介，新井菜月，長坂征治（東洋大生命）

2D23p10　チャ *Camellia sinensis* におけるフラバン-3-オール還元酵素群の解析

15:49 康　美玲[1]，丹羽康夫[1]，小林京子[1]，閔　俊哲[2]，豊岡利正[2]，中村順行[3]，○小林裕和[1]（[1]静県大院・食品栄養環境・薬食生命，[2]静県大院・薬，[3]静県大院・茶学総合センター）

p11〜p15 発表者の接続時間 16:00〜16:10

2D23p11　複数遺伝子クローニングシステムを用いた種々植物への多重遺伝子導入と発現解析

16:10 ○中川　強[1]，税所利基[1]，芝原健太[1]，木村哲哉[2]（[1]島根大学，[2]三重大学）

2D23p12　Development of Dual Site Gateway Binary Vector System Driven by a Constitutive Promoter (Nopaline Synthase) for Plant Transformation and Protein-Protein Interaction Analysis

16:21 ○Mostafa ABOULELA[1]，Tsuyushi Nakagawa[2]（[1]Tottori University, [2]Shimane University）

2D23p13　イネ用の新規ゲノム編集ベクターの構築と評価

16:32 ○黒田昌治，山口知哉，山川博幹（農研機構・中央農研）

2D23p14　未利用リゾビウム属細菌の植物形質転換への応用

16:43 ○山本真司，坂井綾子，鈴木克周（広島大理）

2D23p15　アグロバクテリウムによる遺伝子導入効率を向上させる化合物の同定

16:54 ○木村光宏，磯部祥子（かずさ DNA 研究所）

p16〜p20 発表者の接続時間 17:05〜17:15

2D23p16　スクロース誘導性プロモーターを用いた *Nicotiana plumbaginifolia* 毛状根における GUS の継続的な高発現

17:15 ○本間洋平，山川　隆（東大院農）

2D23p17　Would *UGE* gene's overexpression directly influence an alteration of AGP polysaccharide?

17:26 ○TAYEBEH ABEDI[1]，Akio IWASAKI[2]，Toshihisa KOTAKE[2]，Nobukazu TANAKA[1]（[1]Hiroshima Univ., [2]Saitama Univ.）

2D23p18　AGP 糖鎖量の減少と植物形質との関係

17:37 ○岩田佳奈[1]，小竹敬久[2]，円谷陽一[2]，田中伸和[1]（[1]広島大院先端，[2]埼玉大院理工）

2D23p19　下流 ORF の翻訳効率を高める 5' 非翻訳領域における翻訳エンハンサー活性の検定

17:48 ○島田浩章[1]，青木裕美[1]，寺村　浩[1,3]，榎本裕介[1]，Schepetilnikov Mikhail[2]，Ryabova Lyubov[2]，佐々木忠将[1,4]，草野博彰[1]（[1]東京理科大・生物工，[2]ストラスブール大学，[3]現　神戸大・工，[4]現　理研）

2D23p20　新規な翻訳エンハンサーを利用した植物による高効率な物質生産の構築

17:59 ○今村智弘，青木裕美，佐藤航平，草野博彰，島田浩章（東京理科大・生物工）

D25 会場　午前の部（10:05〜12:05）

植物―生物間相互作用，タンパク質，酵素－機能，調節―

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

2D25a06　マツタケシロに含まれる抗菌物質の解明
10:05 ○西野勝俊[1]，城美沙緒[1]，大泉一也[1]，大倉龍起[1]，藤田　徹[2]，山田明義[3]，田中千尋[1]，笹森貴裕[4]，時任宣博[4]，平井伸博[1]（[1]京大院農，[2]京都府農水技セ，[3]信州大農，[4]京大化研）

2D25a07　花粉に含まれる蛍光物質の化学生態学（第 2 報）
10:16 ○川上真理[1]，森信之介[1]，大石雅典[1]，福井宏至[2]，後藤勝実[3]，月岡淳子[3]，佐久間正幸[1]，刑部正博[1]，杉岡稔朗[1]，平井伸博[1]（[1]京都大院農，[2]香川大名誉教授，[3]京都薬科大附属薬用植物園）

2D25a08　圃場環境下のダイズにおける生育過程を通じたフラボノイド含量の解析
10:27 ○山崎由実[1]，杉山暁史[1]，高瀬尚文[2]，矢崎一史[1]（[1]京都大生存研，[2]京都学園大バイオ環境）

2D25a09　連作における土壌細菌の菌叢の経時変化
10:38 ○宮崎恭之介，向　真樹，ディネッシュアディカリ，荒木希和子，久保　幹（立命館大）

2D25a10　AM 菌細胞壁キチン質に由来するオリゴ糖によるイネ菌根共生遺伝子の発現誘導
10:49 ○辰己雄亮，秋山康紀（阪府大院・生命環境）

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

2D25a11　マメ科植物ミヤコグサにおける SWEET 輸送体ファミリーの解析
11:10 ○吉水麻祐子[1]，杉山暁史[1]，齊田有桂[1]，高梨功次郎[1]，Davide Sosso[2]，Wolf B Frommer[2]，矢崎一史[1]（[1]京都大生存研，[2]Carnegie Institution）

2D25a12　サツマイモネコブセンチュウのエフェクターたんぱく質 MSP7 の機能解析
11:21 ○光増可奈子[1]，相良知実[1]，中上　知[1]，山口泰華[1]，佐野亮輔[2]，倉田哲也[2]，後藤デレック[3]，深尾陽一朗[2]，澤進一郎[1]（[1]熊本大院・自然科学，[2]奈良先端大，[3]北海道大）

2D25a13　寄生植物 *Striga hermonthica* 由来 D14L タンパク質の構造機能解析
11:32 ○徐　玉群[1]，宮川拓也[1]，中村英光[1]，中村　顕[1]，大塚　淳[1]，浅見忠男[1,2]，田之倉優[1]（[1]東大院・農生科，[2]JST・CREST）

2D25a14　ミヤコグサの根粒で発現するシステインプロテアーゼの解析
11:43 ○藤江　誠[1]，金原一真[2]，川崎　健[1]，山田　隆[1]（[1]広島大先端研，[2]広島大工）

2D25a15　イネの Ca^{2+} 依存性エンドヌクレアーゼである IREN は過敏感細胞死において認められる DNA 断片化の実行因子である
11:54 ○若園貴仁，大坪由佳，日比野孝紀，向由起夫，蔡　晃植（長浜バイオ大院バイオ）

D25 会場　午後の部（14:00〜17:59）

植物―タンパク質，酵素－機能，調節―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

2D25p01　ピレスリン生合成に関わる TcGLIP の機能および構造の解明(1)－ X 線結晶構造解析をめざした酵素の発現と精製－
14:00 ○宇都宮麻衣，松田和奈，廣瀬友璃香，伊原　誠，松田一彦（近畿大農・応生化）

2D25p02　ピレスリン生合成に関わる TcGLIP の機能および構造の解明(2)－ホスホン酸型反応機構依存的阻害剤の設計と合成－
14:11 ○明石拓也[1]，竹内孝幸[2]，宇都宮麻衣[2]，伊原　誠[2]，松田一彦[2]，平竹　潤[1]（[1]京大化研，[2]近畿大院・農・応生化）

2D25p03　ピレスリン生合成に関わる TcGLIP の機能および構造の解明(3)－阻害活性と阻害の様式－
14:22 ○竹内孝幸[1]，明石拓也[2]，宇都宮麻衣[1]，伊原　誠[1]，平竹　潤[2]，松田一彦[1]（[1]近大院農・応生化，[2]京大化研）

2D25p04　膜結合型ダイズ PDI ファミリー PDIL7 の同定及びその酵素学的性質の解析
14:33 ○奥田　綾，松崎元紀，三田竜太，増田太郎，裏出令子（京大院農・農学）

2D25p05　ダイズ種子貯蔵タンパク質の立体構造形成に関わる 2 種類の PDI ファミリーによる協働的作業の分子機構
14:44 ○松崎元紀，奥田　綾，小石原克典，三田竜太，廣瀬明歩，増田太郎，裏出令子（京大院農・農学）

p06〜p10 発表者の接続時間 14:55〜15:05

2D25p06　トチュウ（*Eucommia ulmoides*）由来ファルネシル二リン酸合成酵素の機能解析
15:05 ○梶浦裕之[1]，鈴木伸昭[1]，武野真也[1]，金子嘉信[2]，藤山和仁[3]，中澤慶久[1]（[1]日立造船株式会社，[2]大阪大院・酵母リソース，[3]大阪大・生物工学国際交流センター）

2D25p07　オジギソウ由来ミモシナーゼとシスタチオニン β-リアーゼの進化的関係
15:16 ○大貝茂希[1]，福田雅一[1]，屋　宏典[2]，多和田眞吉[1]（[1]琉球大農，[2]琉球大熱生研）

2D25p08　ヒヤシンス・トリプシンインヒビター前駆体の同定
15:27 ○塩井成留実，藤　秀美，村瀬優美，寺田成之（福岡大学理）

2D25p09　発熱植物ザゼンソウにおける PEBP 遺伝子ファミリーの同定および解析
15:38 ○稲葉靖子[1,2]，増子（鈴木）潤美[3]，前川春彦[2]，渡辺正夫[3]，稲葉丈人[2]（[1]宮崎大 TT 推進，[2]宮崎大農，[3]東北大院・生命科学）

2D25p10　ナス科植物ステロイドグリコアルカロイドの構造多様性に関わる生合成酵素の機能解析
15:49 ○中安　大[1]，梅基直行[2]，大山　清[3,4]，渡辺文太[5]，村中俊哉[6]，斉藤和季[7]，杉本幸裕[1]，水谷正治[1]（[1]神戸大院・農，[2]キリン・基盤研，[3]東工大院・理工，[4]理研 CSRS，[5]京大・化研，[6]大阪大院・工，[7]千葉大院・薬）

p11〜p15 発表者の接続時間 16:00〜16:10

2D25p11　アセロラにおけるアスコルビン酸生合成酵素 GDP-D-mannose pyrophosphorylase の転写調節機構の解明
16:10 ○近藤隆之，藤川愉吉，江坂宗春（広島大院生物圏）

2D25p12　ヌクレオシド三リン酸による ACC 酸化酵素の活性調節
16:21 ○飯尾野生，前川拓磨，宇野知秀，金丸研吾，山形裕士（神大院農・生機科）

2D25p13　植物細胞ゴルジ体局在ポリガラクツロナーゼの同定
16:32 ○井上嘉之[1]，神野　淳[2]，大橋貴生[3]，藤山和仁[3]，石水　毅[1]（[1]立命館大学・生命，[2]阪大・院理，[3]阪大・生工国際セ）

2D25p14　Characterization of wild-type and recombinant hydroxynitrile lyase from *Passiflora edulis* in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris* - effect of glycosylation on the enzyme stability
16:43 ○Aem NUYLERT[1]，Yuko Ishida[1,2]，Yasuhisa Asano[1,2]（[1]Toyama Pref, Univ.，[2]JST,ERATO）

2D25p15　シロイヌナズナ由来 PGDH の活性制御ドメインにおける含硫アミノ酸結合機構の生化学的解析
16:54 ○岡村英治，平井優美（理研 CSRS）

p16〜p19 発表者の接続時間 17:05〜17:15

2D25p16　バイオインフォーマティカルな検索によるシロイヌナズナシグナルペプチドペプチダーゼ（AtSPP）の基質探索とその検証
17:15 ○楠木賢太[1]，星　雅子[1]，石丸喜朗[1]，阿部啓子[1,2]，朝倉富子[1]（[1]東大院農生科・応生化，[2]神奈川科学技術アカデミー）

2D25p17　イネにおけるジベレリン代謝酵素の構造と機能解析
17:26 ○竹原清日[1]，三上文三[2]，樫尾　徹[1]，松岡　信[1]，

上口(田中)美弥子[1]（[1]名大・生物機能セ，[2]京大院・農）

2D25p18　傷害によって誘導される(3 *Z*)：(2 *E*)-ヘキセナールイソメラーゼの同定と機能解析

17:37　◦國嶋幹子，山内靖雄，水谷正治，杉本幸裕（神戸大院農）

2D25p19　ウリ科植物における残留性有機汚染物質の地上部移行メカニズム

17:48　◦岩渕　彩[1]，　後藤純弥[1]，　吉原亮平[2]，　池田健一[1]，井上加奈子[1]，乾　秀之[1,2]（[1]神戸大院農，[2]神戸大遺伝子）

D34 会場　午前の部（10:05〜12:05）

糖鎖生化学・糖鎖工学―構造，機能，その他―

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

2D34a06　エンド-*β*-N-アセチルグルコサミニダーゼを用いたB型肝炎ウィルス様粒子の糖鎖構造改変

10:05　◦岡本雄太[1]，　三崎　亮[1]，　飯嶋益巳[2]，　大橋貴生[1]，黒田俊一[2]，藤山和仁[1]（[1]大阪大生国セ，[2]名古屋大農）

2D34a07　Structural Characterization of Neutral *N*-Glycans of Representative Basidiomycetous Yeasts in the Class Agaricostilbomycetes, Subphylum Pucciniomycotina

10:16　◦Johnry MALOLES[1]，　Takao OHASHI[1]，Hiroko KAWASAKI[2]，Kazuhito FUJIYAMA[1]（[1]International Center for Biotechnology, Osaka University, [2]NITE Biological Resource Center（NBRC），National Institute of Technology and Evaluation（NITE））

2D34a08　ウォンバット新規ミルクオリゴ糖の構造解析

10:27　◦平山賢太郎[1]，福田健二[1]，齋藤忠夫[2]，メッサーマイケル[3]，浦島　匡[1]（[1]帯畜大畜産衛生，[2]東北大農，[3]シドニー大）

2D34a09　コケイバラからピルヴィン酸を置換するガラクタン硫酸の同定

10:38　◦田幸正邦[1,2]，　大利麟太郎[1]，　金城和隆[1]，　小西照子[1]，上地俊徳[1]（[1]琉球大生資科，[2]健康長寿科研）

2D34a10　生育環境の異なる魚種のコンドロイチン硫酸含有量と組成分析

10:49　◦上田健人[1]，　石田祐太[1]，　高浜佐季[1]，　片山優助[1]，今井利映[1]，武田尚子[2]，田村純一[1]（[1]鳥取大地域環境，[2]学振特研PD）

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

2D34a11　サケ鼻軟骨由来プロテオグリカンの酵素消化と生理機能評価

11:10　◦商　怡[1]，　安保亜衣子[2]，　岩間直子[1]，　平山智代[1]，五十嵐恵[1]，初山慶道[1]，内沢秀光[1]，工藤謙一[1]（[1]青森県産技セ・弘前研，[2]青森県産技セ・工総研）

2D34a12　ヘパラン硫酸糖鎖の硫酸化構造変化がもたらす生理機能の検証

11:21　◦小堺健生[1]，西田光貴[2]，北口公司[3]，矢部富雄[3]（[1]岐阜大院・応生科・応用生命，[2]岐阜大院・連農・生物資源，[3]岐阜大・応生科・応用生命）

2D34a13　Comparison of enzyme properties of three insect CMP-sialic acid synthetases

11:32　◦di wu[1,2,3]，　Akiko Fujita[1]，　Chihiro Sato[1,2,3]，Ken Kitajima[1,2,3]（[1]Bioscience & Biotechnology Center, Nagoya University, [2]Program for Leading Graduate Schools IGER, Nagoya University, [3]Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University）

2D34a14　*α* 2,6-シアル酸残基のメダカ初期胚における重要性

11:43　◦北島　健[1,2]，　呉　迪[1,2]，　田嶋克枝[1,2]，　丸山恵実[1,2]，足立朋子[1]，　橋本寿史[1]，　日比正彦[1]，　藤田明子[1,2]，　佐藤ちひろ[1,2]（[1]名大生物機能セ，[2]名大生命農学）

2D34a15　植物抗原性糖鎖ポリマーによる樹状細胞分化活性の解析

11:54　◦竹田直人，前田　恵，木村吉伸（岡大院・環境生命）

D34 会場　午後の部（14:00〜16:54）

糖鎖生化学・糖鎖工学―構造，機能，その他―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

2D34p01　小胞体グルコース転移酵素(UGGT)の非触媒ドメインが糖転移に与える影響

14:00　◦武田陽一[1]，　瀬古　玲[1]，　八須匡和[1]，　和泉雅之[2]，藤川紘樹[1]，梶原康宏[1,2]，伊藤幸成[1,3]（[1]JST-ERATO，[2]阪大院理，[3]理研 細胞制御化学）

2D34p02　ピレンを提示した糖タンパク質モデルに対するUGGTのグルコース転移活性

14:11　◦八須匡和[1]，瀬古　玲[1]，武田陽一[1]，藤川紘樹[1]，伊藤幸成[1,2]（[1]JST・ERATO，[2]理研・細胞制御化学）

2D34p03　粗面小胞体マンノシダーゼの構造と機能の解析

14:22　◦相川順一[1]，武田陽一[2]，瀬古　玲[2]，松尾一郎[3]，伊藤幸成[1,2]（[1]理研，[2]JST ERATO，[3]群馬大院工）

2D34p04　タンパク質の安定性における N 結合型糖鎖が付加したアスパラギン残基の役割の解析

14:33　宮崎剛亜，矢代浩之，西河　淳，◦殿塚隆史（東京農工大院農）

2D34p05　遊離 N-グリカンのタンパク質リフォールディング促進活性

14:44　◦田中達也[1]，　藤崎尚樹[2]，　前田　恵[1]，　二見淳一郎[3]，阿部義人[2]，植田　正[2]，木村吉伸[1]（[1]岡大院・環境生命，[2]九大院・薬学府，[3]岡大院・自然科学）

p06〜p10 発表者の接続時間 14:55〜15:05

2D34p06　新規植物複合型遊離 *N*-グリカン生成機構の解明

15:05　前田　恵[1,2]，◦江原菜津紀[1]，木村吉伸[1,2]（[1]岡大・農，[2]岡大院・環境生命）

2D34p07　糖タンパク質からアスパラギン結合型糖鎖を容易に遊離する酵素生産菌と産生酵素の性質

15:16　高谷尚弥，竹内朋史，◦伊藤和央（阪市大院・理）

2D34p08　*β*-1,3-1,6-グルカンによる難水溶性物質の分散(1)―Renature-*β*-1,3-1,6- グルカンをホストとする中性条件での難水溶性物質の分散法の開発―

15:27　◦中川暁史[1]，　鈴木利雄[2]，　甲元一也[1]（[1]甲南大FIRST，[2]阪市大院工）

2D34p09　*β*-1,3-1,6-グルカンにおける難水溶性物質の分散(2)―*β*-1,3-1,6-グルカンに包接された薬理活性物質シコニンの安定性―

15:38　◦児玉歩夢[1]，　中川暁史[1]，　鈴木利雄[2]，　谷口泰三[3]，甲元一也[1]（[1]甲南大 FIRST，[2]阪市大院工，[3]姫路獨大薬）

2D34p10　*β*-1,3-1,6- グルカンによる難水溶性物質の分散(3)―Renature-*β*-1,3-1,6- グルカンと水素結合性化合物を利用する酸化チタン粒子の分散法の開発―

15:49　◦小坂美恵[1]，　中川暁史[1]，　鈴木利雄[2]，　井戸垣秀聡[3]，甲元一也[1]（[1]甲南大 FIRST，[2]阪市大院工，[3]ダイソー(株)）

p11〜p14 発表者の接続時間 16:00〜16:10

2D34p11　バイオ医薬品創出に向けた Endo-M 基質特異性の改変

16:10　◦加藤紀彦[1]，　坂口広大[1]，　片山高嶺[1]，　熊田純一[2]，松崎祐二[2]，山本憲二[1]（[1]石川県大，[2]東京化成工業）

2D34p12　酵母を用いたヒト *O*-結合型糖鎖 Core3 構造の生産

16:21　◦齋藤扶美恵[1,2]，千葉靖典[1]，金谷章生[2]（[1]産総研・糖鎖創薬，[2](株)グライコジーン）

2D34p13　蛍光標識化スフィンゴ糖脂質による細胞内オルガネラの動態解析

16:32　◦新井健太[1]，吉原　央[2]，蟹江善美[3]，樺山一哉[4]，蟹江　治[1,3]（[1]東海大院 工，[2]東海大 工，[3]東海大 糖鎖研，[4]大阪大院 理）

2D34p14　ミルレクチン CFL-I と CFL-II の糖鎖アレイ解析とタンパク質構造解析

16:43　前田　恵[1,2]，◦縄田苑子[1]，谷　美里[2]，木村吉伸[1,2]（[1]岡大・農，[2]岡大院・環境生命）

F11 会場　午前の部（9:11〜11:54）

動物―生理・栄養，生体機能，生体制御―

a02〜a05 発表者の接続時間 9:01〜9:11

2F11a02　中枢性 Sirt1 による食餌嗜好性制御機構の解析
9:11 ○松居　翔，佐々木努，橋本博美，小林雅樹，北村忠弘（群馬大生調研）

2F11a03　摂食行動における LGR4 の機能解析
9:22 ○大塚彩乃[1]，平岡優一[1]，下村健寿[2]，西森克彦[1]（[1]東北大農，[2]福島医大）

2F11a04　持久運動時の脳報酬系機能に関する研究
9:33 ○石井　仁，横山小夜香，井上和生，伏木　亨（京都大農）

2F11a05　脳内自己刺激を用いた中枢性疲労の新規測定法確立とその応用
9:44 ○井樋聡美，井上和生，伏木　亨（京大農）

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

2F11a06　カプサイシンがマウスの行動量へ与える影響
10:05 ○天明裕介[1]，今井真介[1]，池田祐子[2]，栗城大輔[2]，鎌形真世[2]，三澤憲一郎[2]，柴田重信[2]（[1]ハウス食品グループ本社，[2]早稲田大・先進理工）

2F11a07　内側扁桃体 GABA ニューロンにおけるオキシトシン受容体欠損は，社会性認知とシナプス構造に異常を引き起こす
10:16 ○宮崎慎至，平岡優一，日出間志寿，西森克彦（東北大農）

2F11a08　単独隔離ストレス負荷は睡眠期の血中コルチコステロン分泌を高める
10:27 ○下位香代子[1,2]，青島良輝[2]，榊原啓之[3]（[1]静岡県大食品栄養，[2]静岡県大大学院生活健康，[3]宮崎大農）

2F11a09　オオカミ尿中のピラジン化合物はエゾシカの警戒行動誘発因子である
10:38 ○長田和実[1]，宮園貞治[2]，柏柳　誠[2]（[1]北海道医療大，[2]旭川医大）

2F11a10　変形性膝関節症動物モデルの歩行解析
10:49 ○野村義宏[1]，中島正博[1]，上濱春佳[1]，渡部睦人[1]，松田研史郎[2]，田中あかね[2]，松田浩珍[2]（[1]農工大農・硬蛋研，[2]農工大農・共同獣医）

a11〜a14 発表者の接続時間 11:00〜11:10

2F11a11　エストロゲン受容体 β アゴニストであるダイゼインはエストロゲンによる筋重量減少を抑制する
11:10 ○小川真弘，原田直樹，山地亮一（大阪府大院・生命環境）

2F11a12　間葉系幹細胞から骨芽細胞への Wnt シグナルによる分化制御
11:21 ○田中　牧[1]，谷口実由紀[1]，鬼丸祐二[1]，鋳方綾香[1]，細田明美[2]，金　東浩[1]，佐伯　茂[1]（[1]大阪市大・院生活科学・生体情報，[2]東京医療保健大・医療栄養）

2F11a13　Pd ナノコロイドは酸化劣化による Pt ナノコロイドの SOD/カタラーゼ活性減少を抑制する
11:32 ○澁谷修一[1]，小澤裕介[1]，横手幸太郎[2]，清水孝彦[1]（[1]千葉大院医 先進加齢医学，[2]千葉大院医 細胞治療内科学）

2F11a14　アルツハイマー認知症患者の血液における脂質レベルの変化
11:43 ○山下慎司[1,2]，喜古健敬[2]，仲川清隆[2]，荒井啓行[3]，宮澤陽夫[2,4]（[1]帯畜大，[2]東北大院農，[3]東北大医，[4]東北大未来技セ）

F11 会場　午後の部（14:00〜17:59）

動物―生理・栄養，生体機能，生体制御―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

2F11p01　食餌誘導性肥満モデルマウスにおける系統間の比較
14:00 ○江口　輝[1]，船戸里香[1]，大村　妃[2]，小林　裕[2]，中永真樹[2]，林　浩和[2]，本山陽菜[2]，細野　崇[1,2]，関泰一郎[1,2]（[1]日本大院生資科，[2]日本大生資科）

2F11p02　摂食時間制限による肥満改善効果に関する研究
14:11 ○久宮彩乃[1]，浅井成美[2]，香門里菜[2]，佐々木佳奈[2]，林安津馬[2]，関泰一郎[2]，細野　崇[2]（[1]日本大院生資科，[2]日本大生資科）

2F11p03　味噌と運動が高脂肪食誘導性肥満に与える影響
14:22 ○北野泰奈[1]，亀井康富[2]，都築　毅[1]（[1]東北大院農，[2]京都府立大）

2F11p04　メタボリック症候群モデル動物のエネルギー代謝関連遺伝子発現に対する寒冷暴露の影響
14:33 ○生谷美紗都[1]，出口美輪子[1]，海老原伸[1]，細田明美[2]，山岸あづみ[3]，金　東浩[1]，佐伯　茂[1]（[1]大阪市大・院生活科学，[2]東京医療保健大・医療栄養，[3]山形大・地域教育）

2F11p05　絶食，及び低温環境が α 酸化，β 酸化及び ω 酸化経路による脂肪酸代謝に及ぼす影響
14:44 ○山本　覚，桑田尚平，宮尾夕子，吉崎隆之，太田雅也（福山大　生命工）

p06〜p10 発表者の接続時間 14:55〜15:05

2F11p06　プロスタグランジン D_2 に起因する脂質メディエーターの解析
15:05 柴田貴広，○犬塚恵美，中島史恵，内田浩二（名大院生命農）

2F11p07　肥満に伴い脂肪組織に浸潤したマクロファージがベージュ脂肪細胞発現を抑制する
15:16 ○新田貴大[1]，坂本智弥[1]，丸野晃嗣[1]，後藤　剛[1,2]，高橋信之[1,2]，河田照雄[1,2]（[1]京大院農・食品生物，[2]京大生理化学研究ユニット）

2F11p08　分岐鎖アミノ酸代謝亢進による糖・脂質代謝に対する影響
15:27 ○北浦靖之，門田吉弘，加藤里奈，太田美樹，石川卓弥，森下由佳子，徐　旻珺，下村吉治（名古屋大・生命農）

2F11p09　日常的な糖質飲料の摂取がマウスの肥満，耐糖能に及ぼす影響
15:38 ○香門里菜[1]，久宮彩乃[2]，江口　輝[2]，細野　崇[1]，関泰一郎[1]（[1]日本大生資科，[2]日本大院生資科）

2F11p10　タンパク質低栄養条件下で誘導される線維芽細胞増殖因子(FGF)21 の脂質代謝における役割
15:49 ○尾崎　依[1]，小西守周[2]，伊藤信行[3]，高橋伸一郎[4]，竹中麻子[1]（[1]明治大・農・農化，[2]神戸薬科大・薬，[3]京大・院・薬，[4]東大・院・農生化）

p11〜p15 発表者の接続時間 16:00〜16:10

2F11p11　肝細胞の分化ステージとリポタンパク質産生能との関係
16:10 ○佐々木玲[1,3]，木村文子[2]，三浦瑞穂[2]，高橋純一郎[2]，小林正之[3]，畠　恵司[1]（[1]秋田県総食研，[2](株)スカイライト・バイオテック，[3]秋田県大院生資）

2F11p12　細胞老化関連因子 SMARCD1 による肝機能制御に関する研究
16:21 ○児崎智美[1]，井上千聡[1]，續　祐美[1]，鵜殿美弥子[1]，片倉喜範[2]（[1]九大院・生資環，[2]九大院・農院）

2F11p13　Long-Evans Cinnamon ラットをモデルとしたコーヒーによる肝炎抑制効果の肝臓分子機構の解明
16:32 ○片山雅史[1]，榊原啓之[2]，大友由紀子[1]，西森克彦[1]，福田智一[1]（[1]東北大学大学院農学研究科，[2]宮崎大学農学部）

2F11p14　アスコルビン酸欠乏による肝臓の STAT3 の活性化とその制御下遺伝子の発現解析
16:43 ○川出野絵[1]，徳田優希[1]，辻野祥伍[1]，小林美里[1]，村井篤嗣[1]，重岡　成[2]，堀尾文彦[1]（[1]名古屋大院生命農・応用生命，[2]近畿大農・バイオサイエンス）

2F11p15　肝臓におけるアミノ酸欠乏に応答したインスリン受容体基質(IRS)-2 量の増加とトリグリセリドの蓄積の新規分子機構
16:54 ○西　宏起[1]，亀井宏泰[1]，山中大介[1]，赤西成美[1]，

森　友美[1]，　合田祐貴[1]，　豊島由香[2]，　竹中麻子[3]，　潮　秀樹[1]，加藤久典[4]，千田和広[1]，伯野史彦[1]，高橋伸一郎[1]（[1]東大農，[2]日医・老人病研，[3]明大農，[4]東大・総括）

p16〜p19 発表者の接続時間 17:05〜17:15

2F11p16　コンジェニックマウスを用いた食餌誘導性脂肪肝感受性遺伝子の存在領域の解析

17:15　◦鈴木　京[1]，　小林美里[1]，　大野民生[2]，　辻村絢子[1]，村井篤嗣[1]，堀尾文彦[1]（[1]名大院生命農・応用分子生命科，[2]名大院医学系）

2F11p17　薬物誘導性急性肝障害に及ぼす線溶阻害剤の影響

17:26　◦三浦　徳[2]，　鎌倉美和子[1]，　久保美咲[1]，　御子柴直紀[1]，細野　崇[1,2]，関泰一郎[1,2]（[1]日本大生資科，[2]日本大院生資科）

2F11p18　*trans,trans*-2,4-デカジエナールは，ラットにおいて腸管への作用を介して胃排出を抑制する

17:37　◦矢萩明日香[1]，　比良　徹[1]，　西村紗希[2]，　境野眞善[2]，山下貴稔[2]，原　　博[1]（[1]北海道大・院農・応生科，[2](株)J-オイルミルズ　基盤研究所）

2F11p19　Modulation of immune-related gene expressions in mesenteric lymph nodes of the rats fed cholic acid-supplemented diet

17:48　◦GA HYUN JOE[1]，Misaki Tsuji[1]，Reika Yoshitsugu[1]，Keidai Kikuchi[1]，Takuma Nose[1]，Tada Koji[1]，Hidehisa Shimizu[1]，Jayoung Lee[1]，Nanako Baba[1]，Masahito Hagio[2]，Satoru Fukiya[1]，Atsushi Yokota[1]，Hiroshi Hara[1]，Satoshi Ishizuka[1]（[1]Division of Applied Bioscience, Graduate School of Agriculture, Hokkaido University, [2]Faculty of Life Science, Toyo University）

F12 会場　午前の部（9:11〜11:54）

動物―細胞－情報伝達，細胞応答―

a02〜a05 発表者の接続時間 9:01〜9:11

2F12a02　タンパク質合成制限によるヒト細胞老化の抑制

9:11　◦高氏裕貴[1]，　和田卓巳[1]，　工藤　生[1]，　三木健輔[1,2]，藤井道彦[1]，鮎澤　大[1,2]（[1]横浜市大生命ナノシステム，[2]イチバンライフ(株)）

2F12a03　表皮角化細胞の増殖を促進するアマラキ(*Emblica officinalis*)含有成分の解析

9:22　◦森野香子[1]，山上義巳[1]，三木健輔[1]，Mohammad N Hossain[2]，鮎沢　大[1,2]，藤井道彦[1]（[1]横浜市大生命ナノシステム，[2]イチバンライフ(株)）

2F12a04　可視単色光によるアポトーシス誘導メカニズムの解明

9:33　◦中村咲貴，西尾貴史，寺田千里，渡邊博之，薬袋裕二，佐藤一臣（玉川大農）

2F12a05　ブルーライトによるメラニン生成促進効果の検討

9:44　◦西尾貴史，佐藤一臣（玉川大農）

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

2F12a06　HT22 細胞におけるグルタミン酸誘導性細胞死の再評価

10:05　◦佐藤和典，　山中祐樹，　朝倉康晴，　大谷-金子律子，根建　拓（東洋大生命）

2F12a07　中枢神経系癌細胞の細胞増殖関連タンパク質に対するグリチルレチン酸の影響

10:16　山口真弘[1]，服部孝弘[1]，野下俊朗[2]，梅津博紀[3]，◦山口秀明[1]（[1]名城大薬，[2]県立広島大生命，[3]岐阜聖徳学園大）

2F12a08　血清アルブミンによるシクロオキシゲナーゼ－2 の発現誘導

10:27　◦中島史恵，柴田貴広，内田浩二（名大院生命農）

2F12a09　マウス小腸陰窩オルガノイドにおけるセロトニン自己分泌刺激

10:38　濱田晃弘[1]，　鶴田剛司[2]，　青木(吉田)綾子[3]，　◦園山　慶[2]（[1]北大院生命，[2]北大院農，[3]農研機構・畜草研）

2F12a10　TGF-β によるマスト細胞機能の抑制を仲介する転写因子 Ehf の機能解析

10:49　◦中野信浩[1]，　山崎　晋[1]，　西山千春[1,2]，　大塚宜一[1]，清水俊明[1]，奥村　康[1]，小川秀興[1]（[1]順天堂大院・医，[2]東京理科大・基礎工）

a11〜a14 発表者の接続時間 11:00〜11:10

2F12a11　加齢に伴う B 細胞機能変化における MAPKp38 の関与

11:10　◦藤木　司[1]，片倉喜範[2]，岸原健二[1]（[1]長崎国際大薬，[2]九大院農院）

2F12a12　C2C12 筋管細胞における収縮依存的な RANTES の分泌制御

11:21　◦佐藤　整，柴垣拓也，佐藤和典，根建　拓（東洋大生命科学）

2F12a13　ナトリウム利尿ペプチド受容体 C の新規結合タンパク質同定

11:32　◦宮本賢治，清水友紀，松田真弥，辻　明彦，湯浅恵造（徳島大学）

2F12a14　SUMO リガーゼ PIASy によるパーキンソン病関連転写因子 PARIS の転写活性調節

11:43　◦西田　有，山田芳司（三重大・生命科学研究支援センター）

F12 会場　午後の部（14:00〜17:59）

動物―細胞－情報伝達，細胞応答，細胞工学－細胞培養，組織培養，物質生産，その他―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

2F12p01　ヒトのミトコンドリア NAD キナーゼの細胞外環境に応答したリン酸化修飾

14:00　川畑　豊[1]，村田幸作[2]，◦河井重幸[1]（[1]京大院農，[2]摂南大理工）

2F12p02　Death-associated protein kinase-2(DAPK2)と tubulin の相互作用解析及びアポトーシスへの関連性

14:11　◦一色衣香[1,2]，平瀬大志[1]，辻　明彦[1]，湯浅恵造[1]（[1]徳島大 STS 研究部，[2](独)日本学術振興会特別研究員 DC1）

2F12p03　アポトーシス関連因子 ALG-2 と CDIP1 の相互作用とアポトーシスへの関与

14:22　◦鈴木千尋，京　卓志，高原照直，柴田秀樹，牧　正敏（名大院生命農・応用分子生命科）

2F12p04　カルシウム結合タンパク質 ALG-2 の 2 型結合モチーフに基づいた新規相互作用タンパク質探索

14:33　◦松尾里奈，　小島享介，　張　維，　高橋　健，佐々木桂奈江，高原照直，柴田秀樹，牧　正敏（名大院生命農・応用分子生命科）

2F12p05　ALG-2 とストア作動性 Ca^{2+}流入負制御因子 SARAF の Ca^{2+}依存的相互作用

14:44　◦張　維，　小島享介，　佐々木桂奈江，　川崎真依，高橋　健，　高原照直，　柴田秀樹，　牧　正敏（名大院生命農・応用分子生命科）

p06〜p10 発表者の接続時間 14:55〜15:05

2F12p06　アミノ酸による細胞内カルシウム上昇機構の解析

15:05　◦中村奈央，井上国子，高原照直，柴田秀樹，牧　正敏（名大院生命農・応用分子生命科）

2F12p07　グルココルチコイドとアンドロゲンの拮抗作用による膵 β 細胞のアポトーシス制御

15:16　◦原田直樹[1]，中野長久[2]，乾　　博[3]，山地亮一[1]（[1]大阪府大・生命環境，[2]大阪女子短大，[3]大阪府大・栄養）

2F12p08　膵 β 細胞形成に及ぼす胎児期の男性ホルモンの影響

15:27　◦甲木孝弘[1]，　原田直樹[1]，　中野長久[2]，　乾　　博[3]，山地亮一[1]（[1]大阪府大院・生命環境，[2]大阪女子短大，[3]大阪府大院・栄養）

2F12p09　LGR4 はプロゲステロンシグナルを介した子宮受容能獲得に必要である

15:38　○木田奉代[1]，　大山一徳[1]，　曽根瑞季[1]，　小泉雅江[2]，日出間志寿[1]，西森克彦[1]（[1]東北大院農，[2]愛媛大医）

2F12p10　内因性代謝物質による HIF-1 α の活性制御

15:49　○芹沢茉里子[1,3]，　Tariq Mohammad[1,4]，　前田里子[1]，中尾洋一[3]，伊藤昭博[1,2,5]，吉田　稔[1,2,4,5]（[1]理研，化学遺伝，[2]理研　環境資源，ケミカルゲノミクス，[3]早大院先進理工，[4]埼玉大院理工，[5]科技機構，CREST）

p11〜p15 発表者の接続時間 16:00〜16:10

2F12p11　プロリン異性化酵素 Pin1 によるタウキナーゼの活性制御の解析

16:10　○馬場貴大，金井研太，日高将文，内田隆史（東北大農）

2F12p12　錐体 cGMP Phosphodiesterase 6 のシャペロン共発現下における機能的発現

16:21　○田端勇人，長岡健斗，尾谷優磨，嶺岸卓徳，奥田祐介，岡崎修治，赤沼元気，石塚盛雄（中央大学）

2F12p13　Stabilon 融合タンパク質を用いた iPS 細胞から肝細胞への分化誘導法の確立

16:32　○峰岸紋子[1]，　相原絵理[2]，　細野　崇[1]，　舛廣善和[1]，花澤重正[1]，関泰一郎[1]（[1]日本大院生資科，[2]日本大生資科）

2F12p14　ROCK 阻害剤による ES 細胞から神経細胞への分化の促進メカニズム

16:43　○上芝原佑[1]，川口英夫[1]，清水範夫[2]（[1]東洋大院生命科学，[2]東洋大バイオ・ナノエレクトロニクス研究センター）

2F12p15　p53 ノックアウトマウス軟部腫瘍由来細胞株におけるグルタミンの還元的代謝の解析

16:54　○岡橋伸幸[1]，　松田史生[1]，　河野　晋[2]，　高橋智聡[2]，清水　浩[1]（[1]阪大院情報，[2]金沢大がん研）

p16〜p19 発表者の接続時間 17:05〜17:15

2F12p16　食品成分摂取による TRP チャネルを介した体温調節

17:15　○森　紀之，浦田朋美，福渡　努（滋賀県大人間文化）

2F12p17　デオキシニバレノールの食欲抑制メカニズム

17:26　○富永美沙，　只石　幹，　百中佑果，　横瀬ちひろ，市川沙織，坂下文子，服部一夫（東農大応生科・栄養）

2F12p18　昆虫のミトコンドリア膜 ADP/ATP 輸送体の遺伝子と機能の特性

17:37　管原亮平[1]，　上樂明也[1]，　篠原康雄[2]，　三芳秀人[3]，○塩月孝博[1]（[1]農生資研，[2]徳島大疾患プロテオゲノム研究セ，[3]京大院農）

2F12p19　トランスクリプトミクスを用いた新規神経芽腫関連遺伝子の探索

17:48　○多田一風太[1]，　霞　千明[1]，　坪田庄真[2]，　岸田　聡[2]，門松健治[2]，池松真也[1]（[1]沖縄高専専攻科，[2]名大病理）

F22 会場　午前の部（9:00〜11:54）

食品―食品機能・栄養－酸化，抗酸化，老化―

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

2F22a01　笹蒲鉾を発酵させて開発を試みた新規魚醤の抗酸化能

9:00　○原田和樹[1]，　福田　翼[1]，　和田律子[1]，　武智美佳[2]，鈴木秀得[2]，崎村祥太郎[1]，前田俊道[1]，佐々木悦郎[3]（[1]水大校･院，[2]水大校・食科，[3]阿部蒲鉾店）

2F22a02　タマネギの総ケルセチン含有量測定法の妥当性確認と北海道産タマネギ品種のケルセチン含有量測定

9:11　○渡辺　純[1]，　室　崇人[2]，　柳田大介[3]，　竹林　純[4]，山岸　喬[5]，石川(高野)祐子[1]（[1]農研機構食総研，[2]農研機構北農研，[3]道総研北見農試，[4]国立健栄研，[5]北見工大）

2F22a03　収穫時期の違いが国産ハーブの抗酸化能に及ぼす影響について

9:22　○上田　学[1]，　田口裕基[2]，　渡辺　純[1]，　荻田　佑[1]，後藤真生[1]，新井　亮[2]，氏原克人[2]，石川(高野)祐子[1]（[1]農研機構　食総研，[2]エスビー食品株式会社）

2F22a04　ゴボウスプラウトの抗酸化能とポリフェノール成分

9:33　○高橋亮祐[1]，阿部　準[2]，村山里子[2]，原　　崇[1,2]，城斗志夫[1,2]（[1]新潟大農，[2]新潟大院自然科学）

2F22a05　バラや月桃などの抗酸化および抗糖化活性

9:44　○西本有貴，猪飼勝重，小林常吉（白井松新薬株式会社）

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

2F22a06　糀の抗酸化活性評価と関連するポリフェノールの分析

10:05　○中島加奈子[1]，山崎ザキ京子[2]，木戸みゆ紀[3]，林真由美[3]，井口晃徳[3]，重松　亨[3]（[1]新潟薬大・産官学，[2]山崎糀屋，[3]新潟薬大・応生科）

2F22a07　グリル加熱がナスの健康特性成分に及ぼす影響

10:16　○内田健太郎，冨田晴雄，竹森利和（大阪ガス株式会社）

2F22a08　脂質過酸化反応におけるチオール化合物と各種抗酸化物の併用効果解析

10:27　○山内良子[1]，　小浜友紀子[2]，　小林弘司[1]，　松井利郎[3]，石川洋哉[1,2]（[1]福岡女子大学国際文理，[2]福岡女子大学院人間環境，[3]九州大学院農）

2F22a09　焙煎コーヒーによるキサンチンオキシダーゼ阻害-酢酸エチル可溶画分の活性と活性物質-

10:38　○本田沙理[1]，西川由華[1]，増田晃子[2]，森山顕登[2]，増田俊哉[1]（[1]徳島大院・総合，[2]四国大・生活）

2F22a10　豚筋肉由来ペプチドの抗酸化作用―ラジカルによるオボアルブミン分解の抑制―

10:49　○粂井和奈，井上　航，江草(雑賀)愛，西村敏英（日本獣医生命科学大応用生命）

a11〜a14 発表者の接続時間 11:00〜11:10

2F22a11　セロトニン由来キノン体のヒト LDL 修飾と細胞への作用

11:10　○菅　尚子[1]，　石坂朱里[1,2]，　北元憲利[1,2]，　中村宜督[3]，加藤陽二[1,2]（[1]兵庫県大・環境人間，[2]兵庫県大・先端食科学研究センター，[3]岡山大院農・環境生命科学）

2F22a12　宮崎県産シイタケおよびその加工品の抗酸化ストレス作用について

11:21　○近藤知巳[1,2]，　中島有紀子[1]，　渡辺朋子[1]，　吉山佳世[1]，黒木勝久[2]，福井敬一[1]，水光正仁[2]，榊原陽一[2]（[1](一社)宮崎県 JA 食品開発研究所，[2]宮崎大学大学院農学工学総合研究科）

2F22a13　植物オキシリピン 12-オキソ-フィトジエン酸の酸化ストレス誘発神経細胞障害に対する保護効果

11:32　○多木 - 中野希[1,2]，　小寺　淳[2]，　太田啓之[1]（[1]東工大・院生命理工学，[2](株)田辺三菱製薬・探索研）

2F22a14　ピロロキノリンキノン(PQQ)とその誘導体の生理活性の比較

11:43　○中路昌志[1]，池本一人[2]，中野昌彦[2]，山田康枝[1]（[1]近畿大･院・工，[2]三菱瓦斯化学(株)）

F22 会場　午後の部（14:11〜17:59）

食品―食品機能・栄養－酸化，抗酸化，老化―

p02〜p05 発表者の接続時間 14:01〜14:11

2F22p02　カニクイザル由来 UDP-グルクロン酸転移酵素におけるポリフェノール類代謝能の解析

14:11　○高平梨可[1]，　西川美宇[1]，　宇野泰広[2]，　池中良徳[3]，石塚真由美[3]，榊　利之[1]，生城真一[1]（[1]富山県大・工・生物工，[2]新日本科学，[3]北大院・獣医・環境獣医）

2F22p03　青森県産カシスの in vitro および in vivo 試験系によるゲノムディフェンダー活性評価

14:22　○山本　歩[1]，　廣内篤久[2]，　中嶋　奏[1]，　川守田早織[1]，奥谷悠吾[1]，上平好弘[3]，加藤陽治[4]（[1]八戸工業高等専門学校物質工学科，[2]環境科学技術研究所，[3]弘前大学地域共同センター，[4]弘前大学教育学部）

2F22p04　麹菌が産生する環状ペプチド　デフェリフェリクリシンによるマウス血清尿酸値の低減効果
14:33　○大浦　新，村上直之，入江元子，堤　浩子，秦　洋二（月桂冠総研）

2F22p05　育毛効果を有するアーユルヴェーダハーブの探索
14:44　○三木健輔[1]，米倉佑香[1]，高氏裕貴[1]，Mohammad N HOSSAIN[2]，鮎沢　大[1,2]，藤井道彦[1]（[1]横浜市大・生命ナノ，[2]イチバンライフ(株)）

p06〜p10 発表者の接続時間 14:55〜15:05

2F22p06　源生林あしたばの暑熱ストレスに対する精巣保護効果
15:05　○國府大智，阿部友紀子，鈴木望美，鈴木志織，柏原真一，吉田滋樹，浅野敦之，宮崎　均（筑波大生命環境）

2F22p07　酸化ストレスと創傷への糖類の効果
15:16　○山田康枝，鈴木直人，安藤正隆，片井優二，中西　慧（近畿大工）

2F22p08　ケラチノサイトのバリア機能に対するウシラクトフェリンの促進効果
15:27　○内田　良[1,2]，青木玲二[1]，青木(吉田)綾子[1]，田島淳史[2,3]，鈴木チセ[1]，高山喜晴[1]（[1]農研機構・畜草研，[2]筑波大生物資源，[3]筑波大院生命環境）

2F22p09　酵素合成グリコーゲンは，酸化ストレスを軽減することで炎症性腸疾患を改善する
15:38　○三谷塁一[1]，吉岡泰淳[2]，古屋敷隆[3]，芦田　均[1]（[1]神戸大院農，[2]神戸大自然科学，[3]江崎グリコ(株)健康科学研究所）

2F22p10　発酵乳ケフィアが筋肉細胞のエネルギー代謝に及ぼす効果
15:49　○原田大輔[1]，松山豪彦[1]，徳丸浩一郎[2]，白畑實隆[1,3]，照屋輝一郎[1,3]（[1]九大院生資環，[2]日本ケフィア，[3]九大農院）

p11〜p15 発表者の接続時間 16:00〜16:10

2F22p11　乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* の脂肪酸代謝物による酸化ストレス防御機構の活性化
16:10　○古元秀洋[1]，ターナットナンティルッチャナー[1]，久米利明[2]，朴　時範[3]，北村苗穂子[4]，岸野重信[4]，小川　順[4]，平田　孝[1,5]，菅原達也[1]（[1]京大院農　応用生物科学，[2]京大院薬，[3]京大院農 産業微生物，[4]京大院農 応用生命科学，[5]四條畷学園大）

2F22p12　運動負荷および肥満がカドミウム体内分布におよぼす影響
16:21　○吉城由美子，西尾尚子，村中穂乃花，木村　愛，小櫻沙貴（石川県大）

2F22p13　食事由来酸化コレステロールの生体内抗酸化システムへの影響
16:32　○関原花会，木村　優，長田恭一（明治大農）

2F22p14　高脂肪食摂取は老化による脂質吸収能低下を抑制する
16:43　○山本和史，都築　毅（東北大院農）

2F22p15　卵黄摂取によるマウス加齢性難聴の抑制　〜若齢マウスを利用した老化の短期評価系〜
16:54　○大池秀明，一法師克成，小堀真珠子（農研機構/食総研）

p16〜p19 発表者の接続時間 17:05〜17:15

2F22p16　光老化モデルマウスに対するラクトフェリンおよびラクトフェリン分解物投与によるしわ形成抑制効果
17:15　○村田麻衣[1,2]，大久保俊平[2]，柿田ひとみ[2]，若林裕之[1]，山内恒治[1]，阿部文明[1]，野村義宏[2]（[1]森永乳業・食基研，[2]東農工大農・硬蛋研）

2F22p17　アロエステロール® 含有 AVGP による皮膚弾力性低下予防作用のメカニズムの解明
17:26　○齊藤万里江，田中美順，三澤江里子，姚　瑞卿，山内恒治，阿部文明（森永乳業・食基研）

2F22p18　レスベラトロール配糖体を豊富に含むメリンジョ種子抽出物の皮膚老化に対するアンチエイジング作用
17:37　○渡辺憲史[1]，澁谷修一[1]，小澤裕介[1]，岡本直樹[2]，河村和弘[2]，清水孝彦[1]（[1]千葉大学院・医　先進加齢医学，[2]聖マリアンナ医科大学　産婦人科）

2F22p19　DNA マイクロアレイ解析によるイミダゾールジペプチドの機能性及びその分子基盤の解明
17:48　○原田額郎[1]，久恒辰博[2]，松田博史[3]，戸塚　護[4]，松本貴之[5]，片倉喜範[6]（[1]九大院シス生，[2]東大院新領域，[3]国立精神・神経医療研究センター，[4]東大院農生科，[5]日ハム中研，[6]九大院農院）

F26 会場　午前の部（9:11〜12:05）

食品―食品化学－糖質，脂質―

a02〜a05 発表者の接続時間 9:01〜9:11

2F26a02　粒子径制御技術を用いた抗酸化製剤の高反応性化
9:11　○門脇章夫，檜山真一郎，大久保泰宏（太陽化学株式会社）

2F26a03　脂肪酸が苦味を抑制する機序の解明－脂肪酸と苦味物質の複合体が凝集することにより苦味が抑制される－
9:22　○大木伽耶子，山下治之，寺田　透，石丸喜朗，阿部啓子，朝倉富子（東大農）

2F26a04　米の食味と糖含有量の関係について
9:33　○横野一歩[1]，高津地志[2]，藤田明子[2]，岡田芳治[1]，野村正人[1]（[1]近畿大・工，[2](株)サタケ）

2F26a05　マウスリック試験を用いた甘味錯覚効果の客観的評価
9:44　○河合崇行，日下部裕子（農研機構・食品総合研究所）

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

2F26a06　モデルメラノイジン分解微生物の探索と分解生成物の性質
10:05　松井芳光[1]，中西康博[1]，山本祐司[1]，保坂好江[2]，猪子　諒[1]，能見祐理[2]，大塚　譲[2]，○本間清一[2]（[1]東京農業大学応用生物学科，[2]お茶の水女子大学生活環境教育研究センター）

2F26a07　耐熱性 *Geobacillus* sp. のプルラナーゼ遺伝子の取得と大腸菌での発現について
10:16　○内野昌孝[1]，入澤友啓[2]，高野克己[1]（[1]東京農大，[2]理研）

2F26a08　アミロース含量の異なるいくつかの大麦澱粉の構造と性質
10:27　○井ノ内直良[1]，高橋飛鳥[2]，増原大成[1]，中浦嘉子[1]，吉岡藤治[2]（[1]福山大生命工，[2]近中四農研セ）

2F26a09　エリスリトールは *Porphyromonas gingivalis* 分岐鎖アミノ酸代謝経路に作用する
10:38　○橋野恵衣[1]，久保庭雅恵[1]，坂中哲人[1]，長　洋[2]，天野敦雄[1]（[1]阪大歯，[2]三菱化学フーズ）

2F26a10　食用海藻に含まれる単糖及び二糖の HPLC による分析
10:49　○垣田浩孝，小比賀秀樹（産総研健康工学）

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

2F26a11　日本食の脂肪酸組成が内臓脂肪蓄積に及ぼす影響
11:10　○坂本有宇，都築　毅（東北大院農）

2F26a12　琉球在来豚(アグー)の脂肪分析：脂肪酸組成の特長
11:21　○伊良部寛規[1]，藏屋英介[2]，田中　博[3]（[1]沖縄高専専攻科，[2]沖縄高専技術室，[3]沖縄高専生物資源）

2F26a13　ヨメガカサガイの生殖腺から見いだされた Δ 5,9 ジエン酸の構造と分布特性
11:32　○川島英城（岩手県立大学宮古短期大学部）

2F26a14　柑橘類の搾汁残渣に含まれるグルコシルセラミド分子種の LC-MS/MS による分析(温州ミカンと柚子について)
11:43　柳川大樹[1]，木下幹朗[2]，大西正男[3]，○今井博之[1]（[1]甲南大統合ニューロバイオ研，[2]帯広畜産大食品科学，[3]藤女子大人間生活）

2F26a15　解析モデルの効率的運用による複合基質を用いた酵素的配糖化メカニズムの可視化
11:54　○伊藤　博，小林厚志，野口真人，正田晋一郎（東北大院工）

F26 会場　午後の部（14:00〜18:10）

食品―食品化学－糖質，脂質，食品化学－タンパク質，アミノ酸―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

2F26p01　植物由来スフィンゴ脂質代謝物が腸管モデル細胞のアポトーシス関連因子に及ぼす影響
14:00 ○木下幹朗[1]，　坪谷朗行[1]，　間　和彦[3]，　山下慎司[1]，大西正男[2]（[1]帯広畜大・食品，[2]藤女子大，[3]日本製粉）

2F26p02　食物繊維摂取による小腸絨毛伸長作用の機構解明
14:11 ○伊藤千弘[1]，　西田光貴[2]，　北口公司[3]，　植木章晴[3,4]，石田秀治[3]，木曽　真[3,4]，東　恭平[5]，戸井田敏彦[5]，五十嵐一衛[5,6]，森雄一郎[7]，山元宏貴[7]，伊神孝生[7]，矢部富雄[3]（[1]岐阜大院・応生科・応用生命，[2]岐阜大院・連農・生物資源，[3]岐阜大・応生科・応用生命，[4]京都大･iCeMS，[5]千葉大学院･薬，[6](株)アミンファーマ研，[7]三基商事(株)）

2F26p03　ペクチンのムチン分泌促進作用とその活性部位同定の試み
14:22 ○日野真吾，寺崎史高，森田達也（静大院農）

2F26p04　コンドロイチン硫酸が前駆軟骨細胞の増殖や分化に与える影響
14:33 ○柿崎美里，中谷祥恵，古旗賢二，和田政裕（城西大学）

2F26p05　プロテオグリカンは皮膚線維芽細胞の基質産生を増加させる
14:44 ○渡邊准子，中谷祥恵，古旗賢二，和田政裕（城西大学）

p06〜p10 発表者の接続時間 14:55〜15:05

2F26p06　フコイダン摂取によるエタノール・アセトアルデヒドの低減作用
15:05 ○川本仁志[1]，　阿部　直[1]，　笠木　健[1]，　平松喜美子[2]，池口　匡[2]（[1]海産物のきむらや，[2]鳥取大医）

2F26p07　フコイダン添加によるアルコール飲料の風味改善作用
15:16 ○舟越　稔，阿部　直，川本仁志，笠木　健（海産物のきむらや）

2F26p08　フコイダン塗布による虫刺傷の掻痒軽減効果
15:27 ○阿部　直[1]，　川本仁志[1]，　笠木　健[1]，　山本陽子[2]，深田美香[2]（[1]海産物のきむらや，[2]鳥取大医）

2F26p09　X 線結晶構造解析による Alliin 中の *S*-オキサイドの絶対立体配置の決定
15:38 ○小山亮祐[1]，　谷田瑞希[1]，　羽賀知美[1]，　袴田　航[1,2]，平野貴子[1]，熊谷日登美[1,2]，西尾俊幸[1,2]（[1]日大生資科・生命化，[2]日大院生資科）

2F26p10　にんにくを原料とした S- アリルシステイン(SAC)の新規製造方法
15:49 ○高柳勝彦，名和和恵，向井克之（ユニチカ(株)　中央研究所）

p11〜p15 発表者の接続時間 16:00〜16:10

2F26p11　3-デオキシキシロソン由来架橋性メイラード反応後期段階生成物の同定
16:10 ○鳥海春香[1]，　石渡まどか[1]，　臼井照幸[2]，　渡辺寛人[1]，早瀬文孝[1]（[1]明治大農，[2]女子栄養大栄養）

2F26p12　メイラード反応を利用した *β*-コングリシニン-糖質複合体の創出
16:21 ○友野美怜，高橋良平，好田　正，服部　誠（東農工大農）

2F26p13　米澱粉粒表層タンパク質と *α*-amylase の相互作用性について
16:32 ○塩野弘二[1]，辻井良政[2]，野口智弘[3]，高野克己[2]（[1]東京農大院・農・農芸，[2]東京農大・応生・化学，[3]東京農大・応生・食加技セ）

2F26p14　アラニンスキャニング法を用いた味覚修飾タンパク質ネオクリンによるヒト甘味受容体活性化機構の解析
16:43 ○小泉太一，寺田　透，中島健一朗，三坂　巧（東大院農生科）

2F26p15　コメプロラミンの溶解性に寄与する構造要因の解析
16:54 ○田中俊裕，裏出令子，丸山伸之（京大院農・農学）

p16〜p20 発表者の接続時間 17:05〜17:15

2F26p16　パイナップル酵素による卵・牛乳アレルゲンの分解
17:15 ○友竹浩之，伊藤瑠美，志摩妃沙，中村未来，山原愛理（飯田女子短期大学）

2F26p17　ペプシンによるコラーゲン分解反応の解析
17:26 ○銭　鈞[1]，　岡田夕佳里[1]，　小倉孝之[2]，　田中啓友[2]，服部俊治[2]，滝田禎亮[1]，保川　清[1]（[1]京大院農，[2]株式会社ニッピ・バイオマトリックス研究所）

2F26p18　赤身牛肉の熟成による遊離アミノ酸量の変化に関する研究
17:37 ○杉岡和貴[1]，　田崎　司[1]，　堺　久弥[2]，　家入誠二[2]，荒木朋洋[1]（[1]東海大農，[2]熊本県農研セ）

2F26p19　SDS-PAGE による牛肉タンパク質の変動と同定
17:48 ○細澤知香[1]，　廣田　楓[1]，　杉岡和貴[1]，　堺　久弥[2]，家入誠二[2]，荒木朋洋[1]（[1]東海大農，[2]熊本県農研セ）

2F26p20　ローヤルゼリータンパク質アピシンの精製と定量
17:59 ○古澤貴子，新井靖子，加藤健司，市原賢二（アピ(株)長良川リサーチセンター）

F28 会場　午前の部（9:00〜12:05）

食品―食品工学－製造工学，食品工学－加工学―

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

2F28a01　乳化 d-リモネン噴霧乾燥粉末からの d-リモネン徐放挙動
9:00 ○高重至成，四日洋和，吉井英文（香川大農）

2F28a02　デキストロース当量が乳化魚油噴霧乾燥粉末の包括特性に及ぼす影響
9:11 ○足立早映[1]，四日洋和[1]，安達修二[2]，吉井英文[1]（[1]香川大農，[2]京都大院農）

2F28a03　Release of allyl sulfide from spray-dried powder containing allyl sulfide in palm oil
9:22 ○THEERADON THEINHIRAN，　HIROKAZU SHIGA，HIDEFUMI YOSHII（Kagawa Univ.）

2F28a04　植物油の固化過程の速度論的検討
9:33 ○宮川弥生，小川剛伸，中川究也，安達修二（京大院農）

2F28a05　微結晶セルロースの乳化作用について
9:44 ○合谷祥一，吉岡凌太（香川大農）

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

2F28a06　界面前進凍結濃縮による生食用ブドウ(ルビーロマン)濃縮果汁を用いたワインの製造と品質評価
10:05 ○三輪章志[1]，　石崎佳奈[1]，　笹木哲也[2]，　武　春美[2]，松田　章[2]，北野　滋[3]，表　千晶[4]，小柳　喬[4]，宮脇長人[4]（[1]石川農林総研，[2]石川工試，[3]明和工業(株)，[4]石川県大生資環）

2F28a07　低加圧二酸化炭素マイクロバブル処理による清酒の殺菌・酵素失活について
10:16 ○小林史幸[1]，池浦博美[2]，小竹佐知子[1]，桜井博志[3]（[1]日獣大応生，[2]明治大研究・知財推進機構，[3]旭酒造株式会社）

2F28a08　非電解質の分配係数に基づいて評価したコメの膨潤特性
10:27 ○謝　裕基，安達修二（京大院農）

2F28a09　デジタル画像処理による小麦麺内部におけるデンプンの老化度の新規測定法
10:38 ○福澤聡真，中川究也，安達修二（京大院農）

2F28a10　真空包装したサンマの短波帯加熱
10:49 ○植村邦彦，金房純代，高橋千栄子，小林　功（農研機構食総研）

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

2F28a11　ツノナシオキアミを利用した魚味噌開発

11:10 ○福田　翼[1]，　大関美咲[1]，　藤澤和貴[1]，　及川克敏[2]，古下　学[1]，芝　恒男[1]，前田俊道[1]，原田和樹[1]（[1]水大院食品科学，[2](株)小野万）

2F28a12　担子菌の発酵能による機能性後発酵茶の製造

11:21 ○鮫島由香，　鈴木扶沙子，　山口真奈，　田畑麻里子，松井徳光（武庫川女子大食栄）

2F28a13　小麦デンプン発酵過程における鎖長の変化

11:32 ○丸山慶輔[1]，野口治子[2]，内野昌孝[2]，高野克己[2]（[1]東京農大院農・農化，[2]東京農大応生・化学）

2F28a14　米粉バッター攪拌中の成分について

11:43 ○奥西智哉[1]，岸根雅宏[1]，新田浩朗[2]（[1]農研機構・食総研，[2]パナソニック(株)）

2F28a15　米内在性プルラナーゼの米粒内分布

11:54 ○大倉哲也[1]，津久井信也[1,2]，露久保美夏[1,3]，浜守杏奈[3]，香西みどり[3]（[1]食総研，[2]筑波大院生物資源，[3]お茶大院人間文化）

F28 会場　午後の部（14:00〜18:10）

食品―食品工学－加工学―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

2F28p01　メイラード反応を用いて得られたマルトースおよびリボース修飾鶏筋原線維タンパク質の機能改変

14:00 ○梅本保奈美[1]，佐伯宏樹[2]，西村公雄[1]（[1]同志社女子大・食栄，[2]北大院・水）

2F28p02　NMR を用いた黒ニンニクの熟成過程の解析

14:11 ○小谷良徳[1]，　梁　庭輔[1]，　魏　菲菲[1]，　盧　翌[1]，中田光彦[2]，宮川拓也[1]，田之倉優[1]（[1]東大院・農生科，[2]株式会社サラダコスモ）

2F28p03　埼玉県産小麦「さとのそら」と「農林 61 号」のストリーム粉のグルテンタンパク質組成の比較

14:22 ○小島登貴子[1]，成澤朋之[1]，仲島日出男[2]，杉山健二郎[3]，山田昌治[3]（[1]埼玉産技セ北部，[2]埼玉産技セ，[3]工学院大工）

2F28p04　小麦粉生地タンパク質のジスルフィド結合形成に対するアスコルビン酸と PDI の関与

14:33 ○樋口貴俊[1]，　岡　大貴[2]，　辻井良政[3]，　野口治子[3]，野口智弘[2]，高野克己[3]（[1]東京農大院農・農化，[2]東京農大応生・食加技セ，[3]東京農大応生・化学）

2F28p05　大豆ホエーの SS 結合形成能について

14:44 ○金井大樹[1]，野口治子[2]，高野克己[2]（[1]東京農大院農・農化，[2]東京農大応生・化学）

p06〜p10 発表者の接続時間 14:55〜15:05

2F28p06　生乳や伝統食品由来のプロバイオティクスの単離と機能性評価

15:05 ○高屋朋彰，根来雄哉，布川玲奈（小山高専物質）

2F28p07　冷凍保存が小麦麺中のグルテンに及ぼす影響

15:16 ○鳥井昭良[1]，　松宮健太郎[1]，　林由佳子[1]，　平内　亨[2]，入江謙太朗[2]，松村康生[1]（[1]京大院・農，[2](株)日清製粉グループ本社・基礎研究所）

2F28p08　XRD による冷凍小麦麺の澱粉再結晶化評価に関する実験的検討

15:27 ○西尾幸子，　山田夕梨恵，　西津貴久，　勝野那嘉子，後藤清和（岐阜大・応生）

2F28p09　大豆粉の利用による冷凍耐性生地の品質改善と機能解析

15:38 ○蓑島良一[1]，　伊藤昌也[2]，　椎葉　究[3]，　会田真人[3]，田村　翔[2]，村勢則郎[3]（[1]日清オイリオグループ，[2]東京電機大学理工学部，[3]東京電機大学理工学研究科）

2F28p10　凍結融解によるマヨネーズの不安定化とポリグリセリン脂肪酸エステルの影響

15:49 ○加藤康暉[1]，　松宮健太郎[1]，　林由佳子[1]，　佐藤健一[2]，古川周平[2]，松村康生[1]（[1]京大院農，[2]オリエンタル酵母工業(株)）

p11〜p15 発表者の接続時間 16:00〜16:10

2F28p11　冷凍方法が非加熱および加熱野菜組織の細胞内氷結晶生成に与える影響

16:10 ○福田　滿[1]，澤田小百合[2]，小林麻貴[3]（[1]武庫川女子大栄科研，[2]武庫川女子短大食生活，[3]兵庫大栄養マネジメント）

2F28p12　野菜類の凍結前後におけるテクスチャー評価法について

16:21 ○中納真奈，渡辺　学，鈴木　徹（海洋大学）

2F28p13　アイスグレーズ食品のグレーズ氷の破砕分離

16:32 ○許　　政，曲　　亮，川井清司，羽倉義雄（広島大院生物圏）

2F28p14　固体食品用ブランチング・殺菌・減圧乾燥装置の開発（第 1 報）トマトおよびサケの乾燥

16:43 ○森川卓哉[1]，　三浦　靖[1,2]，　立澤文見[2]，　加藤一幾[2]，高田式久[1,3]，橋本正成[4]，仲田英郎[5]，嵯峨政嘉[5]（[1]岩手大三陸水産研究センター，[2]岩手大農，[3]雪国アグリ(株)，[4](株)銀河農園，[5](株)マルサ嵯峨商店）

2F28p15　Effects of pretreatment and drying conditions on physical properties of instant rice product

16:54 ○Jittimon WONGSA[1]，Dusdadee UTTAPAP[2]，Buddhi P. LAMSAL[3]，Vilai RUNGSARDTHONG[1]（[1]Department of Agro-Industrial, Food and Environmental Technology, Faculty of Applied Science, Food and Agro-Industry Research Center, King Mongkut's University of Technology North Bangkok, [2]Division of Biochemical Technology, School of Bioresources and Technology, King Mongkut's University of Technology Thonburi, [3]Department of Food Science and Human Nutrition, College of Agriculture and Life Sciences, Iowa State University）

p16〜p20 発表者の接続時間 17:05〜17:15

2F28p16　室温貯蔵，あるいは乾熱（120℃）貯蔵した米粉と新鮮グルテンによる製パン試験結果

17:15 ○中川真理子[1]，　田原　彩[1]，　牛島雄毅[2]，　松永幸太郎[2]，瀬口正晴[1]（[1]神戸女子大学家政，[2]熊本製粉(株)）

2F28p17　乾熱処理が米粉のオイル吸着能に及ぼす影響について

17:26 ○田原　彩[1]，　中川真理子[1]，　牛島雄毅[2]，　松永幸太郎[2]，瀬口正晴[1]（[1]神戸女子大家政，[2]熊本製粉(株)）

2F28p18　玄米への中高圧処理による色素成分の浸透移行性に関する研究

17:37 ○藤田智之，甲田万紀子（信州大院農）

2F28p19　焼酎開発を目的とした圧力処理による大麦澱粉の糊化・糖化

17:48 ○木戸みゆ紀，　内藤広賢，　五十嵐友，　神保真優香，林真由美，井口晃徳，重松　亨，高久洋暁，田中宥司（新潟薬大・応生科）

2F28p20　中高圧処理による二枚貝開脱殻における温度の影響

17:59 ○山本和貴[1]，小田真知子[1]，森松和也[1,2]（[1]農研機構食総研，[2]愛媛大農）

F37 会場　午前の部（9:00〜11:54）

食品―食品機能・栄養－脂質代謝―

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

2F37a01　腸管増殖能を有する *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* GCL2505 株の抗メタボリックシンドローム効果の検証

9:00 ○青木　亮[1]，　上門弘平[1]，　滝井　寛[1]，　三上友美子[1]，菅沼名津季[1]，馬渡隆志[2]，古賀泰裕[3]（[1]江崎グリコ(株)，[2]グリコ乳業(株)，[3]東海大・医）

2F37a02　腸管増殖能を有する *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* GCL2505 株は，消化管の短鎖脂肪酸量および GLP-1 分泌能を上昇させ，抗メタボリックシンドローム効果を発揮する

9:11 ○上門弘平[1]，　青木　亮[1]，　滝井　寛[1]，　三上友美子[1]，菅沼名津季[1]，馬渡隆志[2]，古賀泰裕[3]（[1]江崎グリコ(株)，[2]グリコ

乳業(株)，[3]東海大・医）

2F37a03　*Lactobacillus gasseri* SBT2055 は *in vitro* において脂質エマルジョン粒子径の増大作用を介して膵リパーゼ反応を抑制する

9:22　◦小川哲弘，河野通生，酒井史彦，門岡幸男（雪印メグミルク(株)・ミルクサイエンス研究所）

2F37a04　*Lactobacillus gasseri* SBT2055 は高脂肪食摂取時の脂肪組織の炎症および腸管透過性の増大を抑制する

9:33　◦河野通生，三好雅也，小川哲弘，浮辺　健，酒井史彦，門岡幸男（雪印メグミルク(株)・ミルクサイエンス研究所）

2F37a05　Caco-2 細胞を用いた *in vitro* 腸管モデルにおける *Lactobacillus gasseri* SBT2055 の菌体成分による腸管バリア保護作用

9:44　◦三好雅也，河野通生，酒井史彦，門岡幸男（雪印メグミルク(株)・ミルクサイエンス研究所）

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

2F37a06　ダイオキシンが誘導する消耗性症候群に対するルテオリンの抑制効果について

10:05　◦芦田　均[1]，　原田聖也[1]，　三嶋咲穂[1]，　三谷曻一[1]，山下陽子[1]，松村文夫[2]（[1]神戸大農，[2]カリフォルニア大デービス校環境毒性）

2F37a07　雌性 C57BL/6 マウスの血清および肝臓中脂質量の日内変動

10:16　◦榊原啓之[1]，杉山　広[2]，馬場星吾[2]，窄野昌信[1]（[1]宮崎大学　農学部，[2]株式会社　明治）

2F37a08　日本人成人における血清脂肪酸組成と肥満との関係

10:27　◦城内文吾，加嶋健太郎，佐藤匡央（九大農）

2F37a09　日本人成人における血清脂肪酸組成と非アルコール性脂肪肝との関係

10:38　◦林　拓也，加嶋健太郎，城内文吾，佐藤匡央（九大農）

2F37a10　肝細胞における脂肪蓄積を抑制する香辛料成分の探索

10:49　◦上久保綾祐[1]，　甲斐建次[2]，　内藤健太郎[3]，　赤川　貢[2]（[1]大阪府立大生命環境科学，[2]大阪府立大院生命環境科学，[3](株)ディーエイチシー）

a11〜a14 発表者の接続時間 11:00〜11:10

2F37a11　紅麹の新規食品機能である脂肪肝抑制機構の解析

11:10　◦吉崎隆之[1,2]，　本村　亘[3]，　吉崎由美子[4]，　高橋伸彦[5]，高後　裕[3]，山本　覚[1]（[1]福山大生命工，[2]鹿児島大産学官連携推進センター，[3]旭川医大医，[4]鹿児島大農，[5]北海道医療大歯）

2F37a12　ユズ果皮抽出物が高ショ糖食誘発脂肪肝モデルラットに及ぼす影響

11:21　◦宮島詩織[1]，　信岡かおる[1]，　但馬沙樹[1]，　望月　聡[2]，梅木美樹[2]，石川雄一[1]（[1]大分大工，[2]大分大教育福祉）

2F37a13　脂肪性肝疾患モデルである *Fxr* 欠損マウスの肝脂質代謝における魚油摂取の影響

11:32　◦新野耕平，木下佑一，杉浦義正，宮田昌明（水大校）

2F37a14　α-リノレン酸高含有リン脂質による非アルコール性脂肪肝炎改善作用

11:43　◦堂黒翔太[1]，梶　直人[2]，阿孫健一[2]，前多隼人[1]（[1]弘前大院農，[2]興人ライフサイエンス(株)）

F37 会場　午後の部（14:00〜18:10）

食品―食品機能・栄養－脂質代謝―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

2F37p01　ChREBP アイソフォームを介した糖・脂質代謝関連遺伝子の転写制御機構

14:00　◦井上聖哉，井上　順，Shimizu Makoto，佐藤隆一郎（東大食品生化学）

2F37p02　ケルセチンによる apoB 遺伝子の発現調節機構

14:11　◦清水　誠，李　　娟，井上　順，佐藤隆一郎（東大院・農生化・食生化）

2F37p03　β conglycinin による代謝改善効果の分子機構解析

14:22　◦加藤あすか[1]，　橋詰　力[2]，　清水　誠[1]，　井上　順[1]，佐藤隆一郎[1]（[1]東大農，[2]東大高齢社会総合研究機構）

2F37p04　中枢神経系におけるアポ E 含有リポタンパク代謝の解析

14:33　◦藤野貴広（愛媛大総科研）

2F37p05　等カロリーの低脂肪高炭水化物食と高脂肪低炭水化物食が db/db マウスのエネルギー代謝に与える影響

14:44　◦池田英介，　伊藤知美，　滋田芽衣子，　石田良衡，井上奈穂，池田郁男（東北大院農）

p06〜p10 発表者の接続時間 14:55〜15:05

2F37p06　柿未成熟果実由来食物繊維の胆汁酸吸着能に対する加熱の影響

15:05　◦松本健司，増田かおる，武川加奈子，小柳　喬（石川県大食品）

2F37p07　大豆由来ペプチド VVFLASVS は疎水性相互作用を介してコレステロールのミセル 溶解性を低下させる

15:16　◦久松賢太郎，秋江祐希，島田昌也，岩本悟志，長岡　利（岐大応生）

2F37p08　ラクトスタチンは HNF-3alpha 及びカルシウムシグナルを介してコレステロール分解系を活性化する

15:27　◦磯貝　渚，古田真優，島田昌也，長岡　利（岐大応生）

2F37p09　エピガロカテキンガレートは Annexin A2 非依存的に LDL 受容体の増加及び PCSK9 の低下を誘導する

15:38　◦北村幸平，三島周平，岡田雄大，島田昌也，長岡　利（岐大応生）

2F37p10　NPC1L1 依存的なコレステロール取込みを阻害するクロサルノコシカケ由来新規天然物 fomiroid A の同定

15:49　◦千場智尋[1,2,3]，　櫻田剛史[1]，　渡邊理恵[1]，　山口宏二[1]，木村泰久[2]，　木岡紀幸[2]，　河岸洋和[4,5,6]，　松尾道憲[2,7]，　植田和光[2,3]（[1]ファンケル総研，[2]京大院農，[3]京大 iCeMS，[4]静大院・創造，[5]静大・グリーン研，[6]静大院農，[7]京女大・食物栄養）

p11〜p15 発表者の接続時間 16:00〜16:10

2F37p11　乳酸発酵豆乳抽出物が高コレステロール食投与ラットの脂質代謝に及ぼす影響

16:10　◦小林麻貴[1]，江草信太郎[2]，福田　滿[3]（[1]兵庫大･健康科学，[2]マルサンアイ株式会社，[3]武庫川女子大・生活環境）

2F37p12　高脂肪高コレステロール食給餌ラットに及ぼすべにふうきエキスと各種ポリフェノールの組み合わせ効果

16:21　◦蒲原智子[1]，　三好　萌[1]，　杉本光季[1]，　平井　静[1]，山本(前田)万里[2]，　江頭祐嘉合[1]（[1]千葉大院・園芸・応生化，[2](独)農研機構・食総研）

2F37p13　大豆中の β-コングリシニン量とその分解度が脂質代謝に及ぼす影響

16:32　◦高橋陽子[1]，石黒貴寛[2]，高橋浩司[3]，羽鹿牧太[3]（[1]農研機構食総研，[2]旭松食品，[3]農研機構作物研）

2F37p14　LDL-コレステロールが高めの成人男性に対する魚食の脂質代謝改善効果の検証

16:43　◦河原崎正貴[1]，　鎌田　彰[1]，　矢口　文[1]，　江成宏之[1]，根本　直[2]（[1]マルハニチロ中研，[2]産総研バイオメディカル）

2F37p15　異なる品種の緑茶によるアテローム性硬化症予防効果に関する検討

16:54　◦野村幸子，物部真奈美，江間かおり，松永明子（農研機構　野茶研）

p16〜p20 発表者の接続時間 17:05〜17:15

2F37p16　週齢の異なる雌雄ラットにおける食事由来酸化コレステロールの代謝

17:15　◦長田恭一，細野佑紀子（明治大・農・農化）

2F37p17　出芽酵母を用いたトランス脂肪酸代謝の解析

17:26　中村豊一，◦井澤真吾（京工繊大応生）

2F37p18　培養細胞由来の脂肪滴の脂質抽出物を用いた脂肪滴様エマルションと脂肪滴サイズの関連性

17:37 ○有澤琴子，市　育代，杉本　静，藤原葉子（お茶大院ライフ）

2F37p19　黒豆由来 Cyanidin-3-glucoside による骨格筋の代謝活性化作用の解析

17:48 ○松川隼也[1]，VILLAREAL Myra[2,3]，礒田博子[2,3]（[1]筑波大院生命環境，[2]筑波大生命環境系，[3]筑波大北アフリカ研究センター）

2F37p20　酢酸はラット培養筋管細胞において AMPK 活性化を介して *glut4* の発現を亢進する

17:59 ○吉村征浩，　丸田ひとみ，　荒木　彩，　木本眞順美，高橋吉孝，山下広美（岡山県大）

F45 会場　午前の部（9:00〜11:54）

食品―食品機能・栄養－その他―

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

2F45a01　脂肪細胞分化促進作用を有するビワ葉由来物質の探索

9:00 ○神田尚幸[1]，平井　静[1]，大江靖雄[2]，江頭祐嘉合[1]（[1]千葉大・園芸・応生化，[2]千葉大・園芸・食資）

2F45a02　フェルラ酸の脂質代謝異常および慢性炎症への影響

9:11 ○上野有紀，竹市真奈，濱田　愛，山田雄太，西川佳那，大澤俊彦（愛知学院大心身科学）

2F45a03　高エネルギー食摂取が世代を超えて肥満発症リスクに及ぼす影響

9:22 ○畠山雄有，都築　毅（東北大院農）

2F45a04　高脂肪負荷マウスへの自然薯ムカゴ投与の影響

9:33 ○篠崎文夏[1]，　亀井飛鳥[1]，　渡部由貴[1]，　安岡顕人[1]，近藤　香[1]，荒井綜一[1,2]，近藤　隆[1]，阿部啓子[1,3]（[1]神奈川科学技術アカデミー，[2]東農大総研，[3]東大院農生科・応生化）

2F45a05　長期高脂肪・高ショ糖食摂取マウスにおけるリンゴプロシアニジン類の尿中メタボロームへの影響

9:44 ○庄司俊彦[1]，　升本早枝子[2]，　寺尾明莉[2]，　向井孝夫[2]，三浦富智[3]（[1]農研機構・果樹研，[2]北里大・獣医，[3]弘前大院・保健）

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

2F45a06　ジペプチドによるインクレチン加水分解酵素阻害データの網羅的取得とその応用

10:05 ○伊藤圭祐[1]，大野真澄[1]，Vu Thi Tuyet Lan[1]，本山貴康[2]，楠畑　雅[3]，遠目塚千紗[3]，小山洋一[3]，伊藤創平[1]，河原崎泰昌[1]（[1]静県大院・薬食，[2]不二製油・基盤研，[3]ニッピ・バイオマトリックス研）

2F45a07　いも類・野菜類の抗糖化活性の検討

10:16 ○須藤麻里，吉原潮梨，長谷部久乃，佐久間塁（カルビー株式会社）

2F45a08　食餌脂肪の質の違いがラット腸内環境と脂質代謝に及ぼす影響

10:27 ○岡崎由佳子[1]，　関田彩夏[1]，　福田絵里[1]，　知地英征[1]，加藤範久[2]（[1]藤女子大・人間生活，[2]広島大院・生物圏科学）

2F45a09　ネコのオーラルケアにおける抗歯周病原性細菌バイオフィルム鶏卵抗体（IgY）の効果

10:38 ○山下裕輔[1]，　和田大樹[2]，　栗原博之[2]，　丸　勇史[1]，吉國義明[1]，金　武祚[1]（[1](株)ファーマフーズ，[2]日本ペットフード(株)）

2F45a10　プリン体を資化する乳酸菌の探索

10:49 ○山田成臣，岩本千鶴，添田美里，坪井　洋，大柴幸男，内田勝幸，狩野　宏，浅見幸夫，伊藤裕之（(株)明治 食機能科学研）

a11〜a14 発表者の接続時間 11:00〜11:10

2F45a11　*Lactobacillus gasseri* CP2305 株と乳幼児期におけるストレスの緩和・自立性の支援 －ラットでの評価－

11:10 澤田大輔[1]，○藤原　茂[2]（[1]カルピス(株)商開セ，[2]カルピス(株)発酵研）

2F45a12　ヒト腸内細菌叢に与える花粉荷由来乳酸菌 *Lactobacillus kunkeei* YB38 の影響

11:21 ○浅間孝志[1]，　木村友香[1]，　福島　忍[1]，　佐道哲也[1]，立藤智基[1]，橋本　健[1]，辨野義己[2]（[1]株式会社山田養蜂場本社，[2]独立行政法人理化学研究所）

2F45a13　日本の男女中高年における，ビフィズス菌含有乳酸菌飲料摂取と健康状態に関する横断研究　結果 1　－調査対象者の生活習慣，健康意識，生活習慣病の罹患経験－

11:32 ○柳澤尚武[1]，　南　淳一[1]，　齋藤さな恵[2]，　小田巻俊孝[1]，清水(肖)金忠[1]，阿部文明[1]，下田妙子[2]（[1]森永乳業株式会社，[2]東京医療保健大学）

2F45a14　日本の男女中高年における，ビフィズス菌含有乳酸菌飲料摂取と健康状態に関する横断研究　結果 2　－乳酸菌飲料摂取と体重，排便状態，QOL および各種疾患経験との関係－

11:43 ○南　淳一[1]，　柳澤尚武[1]，　齋藤さなえ[2]，　小田巻俊孝[1]，清水(肖)金忠[1]，阿部文明[1]，下田妙子[2]（[1]森永乳業株式会社，[2]東京医療保健大学）

F45 会場　午後の部（14:11〜17:59）

食品―食品機能・栄養－その他―

p02〜p05 発表者の接続時間 14:01〜14:11

2F45p02　とうふようもろみの消化酵素耐性抗酸化物質の単離

14:11 ○玉城祐貴，屋良　瞳，仲真弘樹，橘信二郎（琉大農）

2F45p03　紅麹水抽出物によるマウス骨芽細胞の石灰化関連遺伝子発現への影響

14:22 ○安里雪乃，池尻真美，橘信二郎（琉大農）

2F45p04　Effect of water extract of red mold rice using *Monascus pilosus* on adipogenesis inhibition

14:33 ○Shinjiro TACHIBANA，Pradeep Wanninaika Indika，Hirohide TOYAMA（University of the Ryukyus）

2F45p05　α-エチルグルコシドの保湿効果に関与する新規機能性

14:44 ○坊垣隆之[1,2]，　宮西史則[1]，　佐藤　敦[1]，　打越仁子[1]，若林美芳[1]，園部政和[1]，尾関健二[1]（[1]金工大・バイオ研，[2]大関(株)・総研）

p06〜p10 発表者の接続時間 14:55〜15:05

2F45p06　褐変した白味噌から単離した哺乳類 DNA ポリメラーゼ阻害活性物質の健康機能性について

15:05 ○今西貴紀[1]，　松永大輝[2]，　紙透伸治[2]，　菅原二三男[2]，小野寺威文[3,4,5]，木村明博[3]，坂本裕香[3]，水品善之[3,4]　（[1]株式会社　本田味噌本店，[2]東京理大・理工，[3]神戸学院大・栄養，[4]神戸学院大・LSC，[5]神戸学院大・薬）

2F45p07　培養細胞系を用いた黒ウコンによる単球接着抑制作用の解析

15:16 ○堀籠　悟[1,2]，　吉田　泉[2]，　伊藤志保美[2]，　鈴木美そら[2]，伏見　啓[2]，永井　武[2]，猪之鼻修一[2]，　山口昭弘[2,3]，　里山俊哉[2,4]，吉安友二[2]，　勝田真一[2]，　鈴木　忍[2]，　渡井正俊[2]，　広瀬直人[5]，三枝隆裕[6]，白川　仁[1]，駒井三千夫[1]（[1]東北大院農・栄養学，[2]日本食品分析セ，[3]酪農学園大，[4](株)久原本家食品，[5]沖縄県農研セ，[6]沖縄高専）

2F45p08　黒ウコン抽出物による性ホルモン産生促進作用

15:27 ○白川　仁，前田美里，堀籠　悟，駒井三千夫（東北大院農）

2F45p09　卵黄タンパク由来の新規育毛成分の開発

15:38 ○中村紀夫，原田清佑，丸　勇史，吉國義明，金　武祚((株)ファーマフーズ)

2F45p10　毛乳頭細胞に対する卵黄由来新規育毛成分の生理作用

15:49 ○原田清佑，中村紀夫，丸　勇史，吉國義明，金　武祚((株)ファーマフーズ)

p11〜p15 発表者の接続時間 16:00〜16:10

2F45p11　セサミンとジクロフェナクの相互作用― *in vitro*，*in vivo* 両面からの解析―
16:10　○上野千来，　上田恵里花，　武田貴恵，　安田佳織，西川美宇，鎌倉昌樹，生城真一，榊　利之（富山県立大学・工・生物工）

2F45p12　クワの実凍結乾燥粉末投与によるインドメタシン誘発性胃潰瘍形成抑制効果の検討
16:21　○畑生俊光[1]，　定兼侑里[1]，　藤原崇子[2]，　大西直規[2]，村田芳行[1]，舟橋弘晃[1]（[1]岡山大院環境生命科学，[2]岡山県青果物販売）

2F45p13　ブルーベリー葉抽出物(BLEx)のアルコール代謝亢進作用およびアルコール性肝障害抑制作用
16:32　○山崎　楓[1]，　河村由樹[2]，　長友宏賢[2]，　菅本和寛[3]，甲斐孝憲[4]，　亀長浩蔵[4]，　竹下正彦[5]，　菊地幸治[5]，　松浦　靖[6]，柚木崎千鶴子[6]，江藤敏治[7]，西山和夫[1,2]，山崎正夫[1,2]（[1]宮大院農応生科，[2]宮大農応生科，[3]宮大工環応化，[4](株)なな葉コーポレーション，[5]南日本酪農協同(株)，[6]宮崎県食品開発センター，[7]宮崎県立看護大）

2F45p14　ポリアミン経口摂取による肝再生促進効果と熱ストレス精巣障害の保護効果
16:43　○渡辺卓巳[1]，　坂野綾子[1]，　伊地知哲生[1]，　土井淳司[2,3]，奥村晋也[3]，　藤本康弘[2,3]，　笠原尚哉[2]，　浦橋泰然[2]，　高山達也[2]，寺谷　工[2]（[1]コンビ株式会社，[2]自治医大医，[3]京都大医）

2F45p15　カルノシンによる腸管上皮細胞におけるミトコンドリア生合成の促進とその分子制御機構の解明
16:54　○藤井　薫[1]，　松本貴之[2]，　佐藤三佳子[2]，　森松文毅[2]，片倉喜範[1,3]（[1]九大院シス生，[2]日ハム中研，[3]九大院農院）

p16〜p19 発表者の接続時間 17:05〜17:15

2F45p16　Effects of heat treatments on the health properties of Pacific saury
17:15　○Lennie CHEUNG，　Haruo TOMITA，Toshikazu TAKEMORI（Delicious and Healthy Cooking Science Laboratory, Energy Technology Laboratories, Osaka Gas Co., Ltd.）

2F45p17　Cs と Sr の吸収抑制及び排泄促進効果を示す食品素材・成分の探索
17:26　○上原祐也，島村裕子，保田倫子，増田修一（静県大食）

2F45p18　粉末あるいは固形飼料を摂取させたラットの摂食行動および視床における発現遺伝子の比較解析
17:37　○永井俊匡[1]，　清水愛恵[1]，　齊藤美佳[1]，　緑川景子[2]，熊倉　慧[1]，阿部啓子[2]，朝倉富子[2]（[1]高崎健大・栄養，[2]東大院・農生科・応生化）

2F45p19　ラクトフェリシンおよびアミド化ラクトフェリンのアカントアメーバシスト体における抗アメーバ活性
17:48　○鈴木智恵[1]，　野町美弥[2]，　今安正樹[2]，　佐々木香る[3]，冨田信一[1]（[1]玉川大農，[2]株式会社メニコン，[3]JCHO 星ヶ丘医療センター）

G41 会場　午前の部（9:00〜11:54）

食品―食品機能・栄養－免疫，炎症，アレルギー―

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

2G41a01　野沢菜抽出物による免疫賦活作用とそのメカニズム
9:00　○田中沙智[1]，　古屋花暖[1]，　山田和輝[1]，　山本佳奈[1]，杉山陽司[2]（[1]信州大農，[2]まるたかグループ）

2G41a02　緑茶浸出液中に含まれる RNA のプロファイリングとマクロファージ様細胞に対する食作用活性増強効果
9:11　○物部真奈美，野村幸子，荻野暁子，谷口郁也（(独)農研機構野菜茶業研究所）

2G41a03　イタドリ（*Polygonum cuspidatum*）葉 MeOH 抽出物中の抗アレルギー成分の解明
9:22　○木下あゆみ[1]，　栗田せりか[1]，　市田彩香[1]，　野村　凛[1]，柏木丈拡[1]，菅原卓也[2]，島村智子[1]，受田浩之[1]（[1]高知大農，[2]愛媛大農）

2G41a04　新規作用機構を持つイチジク茶の抗アレルギー作用
9:33　○阿部竜也，高橋　徹，沖浦　文（公益財団法人　東洋食品研究所）

2G41a05　マウス T 細胞応答に及ぼす粉体麹の調節作用
9:44　○利根川直也[1]，　若井寿樹[1]，　鴨井聖広[1]，　関口昭博[2]，榎本　淳[1]（[1]群大院理工，[2]群馬産技セ）

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

2G41a06　スサビノリ由来硫酸化多糖体ポルフィランの生物活性
10:05　井坂章吾，上野幹憲，山口健一，○小田達也（長崎大水）

2G41a07　マコンブ由来 F- フコイダンの I 型アレルギー抑制効果に対するガレクチン 9 の関与
10:16　○谷野有佳[1]，　橋本堂史[1]，　藍原祥子[1]，　尾島孝男[2]，水野雅史[1]（[1]神戸大院・農，[2]北海道大院・水産）

2G41a08　酸性多糖-オボアルブミン複合体のアレルギー改善効果
10:27　○平林正大，片山　茂，山口裕太，中村宗一郎（信州大農）

2G41a09　メイラード型糖修飾はクルマエビトロポミオシンの抗原性低減化に効果的ではない
10:38　○臼井将勝[1]，　竹内沙織[1]，　佐藤裕一[1]，　田中真澄[1]，安本信哉[2]，近藤昌和[2]，宮崎泰幸[1]（[1]水大校･食品科学，[2]水大校･生物生産）

2G41a10　高圧下ペプシン処理が β-ラクトグロブリンの抗原性に及ぼす影響
10:49　○楯岡　潤，齋藤里穂，藤原麻美，勝俣雅之，東　徳洋，山田　潔（宇都宮大農）

a11〜a14 発表者の接続時間 11:00〜11:10

2G41a11　in vivo imaging による化学発光を指標とした DSS 誘導性の新しい評価法の構築
11:10　○山本岳史[1]，　真田洋平[1]，　金井すみれ[2]，　加藤範久[1]，van de Loo Fons A.J.[3]，矢中規之[1]（[1]広島大院　生物圏，[2]広島大　生物生産，[3]Radboud University Nijmegen Medical Centre）

2G41a12　べにふうき緑茶が食餌誘導性肥満マウスの炎症と腸内細菌叢に及ぼす影響の解析
11:21　○荻田　佑，　若木　学，　渡辺　純，　後藤真生，石川(高野)祐子（農研機構　食総研）

2G41a13　生薬シコンの有効成分シコニンの好中球自然免疫応答への影響とその作用機序の解明
11:32　○數村公子[1]，吉田ルシア幸子[2]，土屋広司[1]，小池　隆[3]，岡崎茂俊[4]，湯田康勝[2]，大室弘美[2]（[1]浜松ホトニクス・中研，[2]武蔵野大・薬・薬学研，[3]浜松ホトニクス・電子管，[4]浜松医大・MPRC）

2G41a14　哺乳類免疫系における植物ブラシノステロイドの生理活性
11:43　○高橋加奈[1]，　小川健司[2]，　市川保恵[2]，　藤岡昭三[3,4]，寺本祐之[1]，中野雄司[3,4]（[1](株)ファンケル総研，[2]理研・化学遺伝，[3]理研・抗生物質，[4]理研・CSRS）

G41 会場　午後の部（14:11〜17:59）

食品―食品機能・栄養－免疫，炎症，アレルギー―

p02〜p05 発表者の接続時間 14:01〜14:11

2G41p02　経口免疫寛容で誘導された T 細胞群による腸管抗体産生の解析
14:11　○芝原恭子[1,2]，八村敏志[1,2]（[1]東大院農生科・応生化，[2]東大院農生科・食の安全研セ）

2G41p03　腸間膜リンパ節 $CD11b^{-}CD103^{+}PD\text{-}L1^{+}$ 樹状細胞は遊走性サブセットの特徴を有し腸管指向性制御性 T 細胞を高く誘導する

14:22 ○上滝隆太郎[1,2]，塩河亜弥[1,2]，八村敏志[2]（[1]東大院農生科・応生化，[2]東大院農生科・食の安全研セ）

2G41p04　腸内細菌は腸管上皮細胞における miRNA の発現に影響を及ぼす

14:33 ○中田一彰[1]，　高橋恭子[1]，　杉　由高[1,2]，　小早川哲朗[1]，細野　朗[1]，上野川修一[1]（[1]日大生資科，[2]感染研）

2G41p05　無菌マウスと通常マウスにおける大腸免疫系細胞フェノタイプの特徴

14:44 ○於　鉄峥[1]，　鈴木　誠[1]，　沓掛優香[1]，　八村敏志[2]，高橋宜聖[3]，高橋恭子[1]，上野川修一[1]，細野　朗[1]　（[1]日大生資科・食品生命，[2]東大院農生科・食の安全研セ，[3]感染研・免疫）

p06〜p10 発表者の接続時間 14:55〜15:05

2G41p06　ビフィズス菌株による大腸炎抑制効果の比較および作用メカニズムの解析

15:05 ○川崎吾子[1]，宮内栄治[2]，川住雅美[2]，森田英利[3]，大野博司[1,2]（[1]横浜市大・生命医科学，[2]理研・IMS，[3]麻布大・獣医）

2G41p07　共役リノール酸ナノエマルションによる炎症性腸疾患の病態改善作用

15:16 ○金崎寿敏[1]，　木下和昭[1]，　山本建次[2]，　濱山真吾[2]，清水正高[2]，西山和夫[1]，山崎正夫[1]（[1]宮崎大農，[2]宮崎県工業技術センター）

2G41p08　代表的な腸内細菌である乳酸菌のリノール酸代謝産物 10-hydroxy-*cis*-12-octadecenoic acid は GPR40/MEK-ERK を介して腸管バリア保護効果を発揮する

15:27 ○宮本潤基[1,2]，　水呉太一[1]，　PARK Si-Bum[3]，　岸野重信[3]，小川　順[3]，木村郁夫[4]，鈴木卓弥[1]，田辺創一[1]（[1]広島大院生物圏科学，[2]日本学術振興会　特別研究員，[3]京都大院農，[4]東京農工大院農）

2G41p09　食事脂質の腸内細菌代謝産物が M2 型マクロファージの分化に及ぼす影響

15:38 ○安岡祐美子[1]，　大植隆司[1,2]，　後藤　剛[1,2]，　北村苗穂子[3]，朴　時範[4]，　岸野重信[3]，　小川　順[2,3]，　高橋信之[1,2]，　河田照雄[1,2]（[1]京大院農・食品生物，[2]京大・生理化学研究ユニット，[3]京大院農・応用生命，[4]京大院農・産業微生物）

2G41p10　食事脂質の腸内細菌代謝産物が腸管粘膜免疫系に及ぼす影響

15:49 ○大植隆司[1,2]，　安岡祐美子[1]，　後藤　剛[1,2]，　北村苗穂子[3]，朴　時範[4]，　岸野重信[3]，　小川　順[2,3]，　高橋信之[1,2]，　河田照雄[1,2]（[1]京大院農・食品生物，[2]京大・生理化学研究ユニット，[3]京大院農・応用生命，[4]京大院農・産業微生物）

p11〜p15 発表者の接続時間 16:00〜16:10

2G41p11　*Leuconostoc mesenteroides* NTM048 が産生する菌体外多糖は炎症性 Th17 反応を抑制する

16:10 竹之下柳一朗[1]，　趙　澄澄[1]，　久　景子[2]，　米島靖記[2]，鈴木卓弥[1]，○田辺創一[1]（[1]広島大院生物圏科学，[2]日東薬品工業株式会社　研究開発本部）

2G41p12　*Leuconostoc mesenteroides* NTM048 株由来の菌体外多糖の免疫賦活能について

16:21 ○松崎千秋[1]，　早川あすか[1]，　松本健司[1]，　加藤紀彦[1]，山本憲二[1]，久　景子[2]（[1]石川県大，[2]日東薬品工業(株)）

2G41p13　*Leuconostoc mesenteroides* NTM048 株由来レバンスクラーゼの遺伝子クローニングおよび発現酵素の諸性質の解析

16:32 ○坂口広大[1]，　石田竜一[1]，　松崎千秋[1]，　加藤紀彦[1]，山本憲二[1]，久　景子[2]（[1]石川県大・生資研，[2]日東薬品工業(株)）

2G41p14　1073R-1 乳酸菌で発酵したヨーグルトの免疫賦活作用における EPS の役割

16:43 ○牧野聖也[1]，　狩野　宏[1]，　浅見幸夫[1]，　伊藤裕之[1]，竹田和由[2]，奥村　康[2]（[1](株)明治，[2]順天堂大・医）

2G41p15　*Lactobacillus* GG 株のバイオフィルム形成能がマクロファージに与える影響について

16:54 ○原田　岳，何　　方，宮澤賢司，依田一豊，平松　優（タカナシ乳業(株)　商品研究所）

p16〜p19 発表者の接続時間 17:05〜17:15

2G41p16　鯉ヘルペスウイルスの感染抗原に対する鶏卵抗体(IgY)の調製

17:15 ○八田　一[1]，　杣本智軌[2]，　佐藤巧視[3]，　森本金次郎[4]（[1]京都女子大，[2]九大院農，[3]株式会社キョーリン，[4]安田女子大）

2G41p17　ピロール化タンパク質を認識する血清成分の同定

17:26 宮下宙士，○廣瀬冴美，日沖裕介，近澤未歩，柴田貴広，内田浩二（名大農）

2G41p18　血清に含まれるピロール化標的タンパク質の同定

17:37 ○日沖裕介，宮下宙士，廣瀬冴美，近澤未歩，柴田貴広，内田浩二（名大院生命農）

2G41p19　最終糖化産物(AGEs)を認識する血清受容体の探索と機能性解析

17:48 ○近澤未歩，柴田貴広，内田浩二（名大院生命農・応用分子生命科

講演番号
開始時間　　演　　題　　発表者氏名（所属）

A21 会場　午前の部（9:11〜12:05）

微生物―物質生産－醸造，発酵（一次代謝産物）―

a02〜a05 発表者の接続時間 9:01〜9:11

3A21a02　乳酸菌による発酵牛乳上清に認められる乳酸菌増殖促進活性
9:11　○前田　勇，土居寛幸，秋山直毅（宇都宮大農）

3A21a03　*Lactobacillus gasseri* の乳中生育性を向上させる共培養乳酸球菌株の選抜
9:22　○荒川健佑[1]，　峰雪仁美[1]，　川井　泰[2]，　増田哲也[2]，宮本　拓[1]（[1]岡山大院環境生命，[2]日大生資科）

3A21a04　耐熱性ザイモモナス菌による L-乳酸の生産とその効率化
9:33　○江本雄彰[1]，　嘉松　初[1]，　入江　陽[1]，　中島康之[1]，藤元奈保子[1]，村田昌之[1]，高坂智之[2]，山田　守[1,2]（[1]山口大学大学医学系研究科，[2]山口大農）

3A21a05　乳酸菌 H78 株由来のタンナーゼ特性
9:44　○松田麻李[1]，金内　誠[1]，戸塚　昭[2]，廣瀬弥生[1]（[1]宮城大食産，[2]感性科学研究所）

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

3A21a06　LPS 活性消去乳酸菌の分離とその性質
10:05　○近藤彩夏[1]，金内　誠[1]，畑中咲子[1,2]（[1]宮城大食産，[2]宮城県産技センター）

3A21a07　乳酸菌の脂肪酸取り込みによる抗ストレス作用について
10:16　○長田彩加，金内　誠，石田光晴（宮城大食産）

3A21a08　各種穀物を用いたアルコール飲料の特性
10:27　○竹下良一，川野徳嗣，三枝敬明，寺本祐司（崇城大学）

3A21a09　各種有色米とワイルドライスを用いたアルコール飲料の機能性
10:38　○川野徳嗣，竹下良一，三枝敬明，寺本祐司（崇城大・生物生命）

3A21a10　戦前の泡盛黒麹菌株「瑞泉菌」のゲノム解析と泡盛成分
10:49　○塚原正俊[1]，　渡久地政汰[1]，　鼠尾まい子[1]，　東　春奈[1]，伊波朋哉[1]，大城彩音[1]，渡邉泰祐[2]，外山博英[2]　([1]バイオジェット，[2]琉大農）

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

3A21a11　高品質清酒醸造のための晩生一般米・千秋楽の酒造適性に関する研究
11:10　○中村　諒[1]，　安澤義彦[1]，　佐藤謙仁[1]，　佐藤優子[1]，市川絵梨[1]，田村博康[1,2]，平田　大[1,2]（[1]朝日酒造，[2]広大・院・先端研）

3A21a12　酒造好適米を用いた無通風箱培養法による試験製麹法
11:21　○伊藤一成[1]，五味勝也[2]，狩山昌弘[3]，三宅剛史[1]（[1]岡山県工技セ，[2]東北大院農・生物産業創成，[3]フジワラテクノアート）

3A21a13　清酒の香気成分生産能を強化した麹菌の作製
11:32　○岡部夏海[1]，山本竜也[1]，喜多あいり[1]，安田（吉野）庄子[2]，志水元亨[1]，加藤雅士[1]（[1]名城大農，[2]あいち産科技総セ・食工技セ）

3A21a14　エタノール発酵糸状菌の二形成制御による好気的酵母化
11:43　○高野真希[1]，寺山結香[2]，星野一宏[1]（[1]富山大院理工・ナノ新機能，[2]富山大工・生命）

3A21a15　製造場および酒造年度の異なる速醸もとを用いた清酒の醸造過程における細菌叢の経時的変化
11:54　○佐藤万里，三枝静江，細井知弘（東京都立食技セ）

A21 会場　午後の部（14:00〜18:10）

微生物―物質生産－醸造，発酵（一次代謝産物）―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

3A21p01　ササユリからの酒造用酵母の分離とその醸造特性
14:00　○都築正男，大橋正孝，清水浩美（奈良県産振セ）

3A21p02　泡盛酵母の生理学的特徴
14:11　○吉田嵩策，渡邉泰祐，外山博英（琉球大農・亜熱生資）

3A21p03　醸造酵母における接合可能株の効率的スクリーニング法の開発
14:22　○太田　拓[1]，　金井圭子[1]，　西村久美[1]，　吉田　聡[2]，善本裕之[1]，小林　統[1]（[1]キリン・酒類研，[2]キリン・基盤研）

3A21p04　交雑育種による下面発酵酵母菌株の作出と醸造形質の評価
14:33　太田　拓[1]，　金井圭子[1]，　西村久美[1]，　吉田　聡[2]，善本裕之[1]，○小林　統[1]（[1]キリン・酒類研，[2]キリン・基盤研）

3A21p05　ビール酵母の流加培養法の開発
14:44　○藤原広樹，高橋　文，川久保武，吉崎成洋，吉田　聡，小山内栄一，櫟　友彦（キリン株式会社）

p06〜p10 発表者の接続時間 14:55〜15:05

3A21p06　ビール醸造用ラガー酵母およびエール酵母の DMSO reductase の比較について
15:05　○金内　誠[1]，菅井竹彦[1]，畑中咲子[1,2]，Charles Bamforth[3]（[1]宮城大食産，[2]宮城産技センター，[3]UC Davis）

3A21p07　セルフクローニング法によるジメチルトリスルフィド（DMTS）前駆物質低生産性酵母の育種
15:16　○池田優理子[1]，　森吉雄太[1,2]，　神田涼子[1]，　磯谷敦子[1,2]，藤井　力[1]（[1]酒総研，[2]広島大院・先端研）

3A21p08　焼酎粕の *S*-アデノシルメチオニンと葉酸の含量調査及び高含有要因の解析
15:27　○上佐古大貴[1,2]，　森本朋子[2]，　吉田聡子[2]，　福家成美[2]，向井伸彦[2]，山田　修[2]，藤井　力[1,2]（[1]広島大院・生物圏，[2]酒総研）

3A21p09　*S*-adenosyl-L-methionine を生産する *Saccharomyces cerevisiae* の代謝フラックス解析
15:38　○早川謙嗣[1,2]，梶畠秀一[1]，松田史生[1]，清水　浩[1]（[1]阪大院・情報・バイオ情報，[2]阪大院・工・カネカ基盤技術協働研究所）

3A21p10　出芽酵母遺伝子破壊株における中心代謝酵素発現量の変化
15:49　○松田史生[1]，　小倉泰郎[2]，　富田淳美[1]，　平野一郎[2]，清水　浩[1]（[1]大阪大情報，[2]島津製作所）

p11〜p15 発表者の接続時間 16:00〜16:10

3A21p11　長期継代培養によるエタノール非生産酵母の増殖改善株の取得
16:10　○森田啓介[1]，　富田淳美[1]，　松田史生[1]，　石井　純[2]，近藤昭彦[3]，清水　浩[1]（[1]阪大院・情報・バイオ情報，[2]神戸大・自科・研究環，[3]神戸大院・工・応化）

3A21p12　ワイン酵母におけるアルコールストレス応答の解析
16:21　○山本航平[1,2]，　五島徹也[1]，　渡邉大輔[1]，　下飯　仁[1,2]，赤尾　健[1,2]，福田　央[1]（[1]酒総研，[2]広島大院・先端研・分子生命）

3A21p13　ピルビン酸低減清酒酵母の実地醸造試験
16:32　○澤田和敬[1,2]，　柘植圭介[2]，　吉村臣史[2]，　鶴田裕美[2]，稲橋正明[3]，田口誠我[4]，福崎久詩[4]，北垣浩志[1,4]（[1]鹿児島大・連大農，[2]佐賀工技，[3]日本醸造協会，[4]佐賀大農）

3A21p14　オートファジー欠損清酒酵母の醸造特性解析
16:43　○佐田尚隆，浅井拓也，山下伸雄，明石貴裕（白鶴酒造）

3A21p15　dinitrophenol 耐性清酒酵母による小仕込試験
16:54　○中山俊一[1]，　桑子崇之[1]，　高部佳翼[1]，　小杉慎吾[1]，清　啓自[1]，満生慎二[2]，門倉利守[1]，中里厚実[1]（[1]東農大・応生・醸造，[2]九産大・工・物質生命化学）

p16〜p20 発表者の接続時間 17:05〜17:15

3A21p16　清酒酵母きょうかい 1 号の低生酸性変異株の育種
17:15 ○奥知広次[1]，　村上智子[2]，　五島徹也[2]，　赤尾　健[2]，福田　央[2]（[1]櫻正宗株式会社，[2]酒類総合研究所）

3A21p17　優良清酒酵母からの新規な尿素非生産性菌株の育種
17:26 ○五島徹也[1]，　濱田つかさ[1,2]，　村上智子[1]，　福田　央[1]，赤尾　健[1,2]（[1]酒総研，[2]広島大院・先端研・分子生命）

3A21p18　清酒のフェルラ酸およびフェルラ酸エチルレベルの変動要因について
17:37 鈴木伸和，廣嶋　魁，高野康人，伊藤俊彦，○橋爪克己（秋田県立大学生物資源科学）

3A21p19　講演取消

3A21p20　メタボロミクスにより推定された清酒成分と官能評価との相関解析
17:59 ○高橋　圭[1]，土屋文彦[2]，樺島文恵[2]　([1]酒類総合研究所，[2]LECO ジャパン）

A32 会場　午前の部（9:00〜12:05）

微生物―物質生産－発酵(二次代謝産物，抗生物質，ペプチド，生理活性物質)，物質生産－酵素，タンパク質―

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

3A32a01　細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* における *pks26* の機能解析
9:00 ○松本郁加，齊藤玉緒（上智大学・理工）

3A32a02　細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* における *O-methyltransferase 2* の機能解析
9:11 ○菅愛実子[1]，深澤汐香[1]，北　圭人[1]，齊藤玉緒[2]（[1]上智大院・理工，[2]上智大学・理工）

3A32a03　細胞性粘菌由来の分化誘導分子 4-methyl-5-pentyl-benzene-1,3-diol(MPBD)の構造活性相関
9:22 ○近藤杏奈[1]，　岩崎なつみ[2]，　成田隆明[1]，　小倉徹大[2]，村田ちひろ[2]，臼杵豊展[1]，齊藤玉緒[1]（[1]上智大学・理工，[2]上智大院・理工）

3A32a04　窒素源が *Fusarium graminearum* のトリコテセン系毒素産生制御におよぼす影響
9:33 ○鬼頭良幸，市川雛代，前田一行，中嶋佑一，金丸京子，小林哲夫，木村　真（名大院生命農）

3A32a05　出芽酵母レドックス代謝改変による酸化型グルタチオンの生産
9:44 ○原　清敬，青木直子，桐山健太郎，近藤昭彦（神戸大学）

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

3A32a06　南極細菌由来 *Flavobacterium* 属細菌の不凍タンパク質の検索とその諸性質
10:05 ○田中里佳，比嘉　桜，河原秀久（関西大化学生命工）

3A32a07　キチン由来ヘテロ 2 糖による海洋細菌のキチナーゼ生産誘導
10:16 ○白石晴香[1]，平野貴子[2]，袴田　航[1,2]，西尾俊幸[1,2]（[1]日本院生資科・生物資源利用，[2]日大生資科・生命科）

3A32a08　*Yarrowia lipolytica* TPU1602 由来旧黄色酵素の精製及び解析
10:27 ○永森慎吾[1]，　山本和範[1,2]，　伊奈隆年[1,2]，　銅谷正晴[3]，木原秀太[3]，浅野泰久[1,2]（[1]富山県大工・生工研セ，[2]JST，ERATO，[3](株)東邦アーステック）

3A32a09　Lactobacillus gasseri ME284 由来の X-prolyl-dipeptidyl aminopeptidase の精製と酵素学的特性
10:38 ○宮部亮祐[1]，　高橋祐人[1]，　松藤　寛[1]，　荻原　淳[1]，伊藤健太郎[1,2]，　川井　泰[1]，　増田哲也[1]，　鈴木公一[1]，　小田宗宏[1]（[1]日本大学，[2]株式会社明治・食機能科学研）

3A32a10　*Phialemonium* sp. AIU 274 由来 ω-アミノ基酸化酵素を利用したジカルボン酸合成
10:49 ○大江光章，山田美和，北條　渉，山下哲郎，礒部公安（岩手大農）

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

3A32a11　*Burkholderia* sp. 由来及び *Variovorax* sp. 由来の組換え β-Phe アミノアシラーゼの性質解析
11:10 ○加藤雄己，山崎　穣，竹澤俊大，橋本賢一，中松　亘，川崎　寿，夏目　亮（東電大・院・工）

3A32a12　*Arthrobacter* sp. KAIT-B-420 が産生するプトレッシンオキシダーゼ遺伝子置換による基質特異性の変化および耐熱化の検討
11:21 山村　晃，○川上勇希　（神奈川工科大応用化学・応用バイオ）

3A32a13　ハロ酸デハロゲナーゼ(HAD)スーパーファミリーに属する酵素のアミノ酸配列と機能との関連性の調査
11:32 ○殷　梓蘭，武田奈津美，中村　卓（長浜バイオ大学）

3A32a14　*Pseudomonas* sp. YL 由来ハロ酸デハロゲナーゼ L-DEX YL における F60Y 変異の D-体基質脱ハロゲン化反応への影響
11:43 ○中村　卓[1]，　出来弘幸[1]，　近藤洋隆[2]，　藤本和宏[3]，田中成典[3]（[1]長浜バイオ大学バイオサイエンス，[2]神戸大院人間発達，[3]神戸大院システム情報）

3A32a15　イネ・クマモリシン様遺伝子 AK109048 の酵母での発現
11:54 ○嶌岡考則[1]，古川和裕[2]，中山　亨[2]，尾山　廣[1]（[1]摂南大学理工，[2]東北大学工）

A32 会場　午後の部（14:00〜18:10）

微生物―物質生産－酵素，タンパク質―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

3A32p01　*Geobacillus kaustophilus* HTA426 高変異性株を利用した耐熱化変異酵素遺伝子の創出法
14:00 ○鈴木宏和[1,2]，　小林淳平[1,2]，　古川　恵[1]，　八木寿梓[2]，大城　隆[2]（[1]九州大農，[2]鳥取大工）

3A32p02　*Geobacillus kaustophilus* HTA426 で機能するチオストレプトン耐性マーカーの創出
14:11 ○和田圭介[1]，　小林淳平[1,2]，　古川　恵[1]，　土居克実[1]，八木寿梓[2]，大城　隆[2]，鈴木宏和[1,2]（[1]九州大農，[2]鳥取大工）

3A32p03　*Geobacillus kaustophilus* HTA426 高変異性株で派生した高温機能型クロラムフェニコール耐性プラスミドの解析
14:22 ○小林淳平[1,2]，　田靡実咲[2]，　土井奨平[2]，　古川　恵[1]，八木寿梓[2]，大城　隆[2]，鈴木宏和[1,2]（[1]九州大農，[2]鳥取大工）

3A32p04　合成生物学的手法によるエチレン生成シアノバクテリアの改良 -Ethylenome 過剰発現によるエチレンの高生産-
14:33 ○石川克也[1]，神藤定生[2]，細田晃文[1]，田村廣人[1]（[1]名城大農，[2]名城大理工）

3A32p05　合成生物学的手法によるエチレン生成シアノバクテリアの改良-Ethylenome の反応系最適化によるエチレンの高生産
14:44 ○神藤定生[1]，増井　寛[2]，細田晃文[2]，田村廣人[2]（[1]名城大理工，[2]名城大農）

p06〜p10 発表者の接続時間 14:55〜15:05

3A32p06　メタノール資化性酵母 Ogataea minuta でのタンパク質発現における各種ペプトンの効果
15:05 伊藤理恵[1]，　鈴木健之[2]，　津田将志[2]，　市川公久[2]，野中浩一[2]，横尾岳彦[1]，○千葉靖典[1]（[1]産総研・糖鎖創薬，[2]第一三共・バイオ医薬研）

3A32p07　メタノール資化性酵母を用いたトロンボモジュリン各領域の生産と解析
15:16 ○中村啓悟[1]，　由里本博也[1]，　池添隆之[2]，　西岡千恵[2]，本田剛一[3]，阪井康能[1]（[1]京大院農・応用生命，[2]高知大医・血液・呼吸器内科，[3]旭化成ファーマ株式会社）

3A32p08　シロアリ共生原生生物由来バイオマス分解酵素の異種生産と解析

15:27 ○小泉博比古[1]，塚越　光[1]，小田切正人[2]，守屋繁春[3,4]，北本勝ひこ[1]，有岡　学[1]（[1]東大院・農生科，[2]理研 BMEP，[3]横浜市立大，[4]理研抗生物質研）

3A32p09　酵母の超多コピープラスミドと改良 His タグによるタンパク質高生産精製システムの開発

15:38 ○喜納一貴，鈴木絢子，中村美紀子，星田尚司，赤田倫治（山口大学）

3A32p10　分裂酵母のゲノム情報を活用した染色体組込み型異種タンパク質生産系の構築

15:49 藤木真優[1]，アリムジャンイディリス[2]，○竹川　薫[1]（[1]九大院・農，[2]旭硝子）

p11〜p15 発表者の接続時間 16:00〜16:10

3A32p11　*Aspergillus niger* 由来芳香族ポリエステル分解酵素の発見と解析

16:10 ○老沼研一[1]，金子達雄[2]，高谷直樹[1]（[1]筑波大生命環境，[2]北陸先端大マテリアル）

3A32p12　*in vitro* における麹菌由来プラスミン様活性物質の探索

16:21 ○中村唱乃，菅美奈子，山下裕輔，丸　勇史，吉國義明，金　武祚（(株)ファーマフーズ）

3A32p13　黄麹菌 *Aspergillus oryzae* 酸性プロテアーゼ欠損株の菌体外プロテアーゼの解析

16:32 ○上野絢子，前田　浩，山形洋平，竹内道雄（東京農工大院・応生化）

3A32p14　麹菌の液体培養における酵素高生産機構の解析

16:43 ○田中　光[1]，佐野元昭[2]，砂川忠広[1]，小路博志[1]，大箸信一[2]，相澤正幸[1]（[1]アサヒビール・酒技研，[2]金沢工大・ゲノム研）

3A32p15　醸造用麹菌における熱誘導を利用した酵素の高生産に関する研究

16:54 ○横山翔一[1]，吉野光成[2]，前橋健二[1]，柏木　豊[1]（[1]東農大院・農・醸造，[2]東農大・応生科・醸造）

p16〜p20 発表者の接続時間 17:05〜17:15

3A32p16　麹菌における *prtR* 欠損は異種酵素生産量をさせる

17:15 ○新川　智，今井友裕，福浦麻衣子，光澤茂信（本田技術研究所）

3A32p17　突然変異誘発処理を行わずに育種した麹菌 *Aspergillus oryzae* の宿主

17:26 ○朽方康裕，利根川唯，森谷翔太，中島春紫（明治大農・農化）

3A32p18　水性二相分配法(ATPS)による麹菌由来 Hydrophobin HypA の分離・濃縮システムの構築

17:37 ○中野宏軌，朽方康裕，堂前圭佑，加瀬明日香，中島春紫（明治大農・農化）

3A32p19　麹菌の Hydrophobin を用いた機能性ペプチドの細胞表層への固定化と提示

17:48 ○中間　聖，大橋信太郎，中島春紫（明治大農・農化）

3A32p20　親水性ドメインを持つ麹菌のハイドロフォービン HypD の機能解析

17:59 ○石倉幹大，藤井祐希，土屋貴寛，稲葉拓哉，中島春紫（明治大学・農・農化）

A34 会場　午前の部（9:00〜11:54）

微生物―物質生産－微生物変換，微生物酵素反応―

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

3A34a01　テルペン系炭化水素 p-menthane の微生物水酸化による有用香料原料の生産

9:00 ○川瀬貴斗，玉村朋大，石田康行，金政　真，和田俊夫，塚本義則（中部大学応用生物）

3A34a02　大腸菌を用いた定常期におけるメバロン酸生産

9:11 ○増田亜美[1]，戸谷吉博[1]，徳山健斗[1]，坂野聡美[2]，吉川勝徳[1]，清水　浩[1]（[1]阪大院情報，[2]神大院工）

3A34a03　微生物生産にむけたビサボレン合成酵素の機能改良

9:22 ○藤井　爽，古林真衣子，李　伶，岩嵜美希，河合(野間)繁子，齋藤恭一，梅野太輔（千葉大院・工・共生応化）

3A34a04　モノテルペン合成酵素の活性進化と微生物生産への応用

9:33 ○岩嵜美希，古林真衣子，王　時飛，河合(野間)繁子，斎藤恭一，梅野太輔（千葉大院・工・共生応化）

3A34a05　ゲノム連続組み換え手法を用いたイソプレノイド生産量の高い大腸菌株の作出

9:44 ○齋藤聡司，冨永将大，李　伶，岩嵜美希，河合(野間)繁子，斎藤恭一，梅野太輔（千葉大院・工・共生応化）

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

3A34a06　フラビン依存性酸化酵素を利用したレスベラトロールの位置選択的酸化によるピセアタンノールの合成

10:05 ○古屋俊樹[1]，齋　政彦[2]，木野邦器[1]（[1]早大理工・応化，[2]森永製菓）

3A34a07　ヒドロキシリジン合成に有用な位置・立体選択的水酸化酵素の開発

10:16 ○原良太郎[1]，山縣　海[2]，三宅良磨[3,4]，川端　潤[3,4]，木野邦器[1,2]（[1]早大・理工研，[2]早大理工・応化，[3]三菱化学科学技術研究センター，[4]エーピーアイコーポレーション）

3A34a08　オルニチンシクロデアミナーゼを利用した有用ヒドロキシイミノ酸合成プロセスの開発

10:27 ○北辻早希[1]，山縣　海[1]，原良太郎[2]，木野邦器[1,2]（[1]早大理工・応化，[2]早大・理工研）

3A34a09　エクトイン水酸化酵素の特性解析とヒドロキシプロリン類縁化合物合成への応用

10:38 原良太郎[1]，○西川健幸[2]，纐纈健人[3]，木野邦器[1,2]（[1]早大・理工研，[2]早大理工・応化，[3]協和発酵バイオ）

3A34a10　立体構造解析に基づく L- アミノ酸リガーゼの改変と塩味増強効果を有する Met-Gly の選択的合成法の開発

10:49 ○木野はるか[1,2]，木野邦器[1]（[1]早大理工・応化，[2]長谷川香料(株)）

a11〜a14 発表者の接続時間 11:00〜11:10

3A34a11　改良型 DpkA とグルコース脱水素酵素による *N*-メチル-L-フェニルアラニンの合成

11:10 ○岡田　凌[1]，松井祐士[1]，山川　匠[1]，村松久司[1]，山本浩明[2]，永田信治[1]（[1]高知大農，[2]株式会社ダイセル）

3A34a12　P450BM3, P450bzo による芳香環を有するカルボン酸，アミンの生変換

11:21 ○新藤一敏[1]，杉山　牧[1]，中村悠里[1]，三沢典彦[2]（[1]日本女子大・家政・食物，[2]石川県立大・生物資源工学研）

3A34a13　Royal jelly に特異な稀少脂肪酸(*E*)-10-hydroxy-2-decenoic acid の二段階発酵生産

11:32 ○梶　真介[1]，岡　慶太[2]，木下翔也[2]，倉田淳志[2]，岸本憲明[2]（[1]近畿大院農，[2]近畿大農）

3A34a14　リジンから効率的にカダベリンを生産する大腸菌の育種

11:43 ○青柳隆大，松岡利奈，鈴木秀之（京都工繊大院応生）

A34 会場　午後の部（14:11〜17:59）

微生物―物質生産－微生物変換，微生物酵素反応―

p02〜p05 発表者の接続時間 14:01〜14:11

3A34p02　芳香族アミノ酸の生産における *aroA* 遺伝子高発現の収率向上への寄与

14:11 ○駒　大輔，山中勇人，森芳邦彦，大本貴士（阪市工研）

3A34p03　生体触媒を用いた AOH の合成

14:22 ○菊池礼花，崔　宰熏，河岸洋和，徳山真治（静岡大農）

3A34p04　大腸菌を利用した医薬中間体候補化合物であるメチル化ノルラウダノソリンコレクションの作製

14:33 ○中川　明[1]，杉本実菜世[1]，松村栄太郎[1]，小柳　喬[2]，

片山高嶺[3]，山本憲二[1]，佐藤文彦[4]，南　博道[1]（[1]石川県大資源研，[2]石川県大食品，[3]石川県大共生研，[4]京大院生命）

3A34p05　糸状菌を利用したキサントフモール配糖化による溶解性の改善

14:44　◦太田愛美，平田　拓，町田賢司，神田　一，高澄耕次，中村　剛（サッポロビール・価値創造フロンティア研究所）

p06〜p10 発表者の接続時間 14:55〜15:05

3A34p06　微生物反応及び化学反応を用いたトレハロースから希少糖 D- アロース生産の改良

15:05　◦成冨　旭[1]，　黒田智美[1]，　吉原明秀[1,2]，　高田悟郎[1,2]，森本兼司[1,2]（[1]香川大農，[2]香川大希少糖研究センター）

3A34p07　*Leuconostoc mesenteroides* が生成する不溶性グルカンから α-1,3-グルカンの調製

15:16　◦堀友佳理，若林安希，矢野成和（山形大院理工）

3A34p08　プロトカテク酸脱炭酸反応の強化とリグニン系芳香族化合物を原料とした *cis,cis*-ムコン酸生産へのアプローチ

15:27　◦諸岡深雪，今　仁志，園木和典（弘前大院農学生命）

3A34p09　*Aureobasidium pullulans* M-2 が産生する水溶性 β-1,3-1,6-D-グルカンの生合成に関する研究

15:38　◦内山博文[1,3]，　鈴木智大[2]，　草野妃里[4]，　岡部満康[4]，守屋祐生子[4]，守屋直幸[4]，加藤竜也[1,2]，朴　龍洙[1,2]（[1]静大創科技院，[2]静大グリーン研，[3]株式会社アウレオサイエンス，[4]株式会社アウレオ）

3A34p10　生理活性を有する β-1,3-グルカンオリゴ糖の酵素的増収法の検討

15:49　◦熊谷祐也[1,2]，奥山正幸[1]，木村淳夫[1]（[1]北大院農，[2]JSPS）

p11〜p15 発表者の接続時間 16:00〜16:10

3A34p11　L-ピペコリン酸 4 位水酸化酵素の機能解析と *trans*-4-ヒドロキシ-L-ピペコリン生産プロセスの開発

16:10　◦福田　大[1]，日比　慎[2]，森　亮輔[1]，小園祥子[2]，三宅良磨[3,4]，川端　潤[3,4]，高橋里美[2]，小川　順[1]　（[1]京大院・農・応用生命，[2]京大院・農・産業微生物，[3]三菱化学科学技術研究セ，[4]エーピーアイコーポレーション）

3A34p12　*Rhodococcus rubropertinctus* を用いた水酸化反応による医薬中間体の合成

16:21　石川千弘[1]，　◦宗石和久[1]，　木村隆利[2]，　日比　慎[2]，高橋里美[2]，小川　順[1]（[1]京大院農　応用生命，[2]京大院農　産業微生物）

3A34p13　コリネ型細菌を用いたプロトカテク酸の生産

16:32　◦岡井直子[1]，竹嶋康誠[1]，荻野千秋[2]，近藤昭彦[2]（[1]神戸大自，[2]神戸大院工）

3A34p14　微生物によるアクリル酸水和反応に関する研究

16:43　西川恵美[1]，　浦野信行[1]，　冨士亮介[2]，　西本菜津紀[1]，◦片岡道彦[1,2]（[1]阪府大院生環科・応用生命，[2]京大院農・応用生命）

3A34p15　生体制御分子硫酸体の調製技術の開発

16:54　◦下平武彦[1]，黒木勝久[1]，Liu Ming-Cheh[2]，榊原陽一[1]，水光正仁[1]（[1]宮崎大学院農工，[2]トレド大学薬）

p16〜p19 発表者の接続時間 17:05〜17:15

3A34p16　*Microbacterium* sp. TPU3598 を用いたルミクロムの効率的生産法の開発

17:15　◦山本和範[1,2]，浅野泰久[1,2]（[1]富山県大工・生工研セ，[2]JST, ERATO）

3A34p17　微生物変換による新規 Nrf2 活性化薬 RS9 の創出

17:26　◦増田華代子[1]，　飯塚真由美[1]，　小野泰典[1]，　大貫貴史[1]，江尻政彦[1]，　波田野恵美子[2]，　井上達也[2]，　小森谷聡[2]，　中神康裕[2]（[1]第一三共 RD ノバーレ株式会社，[2]第一三共株式会社）

3A34p18　新規 Nrf2 活性化薬RS9 大量合成を目的とした微生物変換法の確立

17:37　◦大貫貴史，　増田華代子，　坂本篤信，　南　雅子，石井由紀，藤原美恵，小野泰典，田中一新（第一三共 RD ノバーレ株式会社）

3A34p19　新規 Nrf2 活性化薬 RS9 の P450 異種発現株を用いた生産系の構築

17:48　◦小野泰典，増田華代子，福田大介，大貫貴史（第一三共 RD ノバーレ株式会社）

A36 会場　午前の部（9:11〜12:05）

微生物―細胞－情報伝達，細胞応答，ストレス応答―

a02〜a05 発表者の接続時間 9:01〜9:11

3A36a02　過酷な生育環境から単離された微細藻類がもつ新奇な環境ストレス耐性機構の解析

9:11　◦岡田和隆，長嶋雄大，淺野朋美，小俣　翼，加藤聖子，田邉義和，宮田彩実，新村洋一，川崎信治（東農大バイオ）

3A36a03　出芽酵母 α-マンノシダーゼ AMS1 の活性制御機構の解析

9:22　◦中井大貴，槙島一樹，氏原将人，山本祥平，若山　守，梅川碧里（立命館大生命）

3A36a04　HKR1 発現量と細胞極性制御および HM-1 キラートキシン耐性との関係

9:33　◦鈴木宇香，笠原　紳（宮城大・食産業・環境）

3A36a05　The role of intracellular manganese ion accumulation in yeasts against gamma-irradiation

9:44　◦Masakazu Furuta[1]，Tuan Anh Do[1,3]，Morio Murata[1]，Masao Kishida[2]（[1]Osaka Prefecture Univ. Eng.，[2]Osaka Prefecture Univ. Bio.，[3]IET-VAST）

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

3A36a06　酵母の酢酸耐性獲得における 7 回膜貫通型タンパク質 Mrh1 と Yro2 の寄与

10:05　◦河添希美，高畠暁子，井澤真吾（京工繊大応生）

3A36a07　エタノールストレス下の酵母 mRNA flux に対する TREX-2 構成因子欠損の影響

10:16　◦石田陽子[1]，　河合孝朗[1]，　池田佳代[2]，　井上善晴[2]，井澤真吾[1]（[1]京工繊大応生，[2]京大農）

3A36a08　出芽酵母 RNase T2 が関与するリボソーム分解機構の解析

10:27　◦陣内　凱，　島日佳理，　大石早希子，　大本哲也，小川哲弘，日高真誠，正木春彦（東大院農生科・応生工）

3A36a09　酵母細胞における青枯病菌エフェクターの膜局在化メカニズムの解析

10:38　忻　詩博，加本佳大，藤原祥子，東構真城，田中直孝，◦田淵光昭（香川大農）

3A36a10　宿主内因子によりグルタチオン分解活性を獲得する病原菌エフェクターの酵母システムによる解析

10:49　◦藤原祥子[1]，　川添智貴[1]，　長谷川純一[1]，　田中直孝[1]，大西浩平[2]，田淵光昭[1]（[1]香川大学農，[2]高知大学遺伝子実験施設）

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

3A36a11　酵母ユビキチンリガーゼ Rsp5 とアダプタータンパク質によるタンパク質の品質管理機構

11:10　◦志賀岳希，渡辺大輔，高木博史（奈良先端大・バイオ）

3A36a12　酵母ユビキチンリガーゼ Rsp5 の WW ドメインを介した基質認識機構の解析

11:21　◦村井浩紀，佐々木俊弥，渡辺大輔，高木博史（奈良先端大・バイオ）

3A36a13　分泌経路遮断時のシグナル伝達における Sch9 の機能解析

11:32　◦矢吹友佳理，船戸耕一，水田啓子（広島大院）

3A36a14　細胞形態形成ネットワーク MOR 経路と微小管制御系との機能関連性

11:43　◦金子さゆり[1]，水沼正樹[2]，平田　大[2,3]，久米一規[2]（[1]広島大・工，[2]広島大・院先端研，[3]朝日酒造）

3A36a15　DNA 複製チェックポイント経路による成長極性制御に関わる遺伝子の探索

11:54 ○鈴木将司[1]，水沼正樹[2]，平田　大[2,3]，久米一規[2]（[1]広島大・工，[2]広島大・院先端研，[3]朝日酒造）

A36 会場　午後の部（14:11〜18:10）

微生物―細胞－情報伝達，細胞応答，ストレス応答―

p02〜p05 発表者の接続時間 14:01〜14:11

3A36p02　高圧二酸化炭素処理によるバイオフィルムの殺菌
14:11 ○田上　峻，荒井　拓，渡邉一希，古川壮一，森永　康（日大院・生資科）

3A36p03　大腸菌のアミノ酸・核酸代謝関連遺伝子の変異がバイオフィルム形成におよぼす影響
14:22 ○太田瑛美，古川壮一，森永　康（日大院・生資科）

3A36p04　ショ糖脂肪酸エステルによるバイオフィルム形成阻害機構の解析
14:33 ○柳原希枝子，古川壮一，袴田　航，岩淵範之，荻原博和，森永　康（日大院・生資科）

3A36p05　改良型バイオアッセイ法を用いた *Rhodovulum sulfidophilum* の *N*-アシルホモセリンラクトン(AHL)生産の検証
14:44 ○寺田岳史[1]，沖見卓哉[1]，菊池　洋[2]，梅影　創[1]（[1]豊橋技術科学大学，[2]早稲田大学 先進理工）

p06〜p10 発表者の接続時間 14:55〜15:05

3A36p06　*Lysinibacillus* 属細菌由来新規アシル化ホモセリンラクトン分解遺伝子の機能解析
15:05 ○諸星知広[1]，菊池沙緒里[1]，染谷信孝[2]，池田　宰[1]（[1]宇都宮大学，[2]農研機構）

3A36p07　非リボソームペプチド(NRP)によるロドコッカス属細菌の自己凝集制御の可能性
15:16 ○茂木亮介[1]，長田啓司[2]，稲葉知大[2]，中島敏明[3]，内山裕夫[3]，豊福雅典[3]，野村暢彦[3]（[1]筑波大生物資源，[2]筑波大院生命環境，[3]筑波大生命環境系）

3A36p08　多様な AHL に応答する *Chromobacterium violaceum* のクオラムセンシングメカニズムの解析
15:27 ○島村裕子[1]，豊福雅典[1]，諸星知広[2]，池田　宰[2]，野村暢彦[1]（[1]筑波大院生命環境，[2]宇都宮大院工）

3A36p09　凝集体形成における細胞間コミュニケーションの新たな役割
15:38 ○森永花菜，豊福雅典，野村暢彦（筑波大院生命環境）

3A36p10　非運動性グラム陰性細菌によるバイオフィルム形成機構の解析
15:49 ○吉田圭太朗，豊福雅典，野村暢彦（筑波大院生命環境）

p11〜p15 発表者の接続時間 16:00〜16:10

3A36p11　緑膿菌環境単離株における QS システムの多様性
16:10 ○遠矢正城[1]，豊福雅典[1]，木暮一啓[2]，野村暢彦[1]（[1]筑波大院・生命環境，[2]東京大・大気海洋研）

3A36p12　Holin-Endolysin システムを介した緑膿菌のメンブランベシクル形成
16:21 ○黒沢正治，豊福雅典，野村暢彦（筑波大学・生命環境）

3A36p13　*Paenibacillus* 属細菌の集団内における芽胞形成
16:32 ○横山佳奈[1]，尾花　望[1]，久保田浩美[2]，横畑綾治[2]，湯井幸治[2]，野村暢彦[1]（[1]筑波大院生命環境，[2]花王安全性科学研究所）

3A36p14　蛍光菌 Pf0-1 株におけるプリン核酸生合成とバイオフィルム形成の関係(2)
16:43 ○吉岡資郎（分子研）

3A36p15　シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC6803 の塩ストレス誘導性バイオフィルム形成に必要なヒスチジンキナーゼの同定とシグナル伝達機構
16:54 ○永山達也[1]，久米井智裕[1]，牧野恒平[1]，井田智章[2]，赤池孝章[2]，鈴木石根[3]，七谷　圭[1]，魚住信之[1]（[1]東北大・院工・バイオ工学，[2]東北大・院医・環境保健医学，[3]筑波大・生命環境）

p16〜p20 発表者の接続時間 17:05〜17:15

3A36p16　機能未知二成分制御系 YehU/YehT によるバイオフィルム形成抑制機構の解明
17:15 ○石塚俊行[1,2]，石浜　明[3,4]，小笠原寛[1,2]（[1]信州大学・繊維・応用生物，[2]信州大・ヒト環境・遺伝子（信州大学ヒト環境科学研究支援センター遺伝子実験部門），[3]法政大学・生命科学・生物機能，[4]法政大・マイクロナノテク研）

3A36p18　枯草菌の定常菌の細胞死における SigI シグマ因子の役割
17:37 ○朝井　計[1]，清水葉子[1]，吉川博文[2]（[1]埼玉大院理工，[2]東京農大応生科）

3A36p19　大腸菌 SymE-SymR toxin-antitoxin system の SymE toxin は DNA ジャイレース阻害タンパク質である
17:48 ○山口良弘[1,2]，井上正順[3]（[1]阪市大複合先端，[2]阪市大院理，[3]ニュージャージー医科歯科大）

3A36p20　二酸化炭素による連鎖球菌莢膜多糖生産制御メカニズムの解明
17:59 ○三宅克英，松本裕子（石川県大資源研）

A37 会場　午前の部（9:00〜12:05）

微生物―代謝－代謝調節，発酵生理，メタボローム，遺伝子－ゲノム解析，メタゲノム，プロテオーム，バイオインフォーマティクス

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

3A37a01　大腸菌における新規チオ硫酸イオン輸送体 YeeED の機能解析
9:00 ○城山真恵加，河野祐介，大津厳生，高木博史（奈良先端大）

3A37a02　酵母 *Saccharomyces cerevisiae* における新規チオ硫酸代謝経路の発見とエタノール生産性の向上
9:11 ○舟橋依里，佐伯恭平，河野祐介，大津厳生，高木博史（奈良先端大）

3A37a03　麹菌の硝酸イオントランスポーター遺伝子の解析
9:22 ○佐野元昭，北川治恵，大箸信一（金沢工大）

3A37a04　酵母を用いた CO_2輸送体スクリーニング法の開発
9:33 ○中原由揮，柴坂三根夫，且原真木（岡山大・植物研）

3A37a05　ワインアロマ生成に関する酵母グリコシダーゼの解析
9:44 ○池原作務，小野大洋，遠藤尚矢，大森麻宥子，松村卓磨，妙田貴生，戸枝一喜，藤森　嶺，西澤　信，遠藤明仁，宮地竜郎，中川純一（東農業大生産）

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

3A37a06　*Aspergillus terreus* における pH 依存的イタコン酸生産制御機構の解明
10:05 ○安藤祥生[1]，尾花克哉[2]，金政　真[2]（[1]中部大院・応生，[2]中部大・環境生科）

3A37a07　酵母に含まれる代謝物マーカー探索における GC-MS 法と GC-MS/MS 法の比較
10:16 ○坂井健朗[1]，川名修一[1]，飯田順子[1]，馬場健史[2]，福崎英一郎[2]（[1]島津製作所，[2]大阪大学大学院工学研究科生命先端工学専攻）

3A37a08　Metabolome analysis revealed the effect of carbon catabolite repression to poly（γ-glutamic acid）biosynthesis in *Bacillus licheniformis*
10:27 ○HITOSHI MITSUNAGA[1]，LENA MEISSNER[2]，THOMAS PALMEN[2]，TAKESHI BAMBA[1]，JOCHEN BUECHS[2]，EIICHIRO FUKUSAKI[1]（[1]Dept.Biotech., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.，[2]AVT-Biochem. Eng., RWTH Aachen Univ.）

3A37a09　代謝システム解析に基づく酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の中心代謝調節機構の解明
10:38 ○西野駿佑，岡橋伸幸，富田淳美，松田史夫，清水　浩（阪大院・情報・バイオ情報）

3A37a10　グリセロール炭素源における大腸菌中枢代謝経路の ^{13}C フラックス解析
10:49　大橋秀伍，○戸谷吉博，清水　浩（阪大院・情報・バイオ情報）

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

3A37a11　*Penicillium purpurogenum* IAM7104 株における PP-V（12-carboxyl-monascorubramine）生産時特異的窒素代謝関連タンパク質の探索
11:10　○安井雅人[1]，加藤　順[2]，春見隆文[1,2]，荻原　淳[1,2]（[1]日本大学大学院，[2]日本大学）

3A37a12　メタボロームデータを基にしたメタ 16S 解析に用いる系統分類階級の提案
11:21　○脇田義久[1]，　下村有美[2]，　加戸久生[1]，　土屋陽一[1]，松本光晴[2]（[1]サッポロホールディングス・グループ研究戦略推進部，[2]協同乳業・技術開発）

3A37a13　メタゲノム中の生理代謝機能ポテンシャルを評価する新手法”MAPLE”システム
11:32　○荒井　渉[1]，　谷口丈晃[2]，　五斗　進[4]，　守屋勇樹[4]，竹本和弘[3]，黄　　鶴[1]，高見英人[1]（[1]海洋研究開発機構，[2]三菱総研，[3]九工大，[4]京大化研）

3A37a14　MAPLE ステムによる未培養アーキア *Ca.* ‘Caldiarchaeum subterraneum’ の生理・代謝ポテンシャル解析
11:43　○高見英人[1]，荒井　渉[1]，内山郁夫[2]，谷口丈晃[3]（[1]海洋機構資源，[2]基生研，[3]三菱総研生活）

3A37a15　好熱性アーキア *Vulcanisaeta* 属のゲノム情報にみた生物地理学的な特徴
11:54　○岩下　愛[1,2]，　伊藤　隆[2]，　大熊盛也[2]，　宇佐美論[3]，吉田泰彦[1]（[1]東洋大院理工，[2]理研 BRC・JCM，[3]東洋大理工）

A37 会場　午後の部（14:22〜17:48）

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

p03〜p05 発表者の接続時間 14:12〜14:22

3A37p03　GenomeMatcher のアノテーション支援機能
14:22　○大坪嘉行，永田裕二，津田雅孝（東北大院生命科）

3A37p04　抗真菌剤 FR901469 生産菌 No.11243 株の変異解析
14:33　○松井　真[1,2]，　横山達也[1,2]，　根本　薫[2]，　熊谷俊高[2,3]，寺井悟朗[2,4]，有田正規[2,5]，油谷幸代[2,6]，浅井　潔[2,6]，町田雅之[2,6]，柴田　孝[1,2]（[1]アステラス製薬株式会社，[2]高機能遺伝子デザイン技術研究組合，[3](株)ファームラボ，[4](株)インテック，[5]国立遺伝研，[6]産総研）

3A37p05　枯草菌における栄養状態に応じた新規 GTP 制御機構の解析
14:44　○大坂夏木[1]，　多喜乃雄太[1]，　高田　啓[1]，　兼崎　友[2]，吉川博文[1]（[1]東京農業大学，[2]東京農大・ゲノム解析センター）

p06〜p10 発表者の接続時間 14:55〜15:05

3A37p06　ゲノム解析から見た乳酸菌の D-アミノ酸高生産機構
15:05　○加藤志郎[1]，高橋俊成[2]，老川典夫[1,3]（[1]関大・先端機構，[2]菊正宗酒造，[3]関大・化学生命工）

3A37p07　放線菌 *Streptomyces incarnatus* NRRL8089 のドラフトゲノムシーケンス
15:16　○清水　瞳[1]，　大島健志朗[2]，　服部正平[2]，　稲垣賢二[1]，田村　隆[1]（[1]岡山大院・環境生命，[2]東大新領域）

3A37p08　酸性河川より分離された鉄酸化細菌 *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* NE106G のゲノム構造
15:27　○福島　淳，　東條ふゆみ，　浅野亮樹，　小林弥生，志村洋一郎，岡野邦宏，宮田直幸（秋田県立大学生資科）

3A37p09　世界で最初に単離された塩化芳香族化合物分解菌 *Pseudomonas knackmussii* B13 のゲノム解析
15:38　○宮崎　亮（産総研）

3A37p10　石油分解菌 Gordonia 属および Rhodococcus 属における alk 遺伝子系統解析
15:49　○堀口　悠，向　真樹，Dinesh Adhikari，荒木希和子，久保　幹（立命館大）

p11〜p15 発表者の接続時間 16:00〜16:10

3A37p11　高温メタン発酵微生物群集のメタゲノム解析
16:10　○堤　万穂[1]，　石井俊一[2]，　高妻篤史[1]，　上野嘉之[3]，渡邉一哉[1]（[1]東京薬科大学，[2]J. Craig Venter Institute，[3]鹿島技術研究所）

3A37p12　洗濯槽の臭気の実態解析
16:21　○森　圭輔[1]，　大石真嘉[1]，　中川未紗[1]，　城隆太郎[2]，海老敬行[2]，神藤宏明[1]，岡本貴弘[1]（[1]ライオン(株)ファブリックケア研究所，[2]ライオン(株)分析技術センター）

3A37p13　次世代シークエンサーを用いた洗濯槽バイオフィルムの細菌叢解析
16:32　○城隆太郎[1]，　海老敬行[1]，　森　圭輔[2]，　大石真嘉[2]，埴原鉱行[1]，須田　亙[3]，服部正平[3]，岩崎英明[1]（[1]ライオン(株)　分析技術センター，[2]ライオン(株)　ファブリックケア研究所，[3]東京大学大学院　新領域創生科学研究科）

3A37p14　圃場環境下でのダイズ根圏微生物叢及び微生物活性の変動
16:43　○杉山暁史[1]，上田義勝[1]，高瀬尚文[2]，矢崎一史[1]（[1]京都大生存研，[2]京都学園大バイオ環境）

3A37p15　農産物からの効率的な糸状菌検出に向けた研究
16:54　○鈴木忠宏，岩橋由美子（農研機構食総研）

p16〜p18 発表者の接続時間 17:05〜17:15

3A37p16　シロアリ腸内原生生物に細胞表面共生する *Symbiothrix dinenymphae* の 1 細胞ゲノム解析
17:15　○雪　真弘[1]，　桑原宏和[2]，　新谷政己[3,4]，　伊澤和輝[2]，本郷裕一[2,4]，大熊盛也[1,4]（[1]理研 CSRS，[2]東工大・院生命理工，[3]静大・院工，[4]理研 BRC・JCM）

3A37p17　梅ポリフェノールの経口投与によるマウス腸内細菌叢改善効果
17:26　○島田良美，香川昴雅，晋家崇史，堀西朝子，尾崎嘉彦，芦田　久（近畿大生物理工）

3A37p18　Asian Microbiome Project phase 2: アジア人の腸内細菌叢の加齢に伴う変化
17:37　○山本麻寿紗[1]，　東佳那子[1]，　百田理恵[1]，　本田倫子[1]，渡辺幸一[2]，　Shirchin Demberel[3]，　Sunee Nitisinprasert[4]，Park Yong Ha[5]，　Endang S. Rahayu[6]，　Fa-Zheng Ren[7]，Yuan Kun Lee[8]，園元謙二[1]，中山二郎[1]（[1]九州大学，[2]ヤクルト中央研究所，[3]モンゴル州立農業大学，[4]カセサート大学，[5]嶺南大学，[6]ガジャ・マダ大学，[7]中国農業大学，[8]シンガポール国立大学）

A41 会場　午前の部（9:00〜12:05）

微生物―細胞－構造，オルガネラ，小胞，分泌，細胞構成分子―

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

3A41a01　生体膜の流動性
9:00　○正木良和，西川ちひろ，楠部真崇，西本真琴（和高専）

3A41a02　好冷菌の生体膜流動性
9:11　○岩本直樹，西川ちひろ，西本真琴，楠部真崇（和高専）

3A41a03　生体膜流動性に与える DHA および EPA の影響
9:22　○西川ちひろ，正木良和，岩本直樹，西本真琴（和高専）

3A41a04　好熱性細菌 *Meiothermus ruber* H328 株由来ケラチン分解性プロテアーゼ巨大分子複合体の主要構成成分 2 タンパク質の機能と遺伝子発現に関する研究
9:33　○俣野明日香[1]，　山岡昂太[1]，　片岡真亜知[1]，　増村威宏[1]，川崎一則[2]，茂里　康[2]，渡部邦彦[1]（[1]京都府立大学，[2]産総研・健康工学）

3A41a05　遺伝子破壊株を用いた好熱性細菌 *Meiothermus ruber* H328 株が産生するケラチン分解性プロテアーゼに関する研究
9:44　◦西　海斗，渡部邦彦（京都府立大学）

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

3A41a06　糖脂質酵素 MPIase と タンパク質膜透過チャネル SecYEG に依存したタンパク質膜挿入反応の再構成
10:05　◦佐々木優[1]，Moser Michael[1]，永野孝典[1]，松林英明[2]，車ゆうてつ[3]，上田卓也[2]，西山賢一[1]（[1]岩手大寒冷バイオ，[2]東大新領域メディカルゲノム，[3]東工大地球生命研究所）
3A41a07　生細胞蛍光イメージングを用いた磁性細菌のアクチン様細胞骨格 MamK の機能解析
10:16　◦田岡　東[1,2]，清河文子[1]，上杉知佳[3]，福森義宏[1,2]（[1]金沢大・理工・自然システム，[2]金沢大・理工・バイオ AFM，[3]金沢大・院・自然科学）
3A41a08　植物病原性糸状菌 *Ustilago maydis* の感染時における初期エンドソーム動態の生理学的意義
10:27　◦樋口裕次郎[1]，Gero Steinberg[2]，竹川　薫[1]（[1]九大院農，[2]エクセター大生命科）
3A41a09　FIB-SEM を用いた糸状菌 *Trichoderma reesei* の菌体内構造の解析
10:38　◦藤原南帆[1]，田原伸悟[1]，志田洋介[1]，森川晃成[2]，多持隆一郎[2]，南郷脩史[3]，岡田　仁[4]，大隅正子[4]，小笠原渉[1]（[1]長岡技科大 生物，[2]日立ハイテクノロジーズ，[3]ラトックシステムエンジニアリング，[4]綜合画像研究支援）
3A41a10　マイコウイルスが宿主糸状菌の細胞壁構造におよぼす影響
10:49　◦望月翔子[1]，鈴木信弘[2]，笠原　紳[1]（[1]宮城大・食産業・環境，[2]岡山大・植物研）

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

3A41a11　麹菌 *A. oryzae* におけるオートファジー関連タンパク質 AoAtg9 の推定リン酸化部位変異体の解析
11:10　藤木耕平，◦菊間隆志，北本勝ひこ（東大院　農生科　応生工）
3A41a12　麹菌 *A. oryzae* におけるオートファジーによる核の分解の誘導条件探索
11:21　◦三谷隆宏，菊間隆志，北本勝ひこ（東大院・農生科・応生工）
3A41a13　麹菌 *A. oryzae* における Acyl-CoA binding protein の機能及び特殊な分泌経路の解析
11:32　◦川口航平，菊間隆志，北本勝ひこ（東大院・農生科・応生工）
3A41a14　Analysis of the septal association mechanism of Leashin protein in *Aspergillus oryzae*
11:43　◦PEI HAN，JUN-ICHI MARUYAMA，KATSUHIKO KITAMOTO（Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo）
3A41a15　麹菌 *Aspergillus oryzae* における AoFus3 相互作用タンパク質 FipB の作用解析
11:54　◦原田堅伍，矢萩大貴，丸山潤一，北本勝ひこ（東大院・農生科・応生工）

A41 会場　午後の部（14:00〜18:10）

微生物―細胞－構造，オルガネラ，小胞，分泌，細胞構成分子―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

3A41p01　二価カチオンで駆動する新奇べん毛モーターの発見
14:00　◦今澤　陸[1]，高橋優嘉[1,2]，青木　航[3]，佐野元彦[1]，伊藤政博[1,2,3]（[1]東洋大院・生命科学，[2]東洋大・バイオナノ，[3]東洋大・生命科学）
3A41p02　黄麹菌 *Aspergillus oryzae* CPase の分泌に及ぼす N 末端 5 アミノ酸配列の影響
14:11　◦榊原史子，佐野和紀，前田　浩，山形洋平，竹内道雄（東農工大院・応生化）
3A41p03　黄麹菌 *A. oryzae* における分生子特異的に発現する推定 reductase 遺伝子（*cspA*）とその natural antisense transcripts の機能解析
14:22　◦辻井　雅，奥田　聡，竹内道雄，山形洋平　（東京農工大・応生科）
3A41p04　対峙培養における黄麹菌 *A. oryzae* の菌糸塊形成の検討
14:33　◦加藤朝子[1]，倉科瑛衣[1]，庄野友理[2]，竹内道雄[2]，山形洋平[2]（[1]農工大院・応生化，[2]東京農工大・応生科）
3A41p05　分裂酵母の細胞核サイズ制御機構に重要な遺伝子の探索
14:44　◦久米一規[1]，Nurse Paul[2,3]（[1]広島大院・先端研，[2]英国癌研究所，[3]ロックフェラー大学）

p06〜p10 発表者の接続時間 14:55〜15:05

3A41p06　*in vitro* と *in vivo* で調べる分裂酵母の細胞質分裂の仕組み
15:05　◦柏崎　隼，馬渕一誠（学習院大理）
3A41p07　分裂酵母のゴルジ体膜表在性タンパク質複合体 Gmp ファミリーの解析
15:16　◦大山拓朗，中山紗季，児子隆英，田淵光昭，田中直孝（香川大・農・応用生物）
3A41p08　分泌経路で機能するレクチン様タンパク質 Emp43 の解析
15:27　◦神谷勇輝，川口宗馬，梨子木健人，鈴木章太郎，田淵光昭，田中直孝（香川大・農・応用生物）
3A41p09　分裂酵母の胞子細胞膜形成開始に関わる新規の遺伝子の取得と解析
15:38　◦新美柊子，中村太郎（大阪市大院理）
3A41p10　出芽酵母前胞子膜形成における PI4P および PI 4-kinase Stt4 の役割
15:49　◦中村　毅，奥村祐哉，舘川宏之　（東大院・農生科・応生化）

p11〜p15 発表者の接続時間 16:00〜16:10

3A41p11　出芽酵母におけるミトコンドリアへのホスファチジルエタノールアミンのオルガネラ間輸送における Sfh1p の機能
16:10　◦水池　彩[1]，小林新吾[1]，太田明徳[2]，堀内裕之[1]，福田良一[1]（[1]東大院・農生科・応生工，[2]中部大・応生・応生化）
3A41p12　出芽酵母細胞壁 β-1,6-グルカンの合成に関与する Kre9 と Kre6 の機能解析
16:21　林田光弘，◦野田陽一，依田幸司（東大院・農生科・応生工）
3A41p13　出芽酵母の機能未知必須膜タンパク質 Pga2 の解析
16:32　高橋竜一[1,2]，◦鵜口尚人[1,2]，野田陽一[1,2]，依田幸司[1,2]（[1]東大院農生科，[2]応生工）
3A41p14　出芽酵母におけるオートファゴソーム分解が脂質代謝に及ぼす影響
16:43　◦前田佑一郎，奥　公秀，阪井康能（京大院農）
3A41p15　出芽酵母モノカルボン酸輸送体 Jen1 のグルコース不活性化に必要なアレスチン様タンパク質 Art4 による Jen1 認識領域の探索
16:54　◦藤田翔貴，五味勝也，新谷尚弘（東北大院農・生物産業創成）

p16〜p20 発表者の接続時間 17:05〜17:15

3A41p16　リジン添加による出芽酵母アミノ酸トランスポーターのエンドサイトーシスを介した生育阻害
17:15　◦山口翔吾[1]，村尾奈美[1]，河田美幸[1,2]，関藤孝之[1]，柿沼喜己[1,2]（[1]愛媛大農，[2]愛媛大総合科学研究支援センター）
3A41p17　出芽酵母 Ypq1，Ypq2，Ypq3 は液胞塩基性アミノ酸輸送に関与する
17:26　◦真鍋邦男[1]，村尾奈美[1]，中村恭輔[1]，河田美幸[1,2]，関藤孝之[1]，柿沼喜己[1,2]（[1]愛媛大農，[2]愛媛大総合科学研究支援

センター）

3A41p18　出芽酵母のイソアミルアルコール誘導偽菌糸における細胞質微小管の伸長不全

17:37　○村田和加恵[1,2]，　金原聡子[1]，　北原　望[1]，　荻田　亮[1,3]，藤田憲一[1]，田中俊雄[1]（[1]阪市大院理，[2]米子高専物質，[3]阪市大・健康研セ）

3A41p19　糖ペプチド解析による新規 ERAD 基質糖タンパク質の探索

17:48　○細見　昭[1]，梶　裕之[2]，鈴木　匡[1]（[1]理研，糖鎖代謝学研究チーム，[2]産総研，糖鎖医工学研究センター）

3A41p20　嫌気条件下での耐熱性酵母 *Kluyveromyces marxianus* のミトコンドリア形態変化

17:59　○賀川翔太[1]，星田尚司[2]，赤田倫治[2]（[1]山口大・工・応化，[2]山口大・医系・応用分子生命）

B21 会場　午前の部（9:00〜12:05）

微生物―遺伝子ー構造，機能，その他―

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

3B21a01　*Streptomyces* 属放線菌 C42 由来のセルロース分解遺伝子カセットの構築とセルロース分解能の異種発現

9:00　○春日　和[1]，　千田優香[1]，　興野峻一郎[1]，　友常久実子[1]，牟田口祐太[1]，　志村洋一郎[1]，　石川　淳[2]，　池田治生[3]，　小嶋郁夫[1]（[1]秋田県大生資，[2]国立感染研，[3]北里大・北里生命研）

3B21a02　*Streptomyces rochei* 7434AN4 株の線状ゲノムの塩基配列解析

9:11　○稲田晋宣[1]，　曹　志生[2]，　ニンディタヨシ[2]，　張　奕雯[2]，田上道平[3]，　レジャヴァアレキサンダー[3]，　志波　優[4]，　吉川博文[4]，石川　淳[5]，　木梨陽康[2]，　荒川賢治[2]（[1]広島大・自然科学セ，[2]広島大院・先端研，[3]理研・OSC，[4]東農大・応生科，[5]国立感染研）

3B21a03　接合伝達を用いた遺伝子導入法の最適化

9:22　○横井崇紘[1]，森　浩禎[3]，板谷光泰[2]，片岡正和[1]（[1]信州大学，[2]慶応義塾大学，[3]奈良先端科学技術大学院大学）

3B21a04　放線菌プラスミド pSN22 由来接合伝達遺伝子による染色体移行の解析

9:33　○村端広介，　金　眞熙，　宮武　徹，　横井崇紘，　片岡正和（信州大院理工）

3B21a05　ナフタレン分解プラスミド NAH7 の接合伝達宿主域に関する研究

9:44　○岸田康平，大坪嘉行，永田裕二，津田雅孝　（東北大学・院生命）

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

3B21a06　オガ粉を使用しない食用キノコの栽培

10:05　○川手　亮，吉野一晴，渡邉　彰，麻田恭彦（香川大農）

3B21a07　バニリン添加時の選択的白色腐朽菌のプロテオーム解析

10:16　○渡邊崇人，吉岡康一，李　俊錫，西村裕志，渡辺隆司（京大・生存研）

3B21a08　アルファルファ根粒菌の共生系レセプター遺伝子 mcpS の発現と欠損株相補能の解析

10:27　柴田椋太，二宮道歩，杉野裕哉，栗田将平，○田渕　晃（信州大農・応用生命）

3B21a09　低温菌 *Shewanella livingstonensis* Ac10 のエイコサペンタエン酸生合成酵素の細胞分裂部位への局在性と複合体形成の解析

10:38　○小倉隆太郎，趙　賢南，川本　純，栗原達夫（京大化研）

3B21a10　*Shewanella livingstonensis* Ac10 由来新規アシルトランスフェラーゼ PlsC4 は特定の分枝鎖飽和脂肪酸を細胞膜リン脂質に導入する

10:49　○豊竹洋佑，　趙　賢南，　川本　純，　江崎信芳，　栗原達夫（京都大・化研）

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

3B21a11　低温菌 *Shewanella livingstonensis* Ac10 における細胞分裂タンパク質の細胞内局在におけるエイコサペンタエン酸の役割

11:10　○岩野友里子，川本　純，栗原達夫（京大・化研）

3B21a12　低温適応細菌 *Shewanella livingstonensis* Ac10 の外膜タンパク質の構造形成解析

11:21　○杉浦美和，浅井　梓，水谷彩乃，川本　純，栗原達夫（京大化研）

3B21a13　ω 末端修飾型高度不飽和脂肪酸アナログの合成

11:32　○徳永智久，渡辺文太，川本　純，栗原達夫（京大化研）

3B21a14　低温適応性 Shewanella 属細菌におけるカルジオリピン生産性の解析

11:43　○浅井　梓，杉浦美和，川本　純，栗原達夫（京大化研）

3B21a15　変敗食品より単離された低温適応性乳酸菌の固体表面への接着性の解析

11:54　○二宮健匡[1]，　後藤清太郎[2]，　川本　純[1]，　工藤和幸[2]，栗原達夫[1]（[1]京大化研，[2]日本ハム㈱商開研）

B21 会場　午後の部（14:00〜18:10）

微生物―その他―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

3B21p01　麹菌 hydrophobin RolA と cutinase CutL1 間の相互作用に関与する CutL1 分子表面のアミノ酸

14:00　○金　允卿[1]，　寺内裕貴[2]，　田中拓未[1]，　對馬裕誠[1]，上原健二[1]，高橋　徹[3]，阿部敬悦[1,2,3]（[1]東北大院農，[2]東北大･農，[3]東北大・未来研）

3B21p02　麹菌 hydrophobin RolA とポリエステル間の相互作用における Cys7-Cys8 ループの関与

14:11　○田中拓未[1]，　寺内裕貴[2]，　金　允卿[1]，　田邊弘毅[1]，上原健二[1]，大類景子[1]，高橋　徹[3]，阿部敬悦[1,2,3]（[1]東北大院農，[2]東北大農，[3]東北大未来研）

3B21p03　麹菌界面活性タンパク質 hydrophobin RolA の疎水性表面への吸着様式・吸着機構の解析

14:22　○永山恵美[1]，　寺内裕貴[2]，　田中拓未[1]，　田邊弘毅[1]，上原健二[1]，　高橋　徹[3]，　有田稔彦[4]，　樋口剛志[4]，　阿部敬悦[1,2,3]（[1]東北大院農，[2]東北大農，[3]東北大未来研，[4]東北大多元研）

3B21p04　イネいもち病菌を用いた薬剤標的分子解析法によるロキシスロマイシンの真核生物における作用点の探索

14:33　○石井　晶[1]，　草間瞬太[1]，　野坂亮仁[1]，　熊坂茉佑[1]，イサグゥイレヘスス[1]，　倉持幸司[2]，　紙透伸治[1]，　成川　恵[1]，菅原二三男[1]，鎌倉高志[1]（[1]東理大，[2]京都府立大）

3B21p05　Insecticidal activity of a recombinant baculovirus expressing spider venom cyto-insectotoxin（Cit1a）

14:44　○MD PANNA ALI[1]，　Tatsuya Kato[2]，　Enoch Park[1,2]（[1]Laboratory of Biotechnology, Department of Bioscience, Graduate School of Science and Technology, Shizuoka Univ., [2]Research Institute of Green Science and Technology, Shizuoka Univ.）

p06〜p10 発表者の接続時間 14:55〜15:05

3B21p06　TiO_2光触媒反応による細菌の細胞膜と呼吸活性への影響

15:05　○三ツ木理騎[1]，藤嶋　昭[2]，鈴木智順[1,2]（[1]東理大・応用生物，[2]東理大・総研）

3B21p07　細菌の細胞壁に対する光触媒反応の影響の検討

15:16　○大嶋佑治[1]，芦田美稀[1]，藤嶋　昭[2]，鈴木智順[1,2]（[1]東理大　応生，[2]東理大　総研）

3B21p08　光触媒反応による真菌の殺菌メカニズムと細胞壁損傷との関連性の解析

15:27　○並木康之[1]，　中田一弥[1,2]，　藤嶋　昭[2]，　池北雅彦[1,2]，鈴木智順[1,2]（[1]東理大・応用生物，[2]東理大・総研）

3B21p09　オキシダーゼ様触媒活性を有する天然由来低分子有機

化合物の発見

15:38 ○西山辰也[1]，　橋本義輝[1]，　日下部均[2]，　熊野匠人[1]，小林達彦[1]（[1]筑波大院　生命環境，[2]株式会社エンザイム・センサ）

3B21p10　有機触媒アクチノロージンの抗菌活性作用機序の解明および新規天然有機触媒のスクリーニング

15:49 西山辰也[1]，　○橋本義輝[1]，　日下部均[2]，　熊野匠人[1]，小林達彦[1]（[1]筑波大院　生命環境，[2]株式会社エンザイム・センサ）

p11〜p15 発表者の接続時間 16:00〜16:10

3B21p11　MALDI-TOF MS を用いた S10-GERMS 法による大腸菌 O157，O26 および O111 の識別

16:10 ○山本奈保美[1]，加藤晃代[2]，鈴木真弓[1]，田村廣人[1]（[1]名城大農，[2]（公財）科技財団）

3B21p12　枯草菌バイオフィルムを分解するファージタンパク質の同定と解析

16:21 ○山本達也，中村幸治，野村暢彦（筑波大生命環境）

3B21p13　水溶性テトラゾリウム塩を用いた微生物検出法：ハイスループットバイオフィルム薬剤感受性試験への適用

16:32 ○塚谷忠之[1]，末永　光[1]，志賀匡宣[2]，松本　清[3]（[1]福工技セ・生物食品研，[2]同仁化学研，[3]崇城大・生物生命）

3B21p14　チオフラビン T とローダミン B によって染色される内生胞子特異的構造体の蛍光顕微鏡観察

16:43 ○高松宏治[1]，　桑名利津子[1]，　木ノ内智之[2]，　藤田康弘[2]，山岸賢治[2]，伊藤　潔[1]（[1]摂南大薬，[2]キリン株品質保証）

3B21p15　クルクミン分解菌の単離

16:54 ○邵　　帥，萩下大郎，篠田吉史，清水　昌　（京都学園大院）

p16〜p20 発表者の接続時間 17:05〜17:15

3B21p16　漬物より分離した乳酸菌が有する抱合胆汁酸脱抱合酵素の解析

17:15 ○岩井克機，尾崎順哉，吉川悠子，大橋典男（静県大食品栄養）

3B21p17　ラオス，タイの淡水魚塩辛発酵ペースト（パーデック，プララー）の微生物相，成分分析

17:26 ○丸井淳一朗[1]，Sayvisene BOULOM[2]，Wanchai PANTHAVEE[3]，門馬真里[1]，楠本憲一[4]，中原和彦[1]，齋藤昌義[1]（[1]国際農研，[2]ラオス国立大・農，[3]カセサート大・食品研，[4]農研機構・食総研）

3B21p18　乳酸菌を用いた犬用発酵ペットフードの機能性評価

17:37 ○柳　裕子[1]，　坂本奈穂[1]，　神坂愛理奈[1]，　穴井直博[2]，村松久司[3]，永田信治[3]（[1]高知大農，[2]アミール動物病院，[3]高知大・生命環境）

3B21p19　黒酵母 β- グルカンの微生物と植物の生育に対する影響

17:48 ○池上裕倫[1]，　河原崎樹子[2]，　齋藤寛俊[2]，　長瀧　充[1]，村松久司[2]，永田信治[2]（[1]株式会社ソフィ，[2]高知大農）

3B21p20　薬物代謝酵素発現酵母を用いた医薬品および食品成分代謝物の調製

17:59 ○西川美宇[1,2]，　高平梨可[2]，　藤井美春[1]，　小池りりい[1]，安田佳織[2]，生城真一[2]，榊　利之[2]（[1]TOPU バイオ研究所，[2]富山県立大学）

B41 会場　午前の部（9:11〜11:54）

微生物―遺伝子－発現制御，トランスクリプトーム―

a02〜a05 発表者の接続時間 9:01〜9:11

3B41a02　*Pseudomonas putida* における好気呼吸鎖末端酸化酵素の発現調節

9:11 ○酒井義瑛，石井正治，新井博之（東大農）

3B41a03　緑膿菌における NADH 脱水素酵素の発現制御に関する研究

9:22 ○藤田結香，酒井義瑛，石井正治，新井博之（東大農）

3B41a04　超好熱菌 *Thermococcus kodakarensis* の転写制御因子

9:33 ○福田青郎[1]，　内田圭亮[1]，　JAZIRI Abdul Aziz[1]，市村瑞葉[1]，何あゆみ[1]，金井　保[2]，跡見晴幸[2]，今中忠行[1]（[1]立命館大生命，[2]京大院工）

3B41a05　高度好熱性細菌 *Thermus thermophilus* における ArgR を介した新規アルギニン生合成転写調節機構

9:44 ○森貞志穂[1,2]，　岩永直樹[1]，　富田武郎[1]，　西山千春[2]，葛山智久[1]，西山　真[1]（[1]東大生物工学セ，[2]東京理大生物工学科）

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

3B41a06　酢酸菌 *Gluconacetobacter europaeus* における転写調節因子 *Ge* Lrp の機能解析

10:05 ○石井友理[1]，赤坂直紀[2]，佐古田久雄[2]，藤原伸介[1]（[1]関西学院大院理工，[2]マルカン酢株式会社）

3B41a07　*Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 の 5- アミノレブリン酸（ALA）生合成遺伝子の転写制御に関する研究

10:16 ○天野　修[1,2]，石井正治[1,2]，新井博之[1,2]（[1]日本農芸化学会，[2]東大院農生科）

3B41a08　大腸菌における GGDEF/EAL ドメインタンパク質 YliE/YliF の機能解析

10:27 ○草間慶弘[1]，　渡部大樹[1]，　今野　環[2]，　久下貴紀[2]，塚田海斗[1]，杉本華幸[1,2]，渡邉剛志[1,2]，鈴木一史[1,2]（[1]新潟大院・自然科，[2]新潟大農・応生化）

3B41a09　大腸菌 type I toxin-antitoxin 遺伝子システム *ldr/rdl* における遺伝子発現制御機構

10:38 ○川野光興，石本　巧，水吉智彦，橋本兼吾（新潟薬大）

3B41a10　PCB 分解菌がもつビフェニル分解遺伝子群の 2 つの制御因子による制御

10:49 ○金井拓也，前田理久（明治大院農）

a11〜a14 発表者の接続時間 11:00〜11:10

3B41a11　枯草菌での 2 つの転写因子 YulB および CcpA を介したラムノース異化に関わるオペロンの制御機構

11:10 広岡和丈，○小土井祐介，藤田泰太郎　（福山大生命工・生物工）

3B41a12　*Geobacillus kaustphillus* のイノシトール代謝系遺伝子群の発現制御

11:21 ○田中耕生[1]，白江雄介[2]，岡田　大[2]，竹中慎二[1,2]，吉田健一[1,2]（[1]神戸大・自，[2]神戸大・農）

3B41a13　*Fusarium graminearum* のキシラナーゼ制御因子 Xyr1 の機能解析

11:32 ○古崎貴大，前田一行，中嶋佑一，金丸京子，小林哲夫，木村　真（名大院生命農）

3B41a14　*Ralstonia* sp.NT-80 株におけるリパーゼ転写調節因子 LipR80-4 の機能解析

11:43 ○多勢真大，関谷麻美，赤沼元気，石塚盛雄（中央大学）

B41 会場　午後の部（14:11〜18:10）

微生物―遺伝子－発現制御，トランスクリプトーム―

p02〜p05 発表者の接続時間 14:01〜14:11

3B41p02　糸状菌における鉄恒常性のマスターレギュレータ　HapX　の機能解析

14:11 ○村田俊輔，中村隼人，金子優平，志水元亨，加藤雅士（名城大農）

3B41p03　Molecular mechanisms underlying McmA-dependent discrimination of ManR/ClrB-regulated cellulase and mannanase genes in *Aspergillus*

14:22 ○Nuo Li，　Emi Kunitake，　Kyoko Kanamaru，Makoto Kimura，Tetsuo Kobayashi（Nagoya Univ.）

3B41p04　ヘミセルロースの分解・代謝を制御する糸状菌転写因子 XlnR/AraR の DNA 結合特性

14:33 ○石川香南，金丸京子，木村　真，小林哲夫　（名大院生命農）

3B41p05　Taka-amylase 遺伝子三重破壊株を用いた麹菌アスパ

ルテックプロテアーゼ遺伝子 *pepO* の上流域の解析
14:44 ○山崎周平[1]，　水谷　治[2]，　前田　浩[1]，　山形洋平[1]，竹内道雄[1]（[1]東京農工大院・応生化，[2]独立行政法人酒類総合研究所）

p06〜p10 発表者の接続時間 14:55〜15:05

3B41p06　麹菌解糖系遺伝子の選択的転写開始に関わるプロモーターと 5' 非翻訳領域の解析
15:05 ○井上大志，田路洋紀，高間　充，田中瑞己，新谷尚弘，五味勝也（東北大農）

3B41p07　固体培養特異的発現を示す麹菌のグルコアミラーゼ遺伝子(*glaB*)の発現を制御する転写因子 FlbC の機能
15:16 ○吉村　緑[1]，　田中瑞己[1]，　小川真弘[2]，　小山泰二[2]，新谷尚弘[1]，五味勝也[1]（[1]東北大院農，[2]野田産研）

3B41p08　麹菌の転写因子 AtrR と SrbA のアゾール系薬剤耐性への関与と細胞内局在解析
15:27 ○杉山航平[1]，　大場　歩[1]，　萩原大祐[2]，　田中瑞己[1]，新谷尚弘[1]，川本　進[2]，五味勝也[1]（[1]東北大学院・農・生物産業創成科学，[2]千葉大・真菌センター）

3B41p09　麹菌のアミラーゼ誘導生産におけるマルトース資化遺伝子(*MAL*)クラスターの役割
15:38 ○市川昂典，　長谷川-城祥子，　田中瑞己，　新谷尚弘，五味勝也（東北大院・農・産業創成）

3B41p10　麹菌のカーボンカタボライト抑制関連因子 CreA・CreB 二重破壊株はセルロース系バイオマス分解酵素も高生産する
15:49 ○一瀬桜子，田中瑞己，新谷尚弘，五味勝也（東北大院農）

p11〜p15 発表者の接続時間 16:00〜16:10

3B41p11　ゲノムデザインに向けた人工オペロンの構築
16:10 ○柘植謙爾[1]，　富樫　貴[1]，　長谷部雅子[1]，　冨田　勝[1,2]，板谷光泰[1,2]（[1]慶應大先端生命研，[2]慶應大環境情報）

3B41p12　合成生物学的アプローチに基づく 2 細胞の相互遺伝子発現制御システムの構築
16:21 ○木賀大介[1,2]，西田暁史[1]，鮎川翔太郎[3]（[1]東工大総理工，[2]東工大地球生命，[3]東工大情報生命）

3B41p13　人工遺伝子回路を用いた微生物共生システムの構築
16:32 ○鮎川翔太郎[1]，西田暁史[2]，木賀大介[2,3]（[1]東工大情報生命，[2]東工大院総理工，[3]東工大地球生命研）

3B41p14　*Streptomyces* 属で機能する誘導型高発現ベクターのシャトル化
16:43 ○松本雅子，齋藤結希，橋本義輝，熊野匠人，小林達彦（筑波大院　生命環境）

3B41p15　*Streptomyces* 属で機能する構成型高発現ベクターのシャトル化
16:54 ○齋藤結希，松本雅子，橋本義輝，熊野匠人，小林達彦（筑波大院　生命環境）

p16〜p20 発表者の接続時間 17:05〜17:15

3B41p16　油糧性微生物 *Mortierella alpina* 1S-4 株における新規プロモーターの探索および評価
17:15 ○奥田知生[1]，　安藤晃規[2]，　櫻谷英治[1,3]，　鎌田　望[4]，落合美佐[4]，小川　順[1,2]（[1]京大院・農・応用生命，[2]京大・生理化学，[3]徳島大院・ソシオ，[4]サントリーグローバルイノベーションセンター）

3B41p17　プラスミド pCAR1 上の転写開始点とプロモーター領域の網羅的解析
17:26 ○舘はる香[1]，　水口(鈴木)千穂[1]，　高橋裕里香[2]，大坪嘉行[3]，津田雅孝[3]，岡田憲典[1]，野尻秀昭[1]（[1]東大・生物工学セ，[2]富山県大生工科・生工研セ，[3]東北大院生命科学）

3B41p18　標的遺伝子の 5' 末端周辺配列が大腸菌発現系に及ぼす影響
17:37 ○安保紘高[1]，　原　啓文[2]，　石田尚之[1]，　今村維克[1]，今中洋行[1]（[1]岡山大院・自然，[2]マレーシア日本国際工科院）

3B41p19　標準 RNA を用いた mRNA 調製手順評価法に関する研究
17:48 ○平松大典[1]，岩橋　均[1]，高橋淳子[2]（[1]岐阜大学，[2]独立行政法人産業技術総合研究所）

3B41p20　新規酵素の探索を目指した，土壌 DNA 抽出法の検討
17:59 ○小林慶紀，藤井克彦，横山和平（山口大農）

B33 会場　午前の部（9:00〜12:05）

環境―バイオマス，バイオマス変換，バイオ燃料，バイオ化成品―

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

3B33a01　実バイオマスを微生物変換するための新しい酵母プラットフォームの探索
9:00 ○Kahar Prihardi，　李載みん，　荻野千秋，　近藤昭彦（神大工）

3B33a02　膜濃縮したソルガム搾汁液からのエタノール発酵
9:11 ○佐々木建吾[1]，　柘植陽太[1]，　佐々木大介[1]，　寺村　浩[2]，川口秀夫[2]，荻野千秋[2]，春日重光[3]，佐塚隆志[4]，近藤昭彦[2]（[1]神戸大・自然科学，[2]神戸大院・工・応化，[3]信州大・農学部附属アルプス圏フィールド科学教育センター，[4]名古屋大・生物機能開発利用研究センター）

3B33a03　組換えコリネ型細菌による 3-hydroxy-4-aminobenzoic acid 発酵におけるソルガム搾汁液の促進作用
9:22 ○川口秀夫[1]，　佐々木建吾[2]，　寺村　浩[1]，　柘植陽太[2]，中村聡子[1]，　菅井佳宜[3]，　勝山陽平[3]，　大西康夫[3]，　平野　恒[4]，佐塚隆志[4]，北野英己[4]，春日重光[5]，荻野千秋[1]，近藤昭彦[1]（[1]神戸大院・工・応化，[2]神戸大・自然科学，[3]東大院・農生命科学，[4]名古屋大・生物機能開発利用研究セ，[5]信州大・農付属アルプス圏フィールド科学教育研究セ）

3B33a04　ハロモナス菌を用いた木材糖化液からの 3- ヒドロキシ酪酸の生産の最適化
9:33 ○河田悦和[1]，野尻昌信[2]，松下　功[3]，坪田　潤[3]（[1]産総研，[2]森林総研，[3]大阪ガス）

3B33a05　前処理なしの草本系バイオマス(稲ワラ)より微生物複合酵素系による直接糖化並びに直接アルコール発酵生産
9:44 ○伊藤雅貴，勝田泰明，八木友己，倉根隆一郎（中部大学）

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

3B33a06　*Stenotrophomonas maltophillia* を用いた発酵法によるキチン糖化
10:05 ○高橋愛実[1]，　坂田有里[2]，　佐々木銀河[2]，　平野貴子[2]，袴田　航[1,2]，西尾俊幸[1,2]（[1]日大院生資科，[2]日大生資科）

3B33a07　*Kluyveromyces marxianus* DMB1 株の高温での同時糖化発酵特性
10:16 ○矢野伸一，滝村　修，星野　保（産総研バイオマスリファイナリー研究センター）

3B33a08　オイルパーム古木から生産されるエタノールのエネルギー収率に関する研究
10:27 ○村田善則[1]，　Hatairat Danjarean[1,5]，　藤本清彦[2]，小杉昭彦[1]，荒井隆益[1]，Wan Asma Ibrahim[3]，Othman Suliman[3]，Rokiah Hashim[4]（[1]国際農林水産業研究センター，[2]森林総合研究所，[3]マレーシア森林研究所，[4]マレーシア理科大，[5]カセサート大学農業・農工業生産改良研究所）

3B33a09　熱溶菌性糸状菌を用いたグルコース生産 〜最適培地とその産生効率の評価〜
10:38 ○森　慶太，佐々木裕起，向　真樹，アディカリディネシュ，荒木希和子，久保　幹（立命館大学）

3B33a10　エタノール発酵糸状菌のイオンビーム変異による高温耐性化およびリグノセルロースの同時糖化発酵への応用
10:49 ○角田貴一[1]，高野真希[2]，畑下昌範[3]，星野一宏[2]（[1]富山大工，[2]富山大院理工・ナノ新機能，[3]若狭湾エネ研）

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

3B33a11　葉面酵母 *Cryptococcus flavus* からの生分解性プラス

チック分解酵素の生産量の高い変異株の取得
11:10 ◦渡部貴志，鈴木　健，小板橋基夫，吉田重信，北本宏子（農環研）
3B33a12　2,3- ブタンジオール高生産菌の選択と生産条件の最適化
11:21 ◦大槻隆司[1]，望月隆一[1]，青木信雄[2]，宇井定春[1]（[1]山梨大院・総研・生命工，[2]JX 日鉱日石エネ・中研・先端領域研）
3B33a13　セルロース由来基幹化学品レブリン酸の微生物変換
11:32 ◦羽部　浩[1]，　佐藤　俊[1]，　森田友岳[1]，　福岡徳馬[1]，小林慶一[2]，桐村光太郎[2]，北本　大[1]（[1]産総研・環境化学，[2]早大理工・応化）
3B33a14　高濃度レブリン酸分解菌の単離と解析
11:43 羽部　浩[1]，　◦佐藤　俊[1]，　森田友岳[1]，　福岡徳馬[1]，小林慶一[2]，桐村光太郎[2]，北本　大[1]（[1]産総研・環境化学，[2]早大理工・応化）
3B33a15　ラクトースやグリセロールを炭素源として用いたプロピオン酸菌による有機酸生産
11:54 ◦布川玲奈[1]，松井　徹[2]，上田　誠[1]，高屋朋彰[1]（[1]小山高専物質，[2]東京工科大応生）

B33 会場　午後の部（14:00〜18:10）

環境―バイオマス，バイオマス変換，バイオ燃料，バイオ化成品―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

3B33p01　界面活性剤を用いた *Rhizopus oryzae* の乳酸生産性の向上
14:00 ◦壺井雄一，西村祐美，高橋史員，澤田和久，尾崎克也，五十嵐一暁，萩原　浩（花王(株)・生物科学研究所）
3B33p02　PCB/ ビフェニル分解菌を利用した環境汚染物質からの PHA 生産
14:11 ◦矢島泰斗，前田理久（明治大学）
3B33p03　フェイシンタンパク質による PHA 重合反応の促進効果
14:22 ◦牛丸和乗，柘植丈治（東工大院総理工）
3B33p04　高温高圧水処理によるイカ中骨からの β キチン調製
14:33 ◦長田光正[1]，　古関健一[2]，　古川滉人[2]，　中川裕子[2]，渡邊　崇[2]，二階堂満[2]，戸谷一英[2]（[1]信州大繊維，[2]一関高専物化工）
3B33p05　β- キチンナノファイバーの調製と物性評価
14:44 ◦二階堂望[1]，　古関健一[1]，　二階堂満[1]，　長田光正[2]，伊藤良仁[3]，　高橋　亨[3]，　小浜恵子[3]，　川崎一則[4]，　谷口隆雄[5]，成廣和枝[5]，山下和彦[5]，野村義宏[6]，戸谷一英[1]（[1]一関高専・物化工，[2]信州大・繊維，[3]岩手工技セ・食品技術，[4]産総研・関西センター，[5]ヤヱガキ醗酵技研，[6]農工大・農）

p06〜p10 発表者の接続時間 14:55〜15:05

3B33p06　コポリ(L-乳酸/グリコール酸)のステレオコンプレックスの生分解性
15:05 ◦中山敦好，川崎典起，山野尚子，上垣浩一（産総研関西）
3B33p07　生分解の ON/OFF を切り替え可能にしたポリマー系ナノコンポジットの開発
15:16 ◦安藤　仁，中山敦好，山野尚子，川崎典起，上垣浩一（産総研関西）
3B33p08　卵殻膜によるチロシナーゼ活性阻害とその応用
15:27 ◦谷藤尚貴，田中美樹，小西那奈，田原早央利（米子高専）
3B33p09　熱特性に優れた新規フェニル基導入型微生物ポリエステルの合成
15:38 ◦水野匠詞，柘植丈治（東工大院・総理工）
3B33p10　バイオイメージングを応用した炭化水素生産微細藻類が生産する脂肪酸の簡易評価系の検討
15:49 ◦大城龍之助，池松真也（沖縄高専・専・生資工）

p11〜p15 発表者の接続時間 16:00〜16:10

3B33p11　竹バイオマスのバイオリファイナリーの研究
16:10 ◦新井一斗[1]，　椎葉　究[1]，　幾竹美奈子[1]，　平木　純[2]，内園浩幸[2]，吉田周平[2]（[1]東京電機大学，[2]JNC 株式会社）
3B33p12　竹由来フェルラ酸を含むオリゴ糖のマウス血しょうコレステロールと腸内細菌叢に与える影響
16:21 ◦椎葉　究[1]，　前村美樹[2]，　新倉大貴[2]，　内園浩幸[3]，吉田周平[3]，　平木　純[3]，　岡田ひとみ[4]，　齋藤香織[4]，　西村裕志[4]，渡辺隆司[4]（[1]東京電機大学　理工学研究科，[2]東京電機大学　理工学部，[3]JNC 株式会社　水俣研究所，[4]京都大学生存圏研究所）
3B33p13　*Aurantiochytrium* 生産スクアレンによる抗炎症効果の検証
16:32 ◦坂巻　碧[1]，　本嶋秀子[2]，　VILLAREAL Myra[2,3]，吉田昌樹[3]，出村幹英[3]，渡邊　信[3]，礒田博子[2,3]（[1]筑波大学生命環境，[2]筑波大学北アフリカ研究センター，[3]筑波大学生命環境系）
3B33p14　青森ヒバ油の乳化と抗菌活性
16:43 ◦山田　陸，小川俊介，下村美文（東京工科大学）
3B33p15　茶葉から抽出した カテキン溶液による抗菌性試験
16:54 ◦小川俊介，山田　陸，下村美文（東京工科大学）

p16〜p20 発表者の接続時間 17:05〜17:15

3B33p16　こんにゃく飛粉加水分解物が乳酸菌やビフィズス菌の増殖に及ぼす影響
17:15 ◦田中雅幸，臼井祥悟，高屋朋彰（小山高専物質）
3B33p17　アカテガニ消化管からのバイオマス分解細菌の単離
17:26 ◦裏　佳織[1]，北原隆志[2]，柳井清治[2]，三宅克英[1]（[1]石川県大資源研，[2]石川県大環境）
3B33p18　リュウキュウアイおよびタデアイからの沈澱藍の製造に関わる微生物
17:37 ◦常盤　豊[1]，世嘉良宏斗[2]，市場俊雄[2]（[1]グリーン・プロダクツ・ラボラトリー有限会社，[2]沖縄県工業技術センター）
3B33p19　稲わらの高効率糖化酵素の探索と解析
17:48 ◦小野田絵理[1]，　藤井桃子[1]，　札　達央[1]，　金子愛唯[1]，三浦(鈴木)彩子[1]，相澤朋子[2]，野口　章[1]，長谷川功[1]（[1]日大，生資科，[2]日大，短大）
3B33p20　オイルパーム幹伐採後の貯蔵中にみられる糖蓄積現象の解明
17:59 ◦平林凌太朗[1]，　小杉昭彦[2]，　荒井隆益[2]，　韮澤　悟[2]，山川　隆[1]（[1]東京大学 農学生命，[2]国際農林水産業研究センター）

C31 会場　午前の部（9:00〜11:54）

環境―環境保全，浄化技術工学，バイオレメディエーション，環境汚染物質，バイオ電池関連―

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

3C31a01　細胞性粘菌の化学生態学的解析
9:00 ◦齊藤佑美子[1]，　宮崎早紀[1]，　Bartlem Derek[2]，　齊藤玉緒[3]（[1]上智大院・理工，[2]北海道大・農，[3]上智大学・理工）
3C31a02　植物成長促進細菌のウキクサへの共付着とその効果
9:11 ◦山川祐介[1]，菅原雅之[2,3]，三輪京子[1,3]，森川正章[1,3]（[1]北大・環境科学，[2]東北大・生命科学，[3]JST-ALCA）
3C31a03　大気浄化型壁面緑化における土壌環境の解析
9:22 ◦久保田謙三，天保美咲，河目裕介，西部洋晴（大和ハウス工業）
3C31a04　自然界には存在しない物質がないと生きられない生物：新しい生物学的封じ込め法の開発
9:33 ◦加藤祐輔（農業生物資源研）
3C31a05　ミツバチ類の社会性行動とヒト社会の科学コミュニケーション＆理科教育 .
9:44 ◦笹川浩美[1,2]（[1]跡見学園，[2]科学技術館）

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

3C31a06　哺乳類シトクロム P450 モノオキシゲナーゼによるポリ塩化ビフェニルの毒性低下メカニズム
10:05 ○見世慎太朗[1]，　加藤　晃[2]，　伊藤俊将[2]，　山本恵子[2]，乾　秀之[1,3]（[1]神戸大院農，[2]昭和薬科大，[3]神戸大遺伝子）

3C31a07　森林土壌から分離された水酸化 PCB 分解菌の特徴
10:16 ○村田(水上)里美[1,2]，　榊原風太[2]，　倉俣正人[2]，　高木和広[2]（[1]日本学術振興協会，[2]独立行政法人農業環境技術研究所）

3C31a08　有機塩素系殺虫剤 gamma-hexachlorocyclohexane 分解細菌の分子育種
10:27 荷川取佑記[1]，　宮崎　亮[2]，　古屋佑磨[1]，　大畑智史[1]，大坪嘉行[1]，○永田裕二[1]，津田雅孝[1]（[1]東北大院生命科，[2]産総研）

3C31a09　微細藻類における金属ナノ粒子の取り込み・吸着解析
10:38 ○三橋弘明[1]，　宮下振一[2]，　藤井紳一郎[2]，　安保　充[1]，高津章子[2]，日置昭治[2]，稲垣和三[2]（[1]明治大農・農化，[2]産総研・計測標準）

3C31a10　軽油分解菌 *Acinetobactor junii* M-2 の有する alkane 酸化酵素遺伝子の解析
10:49 ○村井恵一[1]，山崎周平[1]，玉置雅彦[2]，村上周一郎[1]（[1]明治大農・農化，[2]明治大農・黒川農場）

a11〜a14 発表者の接続時間 11:00〜11:10

3C31a11　超好熱菌 *Pyrobaculum islandicum* 由来のグルタミン酸脱水素酵素と高分子化補酵素を用いたバイオアノードの構築
11:10 ○山崎晃司[1]，　坂元博昭[1]，　里村武範[2,5]，　櫻庭春彦[3]，大島敏久[4]，末信一朗[1,2,5]（[1]福井大院・工・繊維，[2]福井大院・工・生物応用化，[3]香川大農，[4]大阪工大，[5]福井大学・生命セ）

3C31a12　バイオ燃料電池のための超好熱性アーキア *Pyrobaculum aerophilum* 由来マルチ銅オキシダーゼを用いたバイオカソードの構築
11:21 ○高村映一郎[1]，　内井俊貴[2]，　坂元博昭[1,3]，　里村武範[2,3]，櫻庭春彦[4]，大島敏久[5]，末信一朗[1,2,3]（[1]福井大院工・繊維，[2]福井大院工･生物応用化，[3]福井大･生命セ，[4]香川大農，[5]大阪工大）

3C31a13　微生物を用いたヒドリドイオン水から水素の発生
11:32 ○馬越唯斗[1]，及川栄作[2]，及川胤昭[3]（[1]呉高専専攻科，[2]呉高専環境都市工，[3](株)TAANE）

3C31a14　ヒドロゲナーゼの酸化的不活性化－速度論的解析に基づく回避戦略－
11:43 ○宋　慶盛[1]，　西原宏史[2,4]，　樋口芳樹[3,4]，　北隅優希[1]，白井　理[1,4]，加納健司[1,4]（[1]京大院農，[2]茨城大農，[3]兵庫県大，[4]Crest）

C31 会場　午後の部（14:00〜16:32）

環境―資源変換，資源再生利用―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

3C31p01　微生物による難溶性リン酸塩溶解機構の解明(1)リン酸カルシウム
14:00 ○岡野憲司，山栗瑞希，清原みなみ，本田孝祐，大竹久夫（阪大院工）

3C31p02　微生物による難溶性リン酸塩溶解機構の解明(2)リン酸鉄
14:11 ○矢野敦士，岡野憲司，本田孝祐，大竹久夫（阪大院工）

3C31p03　微生物による難溶性リン酸塩溶解機構の解明(3)リン酸アルミニウム
14:22 ○清原みなみ，岡野憲司，本田孝祐，大竹久夫（阪大院工）

3C31p04　好酸性鉄酸化細菌の集積培養系と単離株を用いた廃電子基板のバイオリーチング効率の比較検討
14:33 ○東條ふゆみ[1]，　大野谷成美[1]，　宮田直幸[1]，　梁　瑞録[1]，谷　幸則[2]，福島　淳[1]（[1]秋田県大，[2]静岡県大）

3C31p05　白金還元酵母の分子育種
14:44 ○伊藤理央，橋本　遥，黒田浩一，植田充美（京大院農・応用生命）

p06〜p10 発表者の接続時間 14:55〜15:05

3C31p06　*Fusarium oxysporum* を用いた CdSe 量子ドットの生成
15:05 ○山口賢明[1]，　鶴田嘉二朗[2]，　井村祐己[1]，　鈴木道生[1]，吉村悦郎[1]（[1]東大院農生科・応生化，[2]東大農）

3C31p07　ヒト毛髪由来ケラチンの材料化に関する研究
15:16 ○村上小枝子[1]，廣井哲也[1]，國崎幹教[2]（[1]神奈川県産業技術センター，[2](株)クニザキ）

3C31p08　幌延深部地下環境から取得した微生物による嫌気条件下での腐植物質分解。
15:27 ○上野晃生[1]，　清水　了[1]，　玉村修司[1]，　荒牧憲隆[1]，長沼　毅[2]，金子勝比古[1]（[1]幌延地圏環境研究所，[2]広島大院・生物圏科学）

3C31p09　有機質肥料中の二次多量要素および微量要素の分析
15:38 ○樋口空生，中辻貴広，向　真樹，ADHIKARI Dinesh，荒木希和子，久保　幹（立命館大）

3C31p10　乳酸菌 *Enterococcus faecalis* を用いたバイオディーゼル廃液の細胞毒性評価
15:49 ○土肥裕希（岡山理大・工）

p11〜p12 発表者の接続時間 16:00〜16:10

3C31p11　セレン蓄積植物における亜テルル酸取り込みと代謝
16:10 ○武田　徹[1]，宇賀　司[1]，田畑翔太郎[1]，阪口利文[2]（[1]近畿大農，[2]県立広島大生命環境）

3C31p12　麹菌による好気的条件におけるセレンオキサニオン変換とセレン回収
16:21 ○阪口利文[1,2]，木村博美[2,3]，有馬寿英[2]，岡村好子[3]（[1]県立広島大生命科，[2]県立広島大環境科，[3]広島大院先端物質）

C25 会場　午前の部（9:11〜12:05）

生物化学工学―生物材料工学，生体医用工学―
新技術―分析法，解析法―

a02〜a05 発表者の接続時間 9:01〜9:11

3C25a02　ガラスカイメン類カイロウドウケツ由来シリカ粒子形成促進たんぱく質“グラシン”
9:11 ○天野太郎[1]，有馬二朗[1]，森　信寛[1]，清水克彦[2]（[1]鳥取大農，[2]鳥取大産学連携機構）

3C25a03　リジルオキシダーゼ(LOX)活性を保持した卵殻膜のヒト皮膚に対するバリア機能回復促進効果
9:22 ○山津敦史，山下裕輔，伊井野貴史，青笹正義，丸　勇史，吉國義明，金　武祚（(株)ファーマフーズ）

3C25a04　酵母抽出物による肌保護効果
9:33 ○伊井野貴史，坂下真耶，山下裕輔，丸　勇史，吉國義明，金　武祚（(株)ファーマフーズ）

3C25a05　ポリ -γ- グルタミン酸の化学改質と金属親和性の改変
9:44 ○芦内　誠，尾池翔太，白米優一（高知大農）

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

3C25a06　固相上誘導体化法を用いた GC/MS メタボローム解析手法の開発
10:05 ○馬場健史[1]，　佐々野僚一[2]，　山下俊幸[1]，　福崎英一郎[1]（[1]阪大院・工・生命先端，[2]アイスティサイエンス）

3C25a07　超臨界流体クロマトグラフィータンデム質量分析による残留農薬の高感度迅速一斉分析
10:16 ○和泉自泰[1]，　高橋政友[1,2]，　石橋愛実[1]，　酒井美穂[1,2]，安藤　孝[2]，福崎英一郎[1]，馬場健史[1]（[1]大阪大院工・生命先端，[2]宮崎農試）

3C25a08　非分割化メタボノミクス法の各種ヒト非侵襲的試料への適用
10:27 ○三澤拓真[1]，　塩川由佳[1]，　伊達康博[1,2]，　菊地　淳[1,2,3,4]（[1]横市院生命医，[2]理研 CSRS，[3]理研 BMEP，[4]名大院生命農）

3C25a09　ヒト由来代謝物のメタボノミクスにおける非線形アプローチの構築
10:38　◦塩川由佳[1]，三澤拓真[1]，伊達康博[2]，菊地　淳[1,2,3]（[1]横市院，[2]理研 CSRS，[3]名大院）

3C25a10　代謝混合物の 2D-J NMR データの解析 web ツールの開発と量子化学計算による帰属支援
10:49　◦中山　超[1,2]，　坪井裕理[2]，　伊達康博[2,4]，　近山英輔[2,3]，菊地　淳[2,5]（[1]東理大・理，[2]理研 CSRS，[3]新国情大・情，[4]横市院・生医，[5]名大院・生命農）

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

3C25a11　網羅的発現解析手法（HiCEP 法）の原核生物への応用
11:10　裏地美杉[1]，　湯野川春信[2]，　砂山美里[3]，　荒木良子[3]，万　クン[1]，◦畑中唯史[1]（[1]岡山生物研，[2]メッセンジャー・スケープ株式会社，[3]放医研）

3C25a12　HiCEP 法と次世代シーケンサーによる遺伝子発現データベースの構築
11:21　◦湯野川春信[3]，　砂山美里[2]，　荒木良子[2]，　裏地美杉[1]，畑中唯史[1]（[1]岡山生物研，[2](独)放射線医学総合研究所　遺伝子・細胞情報研究室，[3]メッセンジャー・スケープ(株)）

3C25a13　化学発光を利用した HPLC ポストカラム法による Fe（III）キレーター分析法の開発と応用
11:32　◦有賀智子，井村祐己，鈴木道生，吉村悦郎（東大院・農生科・応生化）

3C25a14　TLC を用いた環境水中アクリル酸の簡便定量法の開発
11:43　◦佐野芽生，陳　泰駿，麻生祐司，小原仁実（京都工芸繊維大学）

3C25a15　グラム陰性菌リポ多糖構成分子 lipid A の LC-MS 分析法の確立
11:54　◦大石美月，吉川悠子，大島寛史，三好規之（静岡県大食栄科学）

C25 会場　午後の部（14:00〜18:10）

新技術―分析法，解析法，先端バイオ計測，アレイ，コンビバイオ工学等，その他―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

3C25p01　再生利用が可能な表面プラズモン共鳴センサーへのリガンドの新規固定法
14:00　◦奥村史朗[1]，岩倉宗弘[2]（[1]福岡県工技セ，[2]九州計測器）

3C25p02　生物化学工学分野で使用可能な蛍光式酸素センサーパッチの開発
14:11　◦富田悟志，妙園薗勉，石川周太郎（エイブル株式会社）

3C25p03　汎用的な細胞内温度計測を目指したレシオ型蛍光プローブの開発
14:22　◦辻　俊一[1]，　井門久美子[1]，　河本恭子[2]，　林　晃之[3]，稲田のりこ[3]，吉田有人[1]，内山聖一[2]（[1]キリン基盤研，[2]東大薬，[3]奈良先端大）

3C25p04　薄層リング電極を用いたアンペロメトリックセンサーの開発
14:33　◦北隅優希，濱本勝美，白井　理，加納健司（京大院農）

3C25p05　全血糖範囲測定を目指した分子センサー/グルコース親和性の制御
14:44　◦鈴木良順，甲元一也（甲南大 FIRST）

p06〜p10 発表者の接続時間 14:55〜15:05

3C25p06　C4D 検出器を利用した NFT 型水耕液の簡易分析（その 2）
15:05　◦長谷部誉人[1]，　東　良太[1]，　吉野将紀[2]，　岡部勝美[2]，安保　充[1]（[1]明治大農・農化，[2]明治大・黒川農場）

3C25p07　β-グルコース加水分解酵素反応における低周波マイクロ波効果の研究
15:16　◦長島　生[1]，杉山順一[2]，清水弘樹[1]（[1]産総研生物プロセス，[2]産総研ナノシステム）

3C25p08　精密合成対応型マイクロ波反応装置の開発と，その特性
15:27　◦清水弘樹[1]，長島　生[1]，大木裕太[2]，高橋直行[2]（[1]産総研生物プロセス，[2]東京理化器械 開発部門）

3C25p09　デュアルフィルトレーションを用いた細菌検査試料前処理法の開発
15:38　◦種田明子，金政　真（中部大・環境生科）

3C25p10　光学式微生物微小コロニー検査装置の開発
15:49　◦海谷慎一[1]，中内茂樹[2]（[1]豊橋技科大　環境生命工，[2]豊橋技科大 情報知能工）

p11〜p15 発表者の接続時間 16:00〜16:10

3C25p11　光変換型蛍光蛋白質 Kaede を用いた大腸菌の細胞分裂と極齢の観察
16:10　◦陶山哲志，水野敬文（産総研）

3C25p12　ウミホタル由来の分泌型ルシフェラーゼ（CLuc）発光変異体を用いたデュアルカラーレポーターアッセイ系の構築に向けての基礎検討
16:21　◦善福　大[1,2]，　佐原健彦[1]，　森田陽介[1]，　栃木裕貴[1,3]，西宮佳志[1]，　呉　　純[4]，　近江谷克裕[5]，　扇谷　悟[1]，　森田直樹[1]（[1]産総研・生物プロセス，[2]北海道ハイテクノロジー専門学校，[3]現　日本獣医生命科学大学・獣医，[4]産総研・健康工学，[5]産総研・バイオメディカル）

3C25p13　微生物代謝酵素を利用したヒドロキシプロリンの定量法
16:32　◦渡辺誠也[1]，　平岡芳信[2]，　遠藤志織[1]，　谷本佳彰[1]，渡部保夫[1]（[1]愛媛大・農，[2]愛媛県産技研）

3C25p14　目的遺伝子タンデム化方法と目的タンパク質生産への応用
16:43　◦渋井達郎，坂口大介，原　宏佳（日本獣医生命科学大学　応用生命）

3C25p15　多入力型 T7 プロモータの設計と改良
16:54　◦佐伯和哉，　宮口明恵，　河合（野間）繁子，　斎藤恭一，梅野太輔（千葉大院・工・共生応化）

p16〜p20 発表者の接続時間 17:05〜17:15

3C25p16　等温核酸増幅産物の新規目視検出法に関する研究
17:15　◦佐野創太郎，宮本重彦，田中穂積（株式会社カネカ）

3C25p17　局所麻酔剤プロカインの作用機序についての考察-脂質二分子膜を介したイオン透過に与える影響に基づく評価-
17:26　◦白井　理，山口拓也，北隅優希，加納健司（京大院農）

3C25p18　クチクラ膜内の成分の濃度勾配の可視化
17:37　◦東　順一[1]，　松村由貴[2]，　本田与一[2]，　大熊桂樹[3]，金山裕亮[4]，米森敬三[2]，宇山　浩[1]（[1]阪大工，[2]京大農，[3]長野県農協地域開発機構，[4](株)サンアクティス）

3C25p19　強磁場・高磁気力環境下におけるタンパク質結晶成長
17:48　◦中村　顕[1]，廣田憲之[2]，和田　仁[1]，田之倉優[1,3]（[1]東大院農生科，[2]物材機構，[3]東大磁気力場研究連携ユニット）

3C25p20　甘味タンパク質ソーマチンの連続フェムト秒結晶構造解析
17:59　◦桝田哲哉[1,2]，　南後恵理子[2]，　菅原道泰[2]，　鈴木　守[2,3]，登野健介[4]，　城地保昌[4]，　亀島　敬[4]，　Park Jaehyun[2]，Song Changyong[2]，　初井宇記[2]，　矢橋牧名[2]，　大久保喬平[1]，三上文三[5]，北畠直文[1,6]，谷　史人[1]，岩田　想[2,7]（[1]京大院・農・食品生物，[2]理化学研究所　放射光科学総合研究センター，[3]阪大　蛋白研，[4]高輝度光科学研究センター，[5]京大院・農・応用生命，[6]ノートルダム清心女大，[7]京大院・医）

C22 会場　午前の部（9:00〜12:05）

酵素―酸化還元酵素―

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

3C22a01　脱窒菌 *Pseudomonas stutzeri* 由来ケルセチナーゼ遺伝子の大腸菌を用いる異種発現
9:00　◦片岡邦重，　ウィディアトニングラムタリサ，　前田空人，

櫻井　武（金沢大院・自然科学）

3C22a02　酸素耐性の高いヒドロゲナーゼへのアフィニティタグ付加と簡易精製法の検討

9:11　°井本知志[1]，　三島朱加[1]，　Kasia Bieria[2]，　稲垣賢二[1]，田村　隆[1,3]　([1]岡山大院・環境生命，[2]仏・LCABIE，[3]JST さきがけ)

3C22a03　高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 由来 TthA0610/1422 の発現と諸性質の検討

9:22　°周藤慎也，福山慎也，稲垣賢二，田村　隆　(岡山大院・環境生命)

3C22a04　ヤンバルトサカヤスデ由来マンデロニトリル酸化酵素の性質と組織局在性の解明

9:33　°石田裕幸[1,2]，伊奈隆年[1,2]，浅野泰久[1,2]　([1]富山県大工・生工研セ，[2]JST, ERATO)

3C22a05　*Aspergillus carbonarius* AIU 205 株が産生する 3 種の 4- アミノブチルアミド酸化能を持つ酵素の性質の比較

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

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

3C22a06　*Ochrobactrum* sp. AIU 033 由来アルコール酸化酵素のクローニングと組換え発現系の構築

10:05　°武藤　瞳，山田美和，礒部公安（岩手大農）

3C22a07　*Ogataea polymorpha* NBRC 0799 が産生するアルコール脱水素酵素の精製と性質解明

10:16　°上田量子[1,2]，　松井大亮[1,2]，　礒部公安[1,2]，　西井哲郎[3]，石井章央[3]，浅野泰久[1,2]　([1]富山県大工・生工研セ，[2]JST, ERATO，[3]セントラル硝子)

3C22a08　好熱性水素細菌 *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6 のフェレドキシン還元系に関する研究

10:27　°小倉一将，新井博之，石井正治（東大院農生科･応生工）

3C22a09　*Lactobacillus casei* 由来の L 型乳酸脱水素酵素におけるアロステリック部位変異体の解析

10:38　°久保志歩，古川那由太，簗瀬　優，中島将博，田口速男（東理大院）

3C22a10　グラム陰性細菌由来アロステリック型四量体 D 型乳酸脱水素酵素の機能と構造における多様性

10:49　°古川那由太[1]，　宮永顕正[2]，　戸川美里[1]，　中島将博[1]，田口速男[1]([1]東理大院，[2]東工大院)

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

3C22a11　ニワトリ脂肪肝で特異的に発現する NAD(P)H 依存性カルボニル還元酵素の X 線結晶構造解析

11:10　°福田雄大[1]，　曽根孟起[1]，　荒木朋洋[1]，　仁木隆博[1]，櫻庭春彦[2]，大島敏久[3]，芝田　猛[1]，米田一成[1]([1]東海大学，[2]香川大学，[3]大阪工業大学)

3C22a12　超好熱性古細菌フェレドキシン $NADP^+$ レダクターゼの構造と機能

11:21　イェンチェン，　馬込明音，　荒川孝俊，　伏信進矢，°若木高善（東京大学・院農生科・応生工）

3C22a13　*Amphibacillus xylanus* の NADH oxidase(Nox)-AhpC(Prx)複合体の溶液構造

11:32　°木俣真弥[1]，　望月大地[1]，　原　敬太[1]，　松本　崇[2]，矢嶋俊介[1]，　有坂文雄[3]，　金丸周司[3]，　佐藤純一[1]，　川崎信治[1]，新村洋一[1]([1]東農大応生科・バイオ，[2]リガク，[3]東工大生命理工・分子生命科学)

3C22a14　Crystal structure of 5-formyl-3-hydroxy-2-methylpyridine 4-carboxylic acid 5-dehydrogenase, an NAD^+-dependent dismutase from *Mesorhizobium loti*

11:43　°ANDREW MUGO[1]，Jun Kobayashi[2]，Bunzo Mikami[2]，Yu Yoshikane[1]，Toshiharu Yagi[1]，Kouhei Ohnishi[1]　([1]Kochi Univ., [2]Kyoto Univ.)

3C22a15　ジベンゾチオフェンモノオキシゲナーゼ(TdsC)の立体構造解析と機能改変

11:54　°浜本春香[1]，　日野智也[1]，　八木寿梓[2]，　鈴木宏和[1]，永野真吾[1]，大城　隆[1]([1]鳥取大院・工，[2]鳥取大・工・GSC)

C22 会場　午後の部（14:00〜18:10）

酵素―酸化還元酵素―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

3C22p01　海洋性アンモニア酸化細菌 Nitrosomonas cryotolerans のシトクロム c554 の精製と発現系の構築

14:00　°塩谷　惟，藤原健智（静岡大学）

3C22p02　マグネタイトの生合成における磁性細菌特有の *c* 型シトクロム MamP の役割

14:11　°江口友佳子[1]，　見世慎吾[1]，　田岡　東[2,3]，　福森義宏[2,3]([1]金沢大院自然科学，[2]金沢大理工，[3]金沢大バイオ AFM 先端研究センター)

3C22p03　化学修飾されたチロシンが配位したヘムを有する anammox 菌由来のシトクロム *c*

14:22　°平　大輔[1]，　能登原暁穂[1]，　中村照也[2]，　山縣ゆり子[2]，古川憲治[3]，藤井隆夫[1]([1]崇城大応生命，[2]熊大院薬，[3]熊大院自然科学)

3C22p04　好熱菌および常温菌由来シトクロム c' への変異導入による安定性変化

14:33　°藤井創太郎[1]，　山根大典[1]，　政成美沙[1]，　若井　暁[2]，山中　優[3]，三本木至宏[1]([1]広島大生物圏，[2]神戸大自然，[3]奈良先物質)

3C22p05　常温菌 Shewanella amazonensis 由来シトクロム c' の熱安定性

14:44　°加藤雄基[1]，　藤井創太郎[2]，　政成美沙[2]，　三本木至宏[2]([1]広島大・生物生産，[2]広島大院・生物圏)

p06〜p10 発表者の接続時間 14:55〜15:05

3C22p06　CYP105A1 三重変異体発現 *Rhodococcus* 属放線菌を用いたビタミン D 水酸化体の生産

15:05　°余語祐哉[1]，　安田佳織[1]，　真野寛生[1]，　林　恵子[1]，杉本　宏[2]，　滝田禎亮[3]，　保川　清[3]，　安武義晃[4]，　田村具博[4]，太田美穂[5]，鎌倉昌樹[1]，生城真一[1]，榊　利之[1]([1]富県大・工・生物工，[2]理研播磨，[3]京大院・農，[4]産総研，[5]相愛大・人間発達)

3C22p07　不斉酸化反応を有する植物由来ヘム結合タンパク質の新精製法(SanCat-R)

15:16　°永岡宏行（サンヨー食品開発）

3C22p08　フルクトシルペプチドオキシダーゼによる *Nα*-(1-deoxy-D-fructos-1-yl)-L-valyl-L-histidine 酸化反応の構造基盤

15:27　°一柳　敦[1]，　渡辺文太[2]，　五味恵子[1]，　中津　亨[3]，加藤博章[3]([1]キッコーマン研究開発本部，[2]京大化研，[3]京大院薬)

3C22p09　マルチ銅オキシダーゼとヨウ化物イオンを用いたフェノール性人工色素の脱色

15:38　°田口太郎[1]，　土肥博史[2]，　西田芳弘[2]，　吉川　潤[3]，堀口博文[3]，天知誠吾[1]([1]千葉大院・園芸，[2]千葉大院・融合，[3]合同酒精(株)　酵医研)

3C22p10　細菌由来マルチ銅オキシダーゼを用いた新規なヨウ素系芽胞殺菌システム

15:49　°海老原京太[1]，トリユリアナ[1,2]，天知誠吾[1]([1]千葉大・園芸，[2]パジャジャラン大)

p11〜p15 発表者の接続時間 16:00〜16:10

3C22p11　好熱性水素細菌 *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6 の酸化ストレス防御酵素 Bacterioferritin comigratory protein の反応機構解析

16:10　°加藤真美[1]，佐藤由也[2]，新井博之[1]，石井正治[1]　([1]東大院・農生科，[2]産総研・環境管理)

3C22p12　好気性光合成細菌 Roseobacter denitrificans OCh114 の持つ alternative oxidase の酵素学的解析

16:21　°江草啓晶，石井正治，新井博之（東大院農生科･応生工）

3C22p13　Differential activity of rice thiol-disulfide oxidore-

ductases for disulfide bond formation and reduction

16:32 ○Yayoi ONDA, Kumiko AIHARA, Yohei KOBORI (Yamagata Univ.)

3C22p14 深海微生物 Shewanella violacea DSS12 における D-アミノ酸脱水素酵素の mRNA 発現量と圧力耐性

16:43 ○鈴本浩一朗[1], 渡邉翔太[1], 谷川 実[1], 西村克史[1], 為我井秀行[1], 加藤千明[2]（[1]日本大学, [2]海洋研究開発機構）

3C22p15 深海性 *Shewanella* 属細菌由来シトクロム *c* の圧力適応機構

16:54 ○政成美沙[1], 西山雅祥[2], 三本木至宏[1]（[1]広島大生物圏, [2]京都大白眉）

p16〜p20 発表者の接続時間 17:05〜17:15

3C22p16 軸配位子置換を用いた酵素-電極反応における酵素内電子伝達経路解明へのアプローチ

17:15 ○日比野佑哉, 河井翔太, 杉本 悠, 北隅優希, 白井 理, 加納健司（京大院農）

3C22p17 サブユニットの分離と復元からみるフルクトース脱水素酵素の直接電子移動反応機構

17:26 ○河井翔太, 北隅優希, 白井 理, 加納健司（京大院農）

3C22p18 FAD 依存性グルコースデヒドロゲナーゼのメディエータに関する検討

17:37 ○辻村清也, 村田一樹, 定兼拓也, 鶴岡 望（筑波大数理）

3C22p19 FAD 定量バイオセンサ用素子としての色素依存性 D-乳酸脱水素酵素の機能評価

17:48 ○前田英利[1], 里村武範[1,2], 櫻庭春彦[3], 大島敏久[4], 末信一朗[1,2,5]（[1]福井大院工・生物応用化, [2]福井大・生命セ, [3]香川大農, [4]大阪工大, [5]福井大院工・繊維）

3C22p20 超好熱菌 *Pyrobaculum calidifontis* 由来 Coenzyme A disulfide reductase の機能解析

17:59 ○里村武範[1], 田邊瑞季[1], 櫻庭春彦[2], 大島敏久[3], 末信一朗[1]（[1]福井大院工, [2]香川大農, [3]大阪工大工）

E32 会場 午前の部（9:00〜11:54）

酵素—糖質代謝関連酵素—

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

3E32a01 *Paenibacillus polymxya* 由来 β-アミラーゼとマルトースおよびマルトペンタオースとの複合体の X 線結晶構造解析

9:00 ○肥垣津雄旦[1], 多田俊治[2], 炭谷順一[1], 川口剛司[1], 乾 隆[1], 西村重徳[1]（[1]阪府大院・生環科, [2]阪府大院・理）

3E32a02 *Microbacterium saccharophilum* K-1 由来 β-フルクトフラノシダーゼと生成物の立体構造解析

9:11 ○佐藤祥名[1], 宮崎剛亜[1], 大田ゆかり[2], 嶋根康弘[2], 臼井けい子[2], 秦田勇二[2], 藤田孝輝[3], 伊藤哲也[3], 西河 淳[1], 殿塚隆史[1]（[1]東京農工大・院農, [2]海洋研究開発機構, [3]塩水港精糖株式会社）

3E32a03 *Pedobacter saltans* 由来 GH31 α-ガラクトシダーゼとリガンドとの複合体構造解析

9:22 ○宮崎剛亜, 石嵜雄一, 西河 淳, 殿塚隆史（東京農工大・院農）

3E32a04 1,2-β-マンノビオースホスホリラーゼの X 線結晶構造解析

9:33 ○津田智弘[1], 仁平高則[2], 荒川孝俊[1], 中井博之[2], 北岡本光[3], 伏信進矢[1]（[1]東大・院農, [2]新潟大農, [3]農研機構 食総研）

3E32a05 麹菌 *Aspergillus oryzae* 由来グルコアミラーゼの X 線構造解析

9:44 ○永吉恵美[1], 水谷公彦[2], 高橋延行[2], 三上文三[2], 瀧井幸男[1]（[1]京都学園大学, [2]京都大学）

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

3E32a06 β-アミラーゼ/マルトース複合体結晶構造の pH 変化

10:05 ○三上文三[1], 河村和広[1], 安達基泰[2], 水谷公彦[1], 高橋延行[1]（[1]京大院農, [2]日本原子力機構）

3E32a07 連鎖球菌による哺乳類細胞外マトリクス（グリコサミノグリカン）の分解：不飽和グルクロニルヒドロラーゼの反応機構

10:16 中道優介[1], 老木紗予子[1], 三上文三[1], 村田幸作[2], ○橋本 渉[1]（[1]京大院・農, [2]摂南大・理工）

3E32a08 *Prosthecobacter debontii* RU3 由来アルギン酸分解酵素の遺伝子クローニングと異種生産

10:27 ○山崎まいこ[1], 小林泰明[1], 川本仁志[2], 三木康成[2], 中川純一[3], 八木寿梓[4], 鈴木宏和[1], 大城 隆[1]（[1]鳥取大院・工, [2]海産物のきむらや, [3]東京農大, [4]鳥取大・工・GSC）

3E32a09 *Luteolibacter algae* H18 由来フコイダンデアセチラーゼの遺伝子クローニングと異種生産

10:38 ○長尾達彦[1], 隈部絢子[1], 川本仁志[2], 三木康成[2], 中川純一[3], 八木寿梓[4], 鈴木宏和[1], 大城 隆[1]（[1]鳥取大院・工, [2]海産物のきむらや, [3]東京農大, [4]鳥取大・工・GSC）

3E32a10 糸状菌 *Aspergillus nidulans* が分泌する新規 *endo*-1,4-β-マンナナーゼの発見と機能解析

10:49 ○石原紗彩耶[1], 金子優平[1], 望月麻衣[1], 山本竜也[1], 山田みゆき[1], 井村宗仁[1], 小林哲夫[2], 志水元亨[1], 加藤雅士[1]（[1]名城大・農, [2]名大院・生命農）

a11〜a14 発表者の接続時間 11:00〜11:10

3E32a11 糸状菌 *Aspergillus nidulans* が分泌する新規 *endo*-1,4-β-マンナナーゼの生理学的役割

11:10 ○山田みゆき[1], 金子優平[1], 石原紗彩耶[1], 望月麻衣[1], 山本竜也[1], 井村宗仁[1], 小林哲夫[2], 志水元亨[1], 加藤雅士[1]（[1]名城大・農, [2]名大院・生命農）

3E32a12 カラギーナン分解酵素によるオリゴ糖の生産

11:21 ○倉掛昌裕, 前野裕紀, 地頭俊樹（福山大海洋生物）

3E32a13 麹菌由来の新規 β-1,6-グルコシダーゼ（BglH）の酵素学的諸性質

11:32 ○渡部 昭, 鈴木 萌, 工藤佳那子, 氏家成隆, 五味勝也（東北大院農・生物産業創成）

3E32a14 *Trichoderma reesei* 由来 β-グルコシダーゼの基質特異性

11:43 ○佐藤大輔[1], 平沢 巽[1], 岡田宏文[2], 尾形 慎[3], 中島将博[4], 中井博之[5], 戸谷一英[1]（[1]一関高専・物化工, [2]長岡技科大・生物, [3]福島高専・物工, [4]東理大院・理工, [5]新潟大・農）

E32 会場 午後の部（14:00〜17:59）

酵素—糖質代謝関連酵素—

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

3E32p01 テンサイ α- グルコシダーゼの高重合度基質特異性はらせん構造の長鎖基質に適したサブサイト構造に起因する

14:00 ○田上貴祥[1], 山下恵太郎[2], 奥山正幸[3], 森 春英[3], 姚 閔[2,4], 木村淳夫[3]（[1]酪農学園大学, [2]北海道大学大学院生命科学院, [3]北海道大学大学院農学院, [4]北海道大学先端生命科学研究院）

3E32p02 *Bacillus* sp. AHU 2001 由来 GH31 α-グルコシダーゼの生化学的諸性質と基質認識に重要な構造因子の解析

14:11 ○佐分利亘, 奥山正幸, 熊谷祐也, 木村淳夫, 森 春英（北大院農）

3E32p03 *Paenibacillus curdlanolyticus* B-6 株由来の Xyn10C によるアラビノキシランからの α-L-Ara *f*-(1→2)-[α-L-Ara *f*-(1→3)]-D-Xyl *p* の生成

14:22 ○栗冠真紀子[1], イムジョリアクシリラック[2], ジョムエンボウパタポーン[2], カルピラノパイリン[2], 勝崎裕隆[1], 木村哲哉[1], パンパタラ[2], タチャパイクウンチャクリット[2], ロンサイウッドジャリヤ[2], ラタナカノックチャイカノック[2], 栗冠和郎[1]（[1]三重大院, [2]キングモンクット大）

3E32p04 HRGP の分解に関与する *Bifidobacterium longum* 由来 α-L-アラビノフラノシダーゼの機能解析

14:33 ○藤田清貴[1], 坂本彩美[1], 下川倫子[1], 金子 哲[2],

北原兼文[1]（[1]鹿児島大農，[2]食総研）

3E32p05　*Bacteroides thetaiotaomicron* 由来 GH97 β-L-アラビノピラノシダーゼの機能解析

14:44　○大嵜翔平，松永夏奈，奥山正幸，木村淳夫（北大院農）

p06〜p10 発表者の接続時間 14:55〜15:05

3E32p06　分裂酵母を用いた *Aspergillus aculeatus* 由来ラムノガラクツロナーゼの生産と活性測定法の構築

15:05　○間平由梨佳，大橋貴生，藤山和仁（大阪大学生物工学国際交流センター）

3E32p07　植物細胞壁多糖ラムノガラクツロナン I 主鎖の生合成に関与する糖転移酵素の連携

15:16　○上原洋平，田村峻佑，松本直樹，石水　毅　（立命館大生命）

3E32p08　半身萎凋病菌 *Verticillium dahliae* 由来エンドプロセッシブ型キシログルカナーゼの酵素特性

15:27　○佐藤将太[1,2]，児島　薫[2]，吉田　孝[2]（[1]岩手大院連合農，[2]弘前大農学生命）

3E32p09　*Ruminiclostridium josui* のゲノム情報に基づくキシラナーゼの解析

15:38　織田　拓，栗冠真紀子，木村哲哉，○栗冠和郎（三重大院生資）

3E32p10　*Aspergillus fumigatus* TH7-1 株の有する xylanase 遺伝子の発現における pH の影響

15:49　○高橋　結[1]，　榎本洋平[2]，　若井嘉人[3]，　古田正美[3]，村上周一郎[1]（[1]明治大農・農化，[2]明治大院農・農化，[3]鳥羽水族館）

p11〜p15 発表者の接続時間 16:00〜16:10

3E32p11　*Teratosphaeria acidotherma* AIU BGA-1 が産生するアルカリ性 β-ガラクトシダーゼの性質

16:10　○千葉瀬里奈，山田美和，礒部公安（岩手大農）

3E32p12　マツタケ由来 β-xylosidase の精製と cDNA クローニング

16:21　○亀井健吾[1]，　福田泰久[1]，　楠田瑞穂[2]，　寺下隆夫[1]，白坂憲章[1]（[1]近大農，[2]大阪府大）

3E32p13　*Streptomyces olivaceoviridis* 及び *Talaromyces trachyspermus* 由来 GH3 キシロシダーゼの特性解析

16:32　○前原智子[1]，紙野　圭[2]，金子　哲[1]（[1]農研機構 食品総合研究所，[2]製品評価技術基盤機構）

3E32p14　*Aspergillus niger* E-1 株の有する細胞壁結合型 β-xylosidase の解析

16:43　○井上琴美，高橋　結，村上周一郎（明治大農・農化）

3E32p15　ヒトミルクオリゴ糖の酵素合成に向けた高効率 1,2-α-L-フコシンターゼの作出

16:54　○杉山友太[1]，　後藤愛那[1]，　本多裕司[1]，　吉田永吏奈[1]，栗原　新[1]，北岡本光[2]，山本憲二[1]，片山高嶺[1]（[1]石川県大，[2]農研機構・食総研）

p16〜p19 発表者の接続時間 17:05〜17:15

3E32p16　植物 α1,3/4-フコシダーゼの精製と基質特異性の解析

17:15　前田　恵[1,2]，○板野紗月[1]，木村吉伸[1,2]（[1]岡山大学農学部，[2]岡山大学大学院環境生命科学研究科）

3E32p17　Molecular cloning and gene expression of α1,3/4-Fucosidase from *Solanum lycopersicum*

17:26　○Md. Ziaur RAHMAN，　Megumi MAEDA，Yoshinobu KIMURA（Grad. Sch., Environ. Life Sci., Okayama Univ.）

3E32p18　酸性 PNGase ダブルノックアウト *A. thaliana* 植物体の構築

17:37　○秋山　剛[1]，前田　恵[1]，藤山和仁[2]，木村吉伸[1]　（[1]岡大院・環境生命，[2]阪大・生物工学国際交流セ）

3E32p19　酸性ペプチド *N*-グリカナーゼのトマト果実における遺伝子発現解析

17:48　前田　恵[2]，○藤川真奈[1]，木村吉伸[2]（[1]岡山大学マッチングプログラムコース，[2]岡山大学大学院環境生命科学研究科）

D12 会場　午前の部（9:11〜11:54）

有機―天然物ーケミカルバイオロジー，作用機構―

a02〜a05 発表者の接続時間 9:01〜9:11

3D12a02　ミトコンドリア呼吸鎖複合体 I に対する脳 PET プローブ BCPP-EF の結合部位の解析

9:11　○風見紗弥香[1]，　西山新吾[2]，　木村祐史[1]，　伊藤博康[1]，塚田秀夫[2]（[1]浜松ホトニクス(株)中研　筑波研究室，[2]浜松ホトニクス(株)中研 PET センター）

3D12a03　糖結合性天然物 Pradimicin A のフコース結合解析

9:22　○渡邉泰典[1]，　中川　優[1,2]，　五十嵐康弘[3]，　伊藤幸成[2]，小鹿　一[1]（[1]名大院・生命農，[2]理研，[3]富山県大・生工）

3D12a04　Santonin-related compound 2 inhibits non-canonical NF-κ B signaling pathway induced by lymphotoxin β

9:33　○Hue Tu QUACH[1]，　Ryuichi TAMURA[1]，Shinsei SAYAMA[2]，　Wanxia TANG[3]，　Masayoshi ANDO[3]，Takao KATAOKA[1]（[1]Dept. Appl. Biol., Kyoto Inst. Tech.，[2]Dept. Nat. Sci.（Chem.）, Fukushima Med. Univ.，[3]Dept. Chem. Chem. Eng., Niigata Univ.）

3D12a05　Thapsigargin は細胞接着因子 ICAM-1 の糖鎖修飾に作用する

9:44　○横井川純平，片岡孝夫（京都工繊大院・応生）

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

3D12a06　中国産食用茸ツブイボタケ（*Thelephora vialis*）含有 *p*-terphenyl 化合物の脱 SUMO 化酵素 SENP1 に対する阻害活性

10:05　○菅谷紘一，　並木大輔，　吉岡泰淳，　牧内麻緒，金田紗耶香，煙山紀子，小野瀬淳一，阿部尚樹　（東農大・応生・食品安全健康）

3D12a07　3,6-Epidioxy-1,10-bisaboladiene による酸化的ストレス誘導性ネクローシス

10:16　○高野侑恵[1]，　上杉祥太[2]，　室井　誠[3]，　土屋英子[4]，長田裕之[3]，木村賢一[1,2]　（[1]岩手大院・農，[2]岩手大院・連合農，[3]理研 CSRS・ケミカルバイオロジー，[4]広島大院・先端物質）

3D12a08　ホタテガイ中で進行する下痢性貝毒オカダ酸の構造変換および変換酵素の単離を目指すケミカルバイオロジー

10:27　○古用幸愛，小野田竜也，長由扶子，山下まり，此木敬一（東北大農）

3D12a09　リガンド結合ポケットの特性に基づく新規共有結合性 PPAR γ アゴニストの創製

10:38　○宮前友策[1]，　大寺杏奈[1]，　吉田光多郎[1]，　秋田　徹[2]，前嶋一宏[2]，　垣塚　彰[1]，　入江一浩[3]，　増田誠司[1]，　神戸大朋[1]，永尾雅哉[1]（[1]京大院生命，[2]日本新薬，[3]京大院農）

3D12a10　糖鎖を介した新規翻訳後修飾プロセスの探索：ヒト細胞中の β-アロシダーゼ活性を有する酵素の同定

10:49　○三浦一輝[1]，　田中綾子[2]，　袴田　航[1,2]，　平野貴子[2]，西尾俊幸[1,2]（[1]日大院生資科，[2]日大生資科・生命化）

a11〜a14 発表者の接続時間 11:00〜11:10

3D12a11　precocene II による ROS 産生を介したトリコテセン生産の阻害機構

11:10　○古川智宏，鈴木道生，作田庄平（東大院農生科）

3D12a12　β-tubulin におけるアミノ酸置換が L-2.5-dihydrophenylalanine の抗真菌活性に及ぼす影響

11:21　○塩見　涼[1]，　中尾有里[1]，　荻田　亮[1,2]，　藤田憲一[1]，田中俊雄[1]（[1]阪市大院・理，[2]阪市大・健康・研セ）

3D12a13　セリ科植物から得られた GSK-3 β 阻害物質 falcarindiol の肝細胞における糖新生抑制作用

11:32　○吉田　潤[1]，伊藤芳明[2]，木村賢一[2]　（[1]岩手医大・教養教育セ・化学，[2]岩手大・農）

3D12a14　ラメラリンの構造変換による新規抗がん活性化合物

BIIQ の創製

11:43 ○石橋郁人[1]，堺　貴愛[1]，岩尾正倫[2]（[1]長崎大院・水産，[2]長崎大院・工）

D12 会場　午後の部（14:00〜18:10）

有機―天然物－ケミカルバイオロジー，作用機構―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

3D12p01　アルコール添加による新規リベロマイシン誘導体の創製と生合成機構の考察

14:00 ○野川俊彦[1]，　高橋俊二[1,2]，　高木　海[1]，　関山恭代[2]，岡野亜紀子[1]，川谷　誠[2]，清水　猛[1]，長田裕之[1,2]（[1]理研 CSRS，[2]理研・抗生物質）

3D12p02　Isolation of new cyclic depsipeptides from a microbial metabolites fraction library by NPPlot screening

14:11 ○Jun-pil JANG[1,2], Toshihiko Nogawa[1], Yayoi Hongo[3], Takeshi Shimizu[1], Akiko Okano[1], Yushi Futamura[1], Shunji Takahashi[1,3], Jae-Hyuk Jang[2], Jong Seong Ahn[2], Hiroyuki Osada[1,2]（[1]RIKEN CSRS, [2]KRIBB Korea, [3]RIKEN GRC）

3D12p03　マメ科植物クララ *Sophora flavescens* の LC/MS を用いたメタボロミクスによる産地比較

14:22 ○長田麻由佳[1,2]，　野川俊彦[1]，　鈴木龍一郎[2]，　高橋俊二[1]，白瀧義明[2]，長田裕之[1]（[1]理研 CSRS，[2]城西大薬）

3D12p04　ChemProteoBase のがん代謝作用薬解析に向けた応用

14:33 ○室井　誠[1,2]，田中美帆[2]，川谷　誠[1]，長田裕之[1,2]　（[1]理研・抗生物質，[2]理研 CSRS・ケミカルバイオロジー）

3D12p05　化合物アレイによるソニックヘッジホッグ(Shh)結合化合物の探索とそれらと Shh との相互作用の解析

14:44 ○近藤恭光[1,2], 河村達郎[2], 本田香織[1], 関根朋美[1], 長田裕之[1,2]（[1]理研 CSRS・ケミカルバイオロジー，[2]理研・抗生物質）

p06〜p10 発表者の接続時間 14:55〜15:05

3D12p06　Alkyl paraben の植物病原菌に対する作用

15:05 ○谷澤　悟，佐々木康幸，矢嶋俊介，伊藤晋作　（東農大院・バイオ）

3D12p07　アフラトキシン生産阻害物質 cyclo（L-Ala-L-Pro)の作用機序の解明

15:16 ○飯村九林，古川智宏，山本利義，作田庄平（東大院農応生化）

3D12p08　相乗的抗真菌作用を示すアネトールはフルコナゾール耐性 *Candida albicans* における Rhodamine 6G の排出を抑制する

15:27 ○前田瑞紀[1]，　石倉昂幸[1]，　荻田　亮[2]，　田中俊雄[1]，藤田憲一[1]（[1]阪市大院・理，[2]阪市大・健康研セ）

3D12p09　アンホテリシン B の真菌液胞膜障害作用におけるオートファジーの関与

15:38 吉岡美知留[1]，　○松岡　研[1]，　山田圭一[2]，　荻田　亮[1,3]，藤田憲一[1]，田中俊雄[1]（[1]阪市大院・理，[2]群馬大院・工，[3]阪市大・健康研セ）

3D12p10　ヤナギタデ由来成分の真菌液胞膜破壊作用

15:49 ○近藤拓也[1]，荻田　亮[1,2]，藤田憲一[1]，田中俊雄[1]　（[1]阪市大院・理，[2]阪市大・健康研セ）

p11〜p15 発表者の接続時間 16:00〜16:10

3D12p11　マウス精子の超活性化を誘導するフラバン二量体の作用機構の解析

16:10 ○荒舘　忠[1]，谷井一郎[1]，小宮　顕[2]（[1]富山大医生物，[2]富山大医腎泌尿器）

3D12p12　ヒト真皮線維芽細胞の IL-1 α 刺激によるエラスターゼ発現上昇における luteolin の抑制効果

16:21 ○坂井良啓[1]，　スダカルゴヴィンダム[2]，　金　孝靜[2]，禹　済泰[1]，車　炳允[2]（[1]中部大応生，[2]生物機能開発研究所）

3D12p13　HeLa S3 細胞増殖抑制活性に対する(－)-Epicatechin-3,5-O-digallate の 2,3-cis 構造の重要性

16:32 ○森　一起[1]，　綾野義博[1]，　濱田義知[1]，　法島太一[2]，田中隆太[2]，赤坂吉績[2]，中島範行[3]，齊藤安貴子[1,2]　([1]大阪電気通信大学院・先端，[2]大阪電気通信大学・環境，[3]富山県立大学・生物工）

3D12p14　フラバン-3-オール誘導体の酵素，及び，植物細胞による糖化反応の検討

16:43 柴崎　亨[1]，　○野呂健太[1]，　真鍋滉一朗[1]，　森　一起[2]，田中隆太[1]，　富田貴之[1]，　米田慎吾[1]，　辻井隆行[1]，　川崎　崇[3]，今村信孝[3]，齊藤安貴子[1,2]（[1]大阪電通大工・環境，[2]大阪電通大院工・先端，[3]立命館大・薬）

3D12p15　脂肪鎖を導入したフラバン-3-オール誘導体の合成とガン細胞増殖抑制活性

16:54 ○綾野義博[1]，　森　一起[1]，　平井瑞輝[2]，　中島範行[3]，齊藤安貴子[1,2]　([1]大阪電通大院工・先端，[2]大阪電通大工・環境，[3]富山県立大工・生物工）

p16〜p20 発表者の接続時間 17:05〜17:15

3D12p16　ネオニコチノイドの選択毒性に寄与するニコチン性アセチルコリン受容体の新奇構造因子

17:15 ○伊原　誠[1]，　岡島俊英[2]，　山下敦子[3]，　尾田拓麻[1]，浅野拓也[1]，松井美佳奈[1]，David B. Sattelle[4]，松田一彦[1]（[1]近畿大農，[2]大阪大産研，[3]岡山大薬，[4]UCL）

3D12p17　殺虫性インドールアルカロイドオカラミンの活性発現機構と選択性

17:26 ○古谷章悟[1]，　中谷有里[1]，　伊原　誠[1]，　甲斐建次[2]，林　英雄[2]，松田一彦[1]（[1]近畿大院・農・応生化，[2]阪府大・生環科）

3D12p18　オカボノアカアブラムシのイネ根への寄生による褐変

17:37 ○手林慎一[1]，　上田真二[1]，　森　梓紗[1]，　及川　彰[2,3]，佐々木亮介[3]，斉藤和季[3,4]，上手麻希[5]，間世田英明[5]，石原　亨[6]（[1]高知大農，[2]山形大農，[3]理研 PSC，[4]千葉大院薬，[5]徳島大 STS 研究部，[6]鳥取大農）

3D12p19　ホタルルシフェリンアナログの発光反応解析

17:48 ○木山正啓，平野　誉，牧昌次郎（電通大情報理工）

3D12p20　*In vivo* イメージングに適した新規ルシフェリンアナログの創製

17:59 ○齊藤亮平，木山正啓，北田昇雄，岩野　智，平野　誉，丹羽治樹，牧昌次郎（電気通信大学大学院）

E11 会場　午前の部（9:11〜11:54）

有機―天然物－生合成，代謝―

a02〜a05 発表者の接続時間 9:01〜9:11

3E11a02　3 級水酸基のサクシニル化反応に見出される RevL のフマル化修飾

9:11 ○前島　希[1,2]，　高橋俊二[1,3]，　宮澤　岳[1,2]，　鈴木健裕[4]，堂前　直[2,4]，円谷陽一[2]，長田裕之[1,2,3]([1]理研・抗生物質，[2]埼玉大院・理工学，[3]理研 CSRS・ケミカルバイオロジー，[4]理研 GRC）

3E11a03　リベロマイシン生合成に関わる RevL の結晶構造解析

9:22 ○奥村英夫[1]，　前島　希[2,3]，　高橋俊二[2,4]，　熊坂　崇[1]，長田裕之[2,3,4]（[1]JASRI/SPring-8，[2]理研・抗生物質，[3]埼玉大院・理工学，[4]理研 CSRS・ケミカルバイオロジー）

3E11a04　Engineering of primary metabolism in *Streptomyces reveromyceticus*

9:33 ○Suresh PANTHEE[1], Shunji TAKAHASHI[1], Shirai TOMOKAZU[2], Akihito KONDO[2], Hiroyuki OSADA[1]（[1]RIKEN CSRS, Chemical Biology, [2]RIKEN CSRS, Cell Factory Research Team）

3E11a05　テロメスタチン生合成遺伝子クラスターの異種発現

9:44 ○天貝啓太[1,2]，　柴崎典子[2]，　高木　海[2]，　工藤史貴[3]，江口　正[3]，長田裕之[2]，池田治生[4]，新家一男[5]，高橋俊二[2]（[1]次世代天然物化学技術研究組合，[2]理研 CSRS･ケミカルバイオロジー，[3]東工大院理工，[4]北里大・生命研，[5]産業技術総合研究所）

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

3E11a06　抗生物質 streptothrisin の carbamoyl-D-gulosamine 構造に関する生合成研究
10:05　°丸山千登勢[1]，加藤さやか[1]，泉川美穂[2]，小松　護[3]，池田治生[3]，新家一男[4]，濱野吉十[1]　([1]福井県大・生物資源，[2]JBIC，[3]北里・北里生命研，[4]産総研)

3E11a07　生合成酵素のエンジニアリングによる streptothrisin の β-lysine oligopeptide 鎖長制御
10:16　丸山千登勢[1]，川崎春香[1]，小松　護[2]，池田治生[2]，°濱野吉十[1]([1]福井県大・生物資源，[2]北里・北里生命研)

3E11a08　抗生物質 BD-12 生合成遺伝子の機能解析
10:27　°新倉春香[1]，丸山千登勢[1]，泉川美穂[2]，石川　淳[3]，池田治生[4]，新家一男[5]，濱野吉十[1]([1]福井県大・生物資源，[2]JBIC，[3]国立感染研，[4]北里・北里生命研，[5]産総研)

3E11a09　炭素 - 炭素結合形成に関与する新奇酸化還元酵素の発見と機能解析
10:38　°白石太郎，西山　真，葛山智久（東大・生物工学セ）

3E11a10　新奇 [4+2] 環化付加反応触媒酵素が関与するポリケタイド大環状化機構の解明
10:49　°橋本拓哉[1]，橋本絢子[2]，新家一男[3]，池田治生[4]，リウフンウェン[5]，西山　真[1]，葛山智久[1]　([1]東大生セ，[2]JBIC，[3]産総研，[4]北里大北里生命研，[5]テキサス大薬)

a11〜a14 発表者の接続時間 11:00〜11:10

3E11a11　粘性細菌 *Sorangium cellulosum* のゲノム由来新規メラニン生合成酵素
11:10　°曽根祐輔，中村修人，金　承榮，鮒　信学（静県大食栄）

3E11a12　放線菌 *Streptomyces rochei* の抗生物質生産誘導を司るシグナル分子 SRB の生合成
11:21　°波多江希，津田直人，木梨陽康，荒川賢治（広島大・先端研）

3E11a13　Characterization of the biosynthetic gene cluster for a spirotetronate antibiotic maklamicin of *Micromonospora* sp. GMKU326
11:32　Ratama DADUANG[1]，°Shigeru KITANI[1]，Arinthip THAMCHAIPENET[2]，Yasuhiro IGARASHI[3]，Kazuo SHIN-YA[4]，Haruo IKEDA[5]，Takuya NIHIRA[1]（[1]Osaka Univ.，[2]Kasetsart Univ.，[3]Toyama Pref. Univ.，[4]AIST，[5]Kitasato Univ.）

3E11a14　放線菌由来新規ジテルペン合成酵素遺伝子の解析
11:43　°山田佑樹[1]，小松　護[1]，新家一男[2]，池田治生[1]　([1]北里大・北里生命研，[2]産総研)

E11 会場　午後の部（14:11〜18:10）

有機―天然物－生合成，代謝―

p02〜p05 発表者の接続時間 14:01〜14:11

3E11p02　緩い基質特異性を示すペプチドリガーゼの結晶構造からの考察と応用
14:11　野池基義[1]，松井　崇[2]，小笠原泰志[1]，森田洋行[2]，°大利　徹[1]([1]北大院工，[2]富山大和漢研)

3E11p03　放線菌が持つペプチドリガーゼオーソログの機能解析-1-
14:22　°小笠原泰志[1]，川田純平[1]，野池基義[1]，降旗一夫[2]，大利　徹[1]([1]北大院工，[2]東大院農生科)

3E11p04　放線菌が持つペプチドリガーゼオーソログの機能解析 -2-
14:33　°川田純平，小笠原泰志，野池基義，大利　徹（北大院工）

3E11p05　C- 末に D-Trp を持つラッソペプチドの生合成機構
14:44　°野村　智[1]，小笠原泰志[2]，佐藤康治[2]，大利　徹[2]([1]北大工，[2]北大院工)

p06〜p10 発表者の接続時間 14:55〜15:05

3E11p06　大腸がん原因物質コリバクチンの生合成機構の解明
15:05　°佐々侑寿香，石川格靖，小山ふみ，福冨愛実，野口博司，渡辺賢二（静岡県大薬）

3E11p07　Diels-Alder 反応による Sch210972 炭素骨格構築機構の証明
15:16　°佐藤道大[1]，八木下史敏[2]，三野　孝[2]，内山奈穂子[3]，合田幸広[3]，野口博司[1]，Houk Kendall[4]，Tang Yi[4]，渡辺賢二[1]([1]静岡県大薬，[2]千葉大院工，[3]国立医薬品食品衛生研究所，[4]カリフォルニア大学ロサンゼルス校)

3E11p08　ヘモシアニン型新規キノロン合成酵素の精密機能解析
15:27　°石川格靖，野口博司，渡辺賢二（静岡県大薬）

3E11p09　モノテルペン付加型 6,6-キノロン化合物分子多様性の解明
15:38　°平山裕一郎，石川格靖，野口博司，渡辺賢二（静岡県大薬）

3E11p10　昆虫感染性糸状菌 *Metarhizium anisopliae* ARSEF 23 株由来新規メロテルペノイドの獲得とその生合成研究
15:49　°加藤広樹[1]，恒松雄太[1,2]，山本　剛[1]，野口博司[1]，渡辺賢二[1]([1]静岡県大薬，[2]ライプニッツ研究所)

p11〜p15 発表者の接続時間 16:00〜16:10

3E11p11　*Aspergillus niger* 遺伝子強制発現産物 pyranonigrin の生合成機構の解明
16:10　°山本　剛[1]，恒松雄太[1,2]，野口博司[1]，渡辺賢二[1]([1]静岡県大薬，[2]ライプニッツ研究所)

3E11p12　*Aspergillus oryzae* が生産するマイコトキシン aspirochlorine の生合成
16:21　°恒松雄太[1,2]，Chankhamjon Pranatchareeya[1]，渡辺賢二[2]，Hertweck Christian[1]　([1]ライプニッツ研究所，[2]静岡県大薬)

3E11p13　*Bacillus clausii* におけるイソプレノイド生合成経路：多機能性 *E* 型プレニル鎖伸長酵素の同定とセスクアテルペン代謝物の探索
16:32　°上田大次郎，村上瑞気，山鹿宏彰，佐藤　努（新潟大学院自然）

3E11p14　*Bacillus megaterium* 由来ファルネシルファルネシルアセトンの単離と非酵素的なメナキノンの開裂
16:43　°岡本　渉，佐藤　努（新潟大学院自然）

3E11p15　海洋性粘液細菌由来ポリケチド haliangicin の生合成スターターに関する研究
16:54　°孫　雨偉，宮野聖史，鈴木　彰，柘植尚志，小鹿　一（名大院・生命農）

p16〜p20 発表者の接続時間 17:05〜17:15

3E11p16　ジャスモン酸処理したイネ葉における β-tyrosine の蓄積
17:15　°網干貴子[1,2]，Yan Jian[3]，寺石政義[2]，石原　亨[4]，奥本　裕[2]，Jander Georg[3]，森　直樹[2]　([1]山形大農，[2]京大院農，[3]コーネル大，[4]鳥取大)

3E11p17　植物ホルモンによるイネ新規代謝物 β-チロシンの誘導と分布
17:26　°前坂佳宏[1]，網干貴子[2]，寺石政義[1]，奥本　裕[1]，石原　亨[3]，吉永直子[1]，小野　肇[1]，西田律夫[1]，森　直樹[1]([1]京都大農，[2]山形大農，[3]鳥取大農)

3E11p18　イネのジャポニカ種およびインディカ種におけるファイトアレキシン，サクラネチンの蓄積
17:37　°北野生薫[1]，西口沙也加[1]，吉本理子[2]，中島廣光[1]，藪田行哲[1]，上中弘典[1]，寺石政義[3]，奥本　裕[3]，森　直樹[3]，石原　亨[1]([1]鳥取大院農，[2]鳥取大農，[3]京都大院農)

3E11p19　酵母細胞壁成分の散布によりハツカダイコン(*Raphanus sativus* L. cv. *Raphanus sativus*)に誘導されるグルコラファサチンの同定
17:48　°森田智也[1]，吉永直子[1]，高崎智子[2]，北川隆徳[2]，

安原貴臣[2]，新開茂樹[3]，小野　肇[1]，西田律夫[1]，森　直樹[1]（[1]京大院農・応用生命，[2]アサヒグループホールディングス，[3]東果大阪株式会社）

3E11p20　リンゴ果実に傷害により誘導されるトリテルペン 2*α*,19*α*-dihydroxy-3-oxo-12-ursen-28-oic acid の同定

17:59　◦森田沙代[1]，吉永直子[1]，森　直樹[1]，石栗陽一[2]（[1]京大院農，[2]青森産技セ りんご研）

E21 会場　午前の部（9:00〜12:05）

有機―合成，反応機構―

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

3E21a01　可溶性支持体用いた修飾核酸の液相合成

9:00　◦福冨弘貴, 小路貴生, 金　承鶴, 千葉一裕（東京農工大学）

3E21a02　可溶性液相支持体を用いた液相核酸合成の開発

9:11　◦松野佑紀，小路貴生，金　承鶴，千葉一裕（東農工大農）

3E21a03　陽極酸化により誘起されるラジカルカチオンディールスアルダー反応の開発

9:22　◦尾崎惇史，山口勇将，岡田洋平，北野克和，千葉一裕（東京農工大学）

3E21a04　陽極酸化を用いたピロリジン誘導体の効率的な変換法

9:33　◦原谷涼奈, 小路貴生, 金　承鶴, 千葉一裕（東京農工大学）

3E21a05　2,4,6-trimethoxyphenyl 基を酸化脱離基として用いた電気化学的プロリン修飾法の開発

9:44　◦小路貴生，金　承鶴，山本圭介，河合朋充，岡田洋平，千葉一裕（東京農工大学）

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

3E21a06　分子内不斉 *N*- アリール化を利用した C-N 軸性キラリティを有するオキシインドールの合成

10:05　◦宮川敬太朗，西川俊夫，中崎敦夫（名大院生命農）

3E21a07　L- プロリンを触媒に用いたインダゾロン誘導体のメタルフリー合成法の開発

10:16　◦辻井美穂，園田素啓，谷森紳治（阪府大院生命環境）

3E21a08　オキソンを用いた酸化的分子内 C-H アミノ化による多置換ピラゾールの効率的合成

10:27　◦柏　充裕，園田素啓，谷森紳治（阪府大院生命環境）

3E21a09　フラン，アルキン，二級アミンを用いた三成分カップリングによる 3-ヒドロキシアントラニル酸エステルのワンポット合成

10:38　◦園田素啓[1]，篠原広幸[2]，早金直哉[2]，北　翔太[2]，小川昭弥[2]，谷森紳治[1]（[1]阪府大院生命環境，[2]阪府大院工）

3E21a10　酸化銀によるシナピルアセテートの酸化カップリング

10:49　◦岸本崇生，高橋奈々，濱田昌弘，中島範行（富山県大工）

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

3E21a11　スクアレン - ホペン環化酵素：基質スクアレン 23 位の立体サイズが環化反応に及ぼす影響

11:10　◦金子一輝[1]，宮原悠里[1]，佐々木勇輔[2]，仲野千秋[1]，星野　力[1,2]（[1]新潟大院自，[2]新潟大農）

3E21a12　スクアレンーホペン環化酵素：基質スクアレン 19 位の立体サイズが環化反応に及ぼす影響

11:21　◦高橋一成[1]，渡辺拓海[2]，仲野千秋[1]，星野　力[1,2]（[1]新潟大院自，[2]新潟大農）

3E21a13　*β*-アミリン合成酵素：10 位，15 位のエチル基置換体及び 26-ノルオキシドスクアレンの環 化反応について

11:32　◦寺澤有里[1]，高橋一成[2]，佐々木勇輔[1]，仲野千秋[2]，星野　力[1,2]（[1]新潟大農，[2]新潟大院自）

3E21a14　アオウキクサ花芽誘導物質 LDS1 およびその誘導体の合成

11:43　◦土屋　諒[1]，山田優作[2]，河橋辰哉[1]，間瀬暢之[2]，鳴海哲夫[2]，戸田三津夫[2]，轟　泰司[1]，渡辺修治[3]（[1]静岡大院農，[2]静岡大院工，[3]静岡大創造院）

3E21a15　Masutakic acid A の合成研究

11:54　◦野下俊朗[1]，大内秀一[2]（[1]県立広島大生命環境，[2]近畿大薬）

E21 会場　午後の部（14:00〜18:10）

有機―合成，反応機構―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

3E21p01　抗生物質エナシロキシン類の全合成研究

14:00　◦清田洋正[1]，五十嵐渉[2]，齋藤亜紀[2]，古川博之[2]，星川浩輝[2]，山田てい子[2]，桑原重文[2]（[1]岡山大院・環境生命，[2]東北大院農・生物産業創成）

3E21p02　Epicoccamide 類の全合成

14:11　◦川尻晃裕，森　綾香，矢島　新，勝田　亮，額田恭郎（東農大農）

3E21p03　Formosusin A の合成研究

14:22　◦飯塚　悠，矢島　新，勝田　亮，額田恭朗（東農大農）

3E21p04　Decarestrictine G および 5-((3-hydroxybutyl)furan-2-yl)acetic acid の合成と立体化学の研究

14:33　◦藤川祥汰，勝田　亮，矢島　新，額田恭郎（東農大農）

3E21p05　3- アシルテトラミン酸類新規合成法の開発

14:44　◦一條洋樹，佐々木弘太郎，足立一磨，勝田　亮，矢島　新，額田恭朗（東農大農）

p06〜p10 発表者の接続時間 14:55〜15:05

3E21p06　抗マイコバクテリア活性を示す Ramariolide A の化学合成

15:05　◦八田雅士，久世雅樹，滝川浩郷（神戸大院農）

3E21p07　天然ベンゾフラノイド類の網羅的合成

15:16　◦倉持幸司，椿　一典（京府大院生命環境）

3E21p08　新規骨格転位反応の開発；kinamycin 類の生合成反応の検討

15:27　◦河村　萌，久保このみ，倉持幸司，椿　一典（京府大院生命環境）

3E21p09　Juglorubin 及び関連天然物の合成研究

15:38　◦加茂翔伍，倉持幸司，椿　一典（京府大院生命環境）

3E21p10　1,4-ナフトキノン二量化反応による機能性分子の創成

15:49　◦太田元博，倉持幸司，椿　一典（京府大院生命環境）

p11〜p15 発表者の接続時間 16:00〜16:10

3E21p11　spiroleptosphol の全合成研究

16:10　◦高橋萌子，橋本　勝（弘前大学農生）

3E21p12　ムメフラールの効率的合成法

16:21　松本恵実，◦藤野和孝，牧岡富広，中塚進一（長良サイエンス株式会社）

3E21p13　昆虫摂食阻害活性を有する Clavigerin 類の全合成

16:32　◦柿本　望，渡邉秀典（東大院農生科・応生化）

3E21p14　Litseaone A の不斉全合成

16:43　◦影治秀晃，渡邉秀典（東大院農生科）

3E21p15　ピペリジンアルカロイド Microgrewiapine A の合成研究

16:54　◦野上恭平，石神　健，渡邉秀典（東大院農生科）

p16〜p20 発表者の接続時間 17:05〜17:15

3E21p16　立体選択的 oxypalladation を用いた decytospolide B の合成研究

17:15　◦黒米雄次，真壁秀文（信大院農）

3E21p17　バンレイシ科アセトゲニン類誘導体，aza-*cis*-solamin の合成

17:26　◦服部恭尚[1]，大西康司[1]，櫻井春華[1]，葛山昌伴[1]，古田善宏[1]，照屋健太[2]，真壁秀文[3]，小林数也[1]，赤路健一[1]（[1]京都薬大薬，[2]京府医大院医，[3]信州大院農）

3E21p18　6-epi テトロドトキシンの合成研究
17:37 ○橋本穂果，今津拓也，榊原　良，安立昌篤，西川俊夫（名大院生命農）

3E21p19　クランベシン B カルボン酸とその誘導体の不斉合成
17:48 ○中根嘉祈，中崎敦夫，西川俊夫（名大院生命農）

3E21p20　癌細胞浸潤阻害物質 BU-4664L の合成
17:59 ○高橋祐介，廣川高史，藤田聡美，渡邊麻衣，桑原重文（東北大院農）

E23 会場　午前の部（9:11〜11:54）

有機―天然物－単離構造決定－微生物―

a02〜a05 発表者の接続時間 9:01〜9:11

3E23a02　イネにおけるフェアリーリング惹起物質の生合成経路に関する化学的研究
9:11 ○崔　宰熏[1]，岩堀倫大[1]，鈴木智大[2]，平井浩文[1,2]，浅川倫宏[3]，菅　敏幸[3]，河岸洋和[1,2,4]（[1]静大院農・応生化，[2]静大・グリーン研，[3]静県大・薬，[4]静大院・創造）

3E23a03　コムラサキシメジにおける植物成長調節物質の生合成経路に関する化学的研究
9:22 ○寺島百合香[1]，圓山和希[1]，崔　宰熏[1]，鈴木智大[2]，平井浩文[1,2]，浅川倫宏[3]，菅　敏幸[3]，河岸洋和[1,2,4]（[1]静大農・応生化，[2]静大・グリーン研，[3]静県大・薬，[4]静大院・創造）

3E23a04　フェアリーリング惹起物質の代謝に関する生物有機化学的研究
9:33 ○澤田　梓[1]，崔　宰熏[1]，鈴木智大[2]，平井浩文[1,2]，浅川倫宏[3]，菅　敏幸[3]，河岸洋和[1,2,4]（[1]静大農・応生化，[2]静大・グリーン研，[3]静県大・薬，[4]静大院・創造）

3E23a05　フェアリーリング惹起物質配糖化酵素の探索
9:44 ○伊藤里奈[1]，崔　宰熏[1]，鈴木智大[2]，平井浩文[1,2]，浅川倫宏[3]，菅　敏幸[3]，河岸洋和[1,2,4]（[1]静大農・応生化，[2]静大・グリーン研，[3]静県大・薬，[4]静大院・創造）

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

3E23a06　フェアリーリング惹起物質の代謝産物に関する生物有機化学的研究
10:05 ○松崎信生[1]，崔　宰熏[2]，平井浩文[2,3]，近藤　満[3]，浅川倫宏[4]，菅　敏幸[4]，鈴木智大[3]，河岸洋和[1,2,3]（[1]静大院・創造，[2]静大院農・応生化，[3]静大・グリーン研，[4]静県大・薬）

3E23a07　アンニンコウ（*Grifola gargal*）子実体由来の機能性化合物の探索
10:16 ○加藤理史[1]，小堀　一[2]，呉　静[3]，原田栄津子[4]，鈴木智大[3]，崔　宰熏[1]，ガバザエステバン[5]，平井浩文[1,3]，河岸洋和[1,2,3]（[1]静大農・応生化，[2]静大院・創造，[3]静大・グリーン研，[4]岩出菌学研究所，[5]三重大医・免疫）

3E23a08　サクラシメジが産生する機能性物質に関する化学的研究
10:27 ○森　千夏[1]，呉　静[2]，鈴木智大[2]，崔　宰熏[1]，平井浩文[1,2]，河岸洋和[1,2,3]（[1]静大院農・応生化，[2]静大・グリーン研，[3]静大院・創造）

3E23a09　ヤマブシタケ培養ろ液由来の生理活性物質の探索
10:38 ○近田　梓[1]，徳永大輝[1]，呉　静[3]，石神洸太[1]，鈴木智大[3]，崔　宰熏[1]，徳山真治[1]，平井浩文[1,3]，河岸洋和[1,2,3]（[1]静大院農・応生化，[2]静大院・創造，[3]静大・グリーン研）

3E23a10　キシメジ（*Tricholoma flavovirens*）由来の機能性化合物の探索
10:49 ○邱　偉涛[1]，小堀　一[1]，鈴木智大[2]，崔　宰熏[3]，平井浩文[2,3]，河岸洋和[1,2,3]（[1]静大院・創造，[2]静大・グリーン研，[3]静大院農・応生化）

a11〜a14 発表者の接続時間 11:00〜11:10

3E23a11　ナラタケ属の産生する他感作用物質に関する化学的研究
11:10 ○小堀　一[1]，関谷　敦[2]，鈴木智大[3]，崔　宰熏[4]，近藤　満[1,3,5]，平井浩文[3,4]，河岸洋和[1,3,4]（[1]静大院・創造，[2]森林総研，[3]静大・グリーン研，[4]静大院農・応生化，[5]静大院理・化学）

3E23a12　高等菌類の子実体形成物質の探索
11:21 ○呉　静[1]，森　千夏[2]，鈴木智大[1]，崔　宰熏[2]，平井浩文[1,2]，河岸洋和[1,2,3]（[1]静大・グリーン研，[2]静大院農・応生化，[3]静大院・創造）

3E23a13　ツクリタケ（Agaricus bisporus）由来のキノコホルモン候補および新規機能性物質の探索
11:32 ○須藤佳葵[1]，呉　静[2]，森　千夏[1]，鈴木智大[2]，崔　宰熏[1]，平井浩文[1,2]，河岸洋和[1,2,3]（[1]静大院農・応生化，[2]静大・グリーン研，[3]静大院・創造）

3E23a14　トリコデルマとの対峙培養で観察されるシイタケ浸出液の成分
11:43 ○中村優花[1]，石原　亨[2]，時本景亮[3]，中島廣光[2]（[1]鳥取大院農，[2]鳥取大農，[3]菌蕈研）

E23 会場　午後の部（14:11〜18:10）

有機―天然物－単離構造決定－微生物―

p02〜p05 発表者の接続時間 14:01〜14:11

3E23p02　抗 HBV 活性を有する真菌由来の新規天然有機化合物
14:11 ○松永大輝[1]，金子　学[2]，山口泰弘[1]，竹内倫文[1]，渡士幸一[2]，紙透伸治[1]，菅原二三男[1]（[1]東理大理工，[2]国立感染研）

3E23p03　Penicillium herquei が生産する抗 C 型肝炎ウイルス活性を有する新規化合物
14:22 ○錦織　秀[1]，竹本健二[1]，中嶋　翔[2]，片山友里[1]，渡士幸一[2]，紙透伸治[1]，菅原二三男[1]（[1]東京理大・理工，[2]国立感染研）

3E23p04　微生物代謝産物からの MRSA に対する ABK 耐性克服活性物質の探索
14:33 ○椎名真夕[1]，須賀拓弥[1]，浅見行弘[1,2]，野中健一[1,2]，大村　智[2]，塩見和朗[1,2]（[1]北里大院感染制御，[2]北里大生命研）

3E23p05　微生物二次代謝産物からの赤痢アメーバ特異的含硫アミノ酸代謝経路阻害物質の探索
14:44 ○酒井一成[1]，森美穂子[1,2]，野中健一[1,2]，松本厚子[1,2]，野崎智義[3]，大村　智[2]，塩見和朗[1,2]（[1]北里大院 , 感染制御，[2]北里大，生命研，[3]感染研）

p06〜p10 発表者の接続時間 14:55〜15:05

3E23p06　微生物代謝産物からの抗赤痢アメーバ物質の探索
15:05 ○柘植聡志[1]，森美穂子[1,2]，野中健一[1,2]，松本厚子[1,2]，野崎智義[3]，大村　智[2]，塩見和朗[1,2]（[1]北里大院，感染制御，[2]北里大 , 生命研，[3]感染研）

3E23p07　微生物代謝産物からの metallo-β-lactamase 阻害剤の探索
15:16 ○鹿島由衣[1]，須賀拓弥[1]，浅見行弘[1,2]，岩月正人[1,2]，野中健一[1,2]，大村　智[2]，塩見和朗[1,2]（[1]北里大院感染制御科学，[2]北里大生命研）

3E23p08　微生物代謝産物からのマラリア脂肪酸合成酵素 PfFabI 阻害物質の探索
15:27 ○浮山　颯[1,2]，岩月正人[1,3]，野中健一[1,2]，松本厚子[1,2]，石山亜紀[1,3]，穂苅　玲[3]，乙黒一彦[3]，大村　智[2]，塩見和朗[1,2]（[1]北里大院感染制御，[2]北里大生命研，[3]北里大生命研熱帯病評セ）

3E23p09　真菌由来の新規 DNA ポリメラーゼ阻害物質の単離，構造解析
15:38 ○謝　佩廷[1]，松永大輝[1]，水品善之[2,3]，紙透伸治[1]，菅原二三男[1]（[1]東京理大・理工，[2]神戸学院大・栄養，[3]神戸学院大・LSC）

3E23p10　新規 eptaibol 化合物である FKI-6324A は害虫 AAC 遺伝子組換え酵母の増殖を抑制する
15:49 ○須賀拓弥[1]，浅見行弘[1,2]，橋本祥平[1]，岩月正人[1,2]，野中健一[1,2]，中島琢自[2]，渡邊善洋[1]，松本厚子[1,2]，菅原亮平[3]，塩月孝博[3]，山本武範[4]，篠原康雄[4]，一丸直哉[5]，村井正俊[5]，三芳秀人[5]（[1]北里大院感染制御科学，[2]北里大生命研，[3]農生資研，[4]徳島大疾患プロテオゲノム研究センター，[5]京大院農）

p11〜p15 発表者の接続時間 16:00〜16:10

3E23p11　疫病菌 *Phytophthora infestans* の付着器形成阻害物質の同定とその作用
16:10 ○川本真也，谷　修治，甲斐建次，炭谷順一，川口剛司（阪府大院・生環科）

3E23p12　野菜ジュースからの植物疫病菌有性生殖促進物質の探索
16:21 ○天廣志保，岩井里佳，小鹿　一（名大院生命農）

3E23p13　粘液細菌由来の抗疫病菌活性物質の単離と構造
16:32 ○櫨山大貴[1]，戸村友彦[1]，不藤亮介[2]，飯塚　俊[2]，小鹿　一[1]（[1]名大院生命農，[2]味の素(株)）

3E23p14　Physicochemical Screening を用いた希少放線菌からの新規物質の探索
16:43 ○木村　徹[1]，中島琢自[2]，松本厚子[1,2]，岩月正人[1,2]，佐藤倫子[3]，浅見行弘[1,2]，塩見和朗[1,2]，高橋洋子[2]，大村　智[2]（[1]北里大院･感染制御科学府，[2]北里大･生命研，[3]北里大･薬学部）

3E23p15　*Talaromyces* 属の属内分類群と ukulactone 類縁ポリエン化合物生産との関係
16:54 ○海渕　覚[1]，森美穂子[1,2]，野中健一[1,2]，増間碌郎[1,2]，大村　智[2]，塩見和朗[1,2]（[1]北里大院感染制御，[2]北里大生命研）

p16〜p20 発表者の接続時間 17:05〜17:15

3E23p16　難培養性微生物，粘液細菌由来の新規二次代謝産物の探索
17:15 ○戸村友彦[1]，櫨山大貴[1]，不藤亮介[2]，飯塚　俊[2]，小鹿　一[1]（[1]名大院生命農，[2]味の素(株)）

3E23p17　土壌細菌のコロニー形成を促進する物質に関する研究
17:26 ○結城克哉，河合　亮，山田哲也，藤野宣知，長澤寛道，作田庄平（東大院農）

3E23p18　*Sphingomonas* sp. の異種バクテリアに対する増殖因子の探索
17:37 ○高井亮吾，重冨顕吾，Bhuiyan Mohammad Nazrul Islam，三橋進也，鎌形洋一，生方　信（北海道大学院農）

3E23p19　リグニン由来の芳香族化合物から *Pseudomonas* sp. ITH-SA-1 株が生産するベンゼン環構造を含まない新規有機蛍光ポリマーの生成機構について
17:48 ○松藤　寛[1]，瀧原速仁[2]，砂入道夫[2]，岩淵範之[2]（[1]日大生資科食生，[2]日大生資科応生）

3E23p20　メカノセンシティブチャネルは微生物細胞内へのストレプトマイシンのエントリーに関与するか？
17:59 ○橋本賢一，矢部　勇，川崎　寿（東電大工）

D23 会場　午前の部（9:00〜12:05）

植物―環境応答，ストレス応答，情報伝達，分化―

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

3D23a01　新規植物免疫制御剤の作用機構の解析
9:00 ○北畑信隆[1]，大滝　幹[1]，吉川岳史[1]，助川夏雄[1]，吉田亜祐美[1]，木村貴史[1]，羽山大介[1]，来須孝光[2]，浅見忠男[3]，朽津和幸[1]（[1]東京理科大学理工学部，[2]東京工科大学応用生物学部，[3]東京大学大学院農学生命科学研究科）

3D23a02　EPR1 過剰発現イネに認められる Xanthomonas oryzae pv. oryzae に対する病害抵抗性の分子機構
9:11 ○堀家史哉[1]，平井洋行[1]，宇野雄太[1]，寺沢勇治[1]，奥山愛梨[2]，久保健一[3]，仲下英雄[4]，蔡　晃植[1]（[1]長浜バイオ大院バイオ，[2]長浜バイオ大バイオ，[3]奈良先端大バイオ，[4]福井県立大生物資源）

3D23a03　馬鈴薯塊茎皮における病害抵抗性関連タンパク質の探索
9:22 ○三沢翔太[1]，土肥奈津枝[2]，御子神玲香[2]，加藤　順[1]，田中正起[3]，守屋明博[3]，春見隆文[1]，荻原　淳[1]（[1]日大院生資研究科　生資利用，[2]日大生資科　生命化，[3]ホクレン農業総合研究所）

3D23a04　オオイタドリのジャスモン酸メチル誘導的なフェニルアセトニトリル生合成に関わるシトクロム P450 について
9:33 ○山口拓也[1,2]，三木佑太[1,2]，野下浩二[3]，浅野泰久[1,2]（[1]富山県大工・生工研セ，[2]JST, ERATO，[3]秋田県大・生資科）

3D23a05　植物タンパク質機能に対するニトロ化修飾の影響
9:44 ○花井悠介，植木達也，橋床泰之，崎浜靖子（北大院農）

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

3D23a06　イネにおける UV 照射によるファイトアレキシン生産誘導機構へのジャスモン酸の関与
10:05 ○宮本皓司[1]，遠田勇海[1]，岡田利樹[1]，佐藤由実子[1]，渡辺航平[1]，酒澤智子[1]，湯本絵美[1]，柴田恭美[1]，朝比奈雅志[1]，横田孝雄[1]，飯野盛利[2]，岡田憲典[3]，山根久和[1]（[1]帝京大バイオ，[2]大阪市大院理，[3]東大生物工学セ）

3D23a07　UV 照射によって不活性化できる PIP-1 類縁体の合成とその防御応答誘導活性の評価
10:16 ○金　容賢，宮下正弘，宮川　恒（京都大院農）

3D23a08　イネにおいてヌクレオチドピロホスファターゼ/ホスホジエステラーゼの欠損がデンプンの蓄積と光合成に影響する
10:27 ○増井貴広[1]，猪俣拓也[1]，涌井翔太郎[2]，金古堅太郎[2]，三ツ井敏明[1,2]（[1]新潟大院・自然科学，[2]新潟大・農）

3D23a09　強光応答遺伝子の発現に及ぼす 12-オキソフィトジエン酸の影響
10:38 ○薮田行哲[1]，野口　淳[1]，佐々木悠[1]，石川孝博[2]，重岡　成[3]，渡辺文雄[1]（[1]鳥取大農，[2]島根大生資，[3]近畿大農）

3D23a10　RNA-seq による被覆栽培したチャの被覆解除時のストレス応答の解析
10:49 ○森田重人[1,2]，北島佐紀人[3]，竹本哲行[4]，三村　裕[4]，佐野　智[1]（[1]京都府大院生命環境，[2]京都農技セ生資セ，[3]京都工繊大応用生物，[4]京都農技セ農林セ茶研）

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

3D23a11　一過的発現系を用いたシロイヌナズナ NADH 加水分解酵素(AtNUDX6 および 7)の生物的／非生物的ストレス応答制御機構の解析
11:10 ○高田梨沙[1]，小川貴央[2]，村本亘平[3]，吉村和也[3]，重岡　成[1,2]（[1]近畿大院・農・バイオ，[2]近畿大・農・バイオ，[3]中部大院・応生）

3D23a12　Nudix hydrolase(AtNUDX6 および 7)による細胞内 NADH ステータス調節を介したストレス応答制御
11:21 ○村本亘平[1]，高田梨沙[2]，小川貴央[2]，重岡　成[2]，吉村和也[1]（[1]中部大院・応生，[2]近畿大院・農・バイオ）

3D23a13　シロイヌナズナ Nudix hydrolase(AtNUDX9)による GDP-D-Man 代謝制御の役割
11:32 ○田中裕之[1]，丸田隆典[2]，小川貴央[3]，田部記章[3]，田茂井政宏[1,3]，吉村和也[4]，重岡　成[1,3]（[1]近畿大院・農・バイオ，[2]島根大・生資科・生命工，[3]近畿大・農・バイオ，[4]中部大・応生・食栄）

3D23a14　葉緑体 H_2O_2 応答性転写因子群による鉄ホメオスタシスと酸化的ストレス応答のクロストーク
11:43 ○野志昌弘[1]，岡本　泰[2]，森　大輔[1]，田茂井政宏[1,2]，高木　優[3,4]，丸田隆典[5]，重岡　成[1,2]（[1]近畿大・農・バイオ，[2]近畿大院・農・バイオ，[3]産総研・生物プロセス，[4]埼玉大・環境科学，[5]島根大・生資科・生命工）

3D23a15　シロイヌナズナにおけるデヒドロアスコルビン酸還元酵素の包括的な機能解析
11:54 ○畑中理佐[1]，野志昌弘[2]，田部記章[2]，田茂井政宏[2]，丸田隆典[3]，重岡　成[1]（[1]近畿大院・農・バイオ，[2]近畿大・農，[3]島根大・生資料・生命工）

D23 会場　午後の部（14:00〜18:10）

植物―環境応答，ストレス応答，情報伝達，分化―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

3D23p01　ペルオキシソーム局在性モノデヒドロアスコルビン酸還元酵素アイソザイムによるシードリング発達およびストレス応答

の制御

14:00 ○高橋隆樹[1]，野志昌弘[2]，畑中理佐[2]，丸田隆典[1]，澤　嘉弘[1]，石川孝博[1]，重岡　成[2]（[1]島根大・生資科・生命工，[2]近畿大・農・バイオ）

3D23p02　レドックス応答性ホメオドメインロイシンジッパー転写因子は酸化的ストレス下での成長制御に関与する

14:11 ○大和　開[1]，野志昌弘[2]，高木　優[3,4]，吉村和也[5]，丸田隆典[1]，澤　嘉弘[1]，石川孝博[1]，重岡　成[2]（[1]島根大・生資科・生命工，[2]近畿大・農・バイオ，[3]産総研，[4]埼玉大・環境科学，[5]中部大・応生・食栄）

3D23p03　ユーグレナチオレドキシンレダクターゼの分子特性と生理機能

14:22 ○玉木　峻[1]，丸田隆典[1]，澤　嘉弘[1]，重岡　成[2]，石川孝博[1]（[1]島根大・生物資源・生命工，[2]近畿大・農・バイオ）

3D23p04　プラスチド局在スーパーオキシドジスムターゼはイネ登熟期における高温被害米の発生を低減する

14:33 ○金古堅太郎[1]，佐々木麻衣子[2]，白矢武士[3]，高松　壮[2]，及川和聡[1]，古川豊和[1]，三ツ井敏明[1]（[1]新潟大農・応生化，[2]新潟大院・自然科学，[3]新潟県農業総合研究所）

3D23p05　Characterization of manganese superoxide dismutase genes of a halophyte *Suaeda maritima* in Japan and Egypt

14:44 ○Elsayed mohamed[1,2]，Ahmed A El-khatib[3]，Katsuaki Takechi[1]，Hiroyoshi Takano[1]，Susumu Takio[1]（[1]Kumamoto Univ.，[2]Al-Azhar Univ.，[3]Sohag Univ.）

p06〜p10 発表者の接続時間 14:55〜15:05

3D23p06　冠水抵抗性イネ由来 *Sub1A* を導入したダイズ芽生えの冠水条件下の比較プロテオーム解析

15:05 ○西澤けいと，南條洋平，小松節子（農研機構 作物研究所）

3D23p07　生分解性プラスチック分解酵素を処理した植物における葉面の構造変化とストレス応答

15:16 ○植田浩一[1]，釘宮聡一[1]，渡部貴志[1]，光原一朗[2]，田端　純[1]，吉田重信[1]，北本宏子[1]（[1]農環研，[2]生物研）

3D23p08　シロイヌナズナにおけるイソチオシアネートによる熱耐性向上効果

15:27 ○松原　匠[1]，高橋郁夫[2]，原　正和[1,2]（[1]静岡大農，[2]静岡大グリーン研）

3D23p09　シャペロン阻害剤によるシロイヌナズナにおける熱ショック応答の誘導

15:38 ○村野宏樹[1]，高橋郁夫[2]，松原　匠[1]，原　正和[1,2]（[1]静岡大農，[2]静岡大グリーン研）

3D23p10　スクロースを指標にしたイネ幼苗の低温順化処理方法の検討

15:49 ○提箸祥幸，佐藤　裕（農研機構・北農研）

p11〜p15 発表者の接続時間 16:00〜16:10

3D23p11　ジャガイモ腋芽がストロンに分化する際に発現する遺伝子の網羅的な解析

16:10 ○加藤　彰[1]，重岡　成[2]，横田明穂[1]（[1]奈良先端大先端科技セ，[2]近畿大農）

3D23p12　窒素固定能を持つシアノバクテリア *Nostoc* sp. に対する銀杏抽出物のホルモゴニア分化誘導因子の探索

16:21 ○西塚紘明，橋床泰之（北大院農）

3D23p13　紅藻スサビノリの無機栄養欠乏での遺伝子発現と栄養状態評価

16:32 ○吉村　航，井村祐己，鈴木道生，吉村悦郎（東大院・農生科・応生化）

3D23p14　ヤナギ（*Salix* spp.）樹皮におけるストロンチウム（Sr）含有結晶の生成機構

16:43 ○原田英美子[1]，庄美冴子[1]，木村ひろみ[1]，森　卓弥[1]，稲田和幸[1]，竹中千里[2]，富岡利恵[2]，保倉明子[3]，寺田靖子[4]，水野隆文[5]（[1]滋賀県大環境科学，[2]名古屋大農，[3]東京電機大工，[4]SPring-8/JASRI，[5]三重大生物資源）

3D23p15　His 型金属結合ペプチドデハイドリンによる植物金属ストレス緩和作用

16:54 ○原　正和[1,2]，門奈修平[2]，村田尊英[2]，中野太陽[2]（[1]静岡大グリーン研，[2]静岡大農学研究科）

p16〜p20 発表者の接続時間 17:05〜17:15

3D23p16　イネにおけるポリアミン酸化酵素の多様性

17:15 ○草野友延[1]，キンドンウク[1]，劉　太波[1]，井澤　翔[1]，新津　勝[2]，ベルベリッヒトーマス[3]，児島征司[1]（[1]東北大生命，[2]城西大薬，[3]BiK-F）

3D23p17　ヒナタイノコズチでの（Z）-3-ヘキセノールの代謝と異性化

17:26 ○清水理未，野下浩二，阿部　誠，田母神繁（秋田県立大生物資源）

3D23p18　シロイヌナズナの緑化を抑制する動物神経系 CRIPT 相同タンパク質の機能

17:37 ○青木亮裕[1]，清水正則[2]，小林京子[1]，細谷孝博[1]，熊澤茂則[1]，小林裕和[1]（[1]静県大院・食品栄養環境・薬食生命，[2]常葉大・健康プロデュース）

3D23p19　食虫植物 S-like リボヌクレアーゼの構造と機能

17:48 ○荒井直樹[1]，西村恵美[1]，寿命伸哉[1]，劉　天暉[2]，大山　隆[1,2]（[1]早大院・先進理工，[2]早大・教育・総合科学・生物）

3D23p20　イネの転写因子 DPF によるジテルペン型ファイトアレキシン生合成遺伝子の転写制御機構の解析

17:59 ○山村千紘[1,2]，水谷恵美[1,2]，福島説子[1]，鎌倉高志[2]，岡田憲典[3]，山根久和[4]，高辻博志[1]，森　昌樹[1]（[1]生物研，[2]東理大・理工，[3]東大・生物工学セ，[4]帝京大・バイオ）

D25 会場　午前の部（9:00〜12:05）

植物―一次代謝，二次代謝―

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

3D25a01　モモの果皮着色に関わる MYB 転写因子

9:00 ○小田賢司[1]，田村隆行[2]，日原誠介[2]（[1]岡山生物研，[2]岡山県農総センター農業研）

3D25a02　キュウリ（*Cucumis sativus*）におけるフラボノイド *C*-配糖化酵素遺伝子の探索と解析

9:11 ○藤本俊介，伊藤崇充，下坂　誠，田口悟朗（信州大学）

3D25a03　ウンシュウミカン果皮におけるヘスペリジン結晶の細胞内検出および同定

9:22 ○井上剛史[1]，吉永　新[1]，高部圭司[1]，吉岡照高[2]，小川一紀[2]，坂本正弘[1]，東　順一[3]，本田与一[1]（[1]京都大院農，[2]果樹研，[3]大阪大院工）

3D25a04　ゼニゴケのリコペン生合成遺伝子群の単離と機能解析

9:33 ○竹村美保[1]，眞岡孝至[1,2]，三沢典彦[1]（[1]石川県大，[2]生産開発研）

3D25a05　ハマナスの香気放散機構について

9:44 ○野中なつみ，松原　創，中澤洋三，妙田貴生，藤森　嶺，西澤　信，戸枝一喜（東京農業大学大学院）

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

3D25a06　Scopoletin 生合成に関わる *Populus trichocarpa* 遺伝子の機能解析

10:05 ○稲葉暁佳里，清水文一（東洋大院生命）

3D25a07　点変異導入によるサツマイモ桂皮酸オルト位水酸化酵素の基質認識アミノ酸残基の探索―C 末端領域の検討

10:16 ○阿部秀俊[1]，大河原眞平[1]，永野真吾[2]，水谷正治[3]，清水文一[1]（[1]東洋大生命，[2]鳥取大工，[3]神戸大農）

3D25a08　ラクトン形成を触媒するカルボキシルエステラーゼ（1）：チューリップ花粉からのチューリッポシド B 変換酵素の精製および性状解析

10:27 野村泰治，村瀬達紀，荻田信二郎，○加藤康夫（富山県大・生工研セ）

3D25a09　ラクトン形成を触媒するカルボキシルエステラーゼ

(2)：チューリップ花粉からのチューリッポシド B 変換酵素遺伝子の単離および機能解析

10:38 ○野村泰治，村瀬達紀，荻田信二郎，加藤康夫（富山県大・生工研セ）

3D25a10　ピレスリン生合成遺伝子の同定に向けた RNAseq データのバイオインフォマティックス解析

10:49 ○阪森宏治[1]，　小野直亮[2]，　鈴木秀幸[3]，　太田大策[4]，松田一彦[1]，金谷重彦[2]　([1]近畿大院農，[2]奈良先端大・情報科学，[3](財)かずさ DNA 研，[4]大府大院生命環境)

a11～a15 発表者の接続時間 11:00～11:10

3D25a11　ドラフトゲノムデータを用いたハナビシソウアルカロイド生合成 P450 遺伝子の探索

11:10 ○堀健太郎，山田泰之，佐藤文彦（京大院・生命）

3D25a12　ベルベリン生合成系の転写因子 CjWRKY1 の翻訳後制御機構の解析

11:21 ○山田泰之，佐藤文彦（京大院生命）

3D25a13　ムラサキにおけるシコニン代謝経路の解明に向けたプロテオーム解析

11:32 ○中川友喜美[1]，　高梨功次郎[1]，　森坂裕信[2]，　油屋駿介[2]，植田充美[2]，矢崎一史[1]　([1]京都大 生存研，[2]京都大院 応用生命)

3D25a14　ムラサキのシコニン輸送・分泌に関与する遺伝子の RNA-seq 法による探索

11:43 ○上撫健太，高梨功次郎，杉山暁史，矢崎一史　(京都大学　生存圏研究所)

3D25a15　ムラサキ培養細胞におけるナフトキノン環形成機構の解明

11:54 ○塚原美香[1]，　富田健吾[1]，　矢崎一史[2]，　和田昭盛[3]，山野由美子[3]，柏田祥策[1]，山本浩文[1]　([1]東洋大生命，[2]京大生存圏研，[3]神戸薬大)

D25 会場　午後の部（14:00～18:10）

植物―一次代謝，二次代謝，植物栄養，光合成，オルガネラ，膜輸送―

p01～p05 発表者の接続時間 13:50～14:00

3D25p01　TC, TN および C/N 比の調整による土壌中の硝化活性への影響

14:00 ○ジンショウミン，　Dinesh Adhikari，　向　真樹，荒木希和子，久保　幹（立命館大）

3D25p02　Analysis of chemical and biological properties of apple orchard soils with different productivity

14:11 ○Dinesh ADHIKARI，Masaki MUKAI，Kiwako S. ARAKI，Takamitsu KAI，Motoki KUBO（Fac. Life Sci., Ritsumeikan Univ.）

3D25p03　Analysis of organic phosphorus mineralization activity in relation to bacterial biomass in soil

14:22 ○PONGPAPAT KANTALA，　Masaki MUKAI，Kiwako S ARAKI，Dinesh ADHIKARI，Kubo MOTOKI（Fac. Life Sci., Ritsumeikan Univ.）

3D25p04　カドミウムによるイネ根のアポプラスチックバイパスフローの活性化

14:33 ○森　　泉[1]，　カルロスアリアス[1]，　ソバハンムハマド[2]，中村宜督[2]，平井儀彦[2]，村田芳行[2]　([1]岡山大植物研，[2]岡山大農)

3D25p05　アカバセンニチコウ葉肉細胞でのベタレイン退色現象の観察とそのメカニズム解明の試み

14:44 ○羽馬大輔，大井辰哉，橋床泰之（北大院農）

p06～p10 発表者の接続時間 14:55～15:05

3D25p06　BiFC 法による植物クラスリン輸送経路のタンパク質選別機構の解析

15:05 ○西村浩二[1]，　松波絵里香[2]，　石川翔太[2]，　地阪光生[2]，長屋　敦[2]，横田一成[2]，中川　強[1]　([1]島根大・総科研センター，[2]島根大・生資)

3D25p07　植物における ALA 膜輸送体の探索と機能解析

15:16 ○金丸研吾[1]，　小西真帆[2]，　寺下和輝[2]，　段　　塵[1]，三宅みちる[3]，　野村裕也[3]，　齊藤　優[4]，　藤本尚則[4]，　渡邊繁幸[4]，宇野知秀[1]，山形裕士[1]　([1]神戸大院農，[2]神戸大農，[3]神戸大院自然科学，[4]コスモ石油中央研)

3D25p08　葉特異的な発現をするタバコ MATE 型トランスポーター Nt-JAT2 の機能解析

15:27 ○士反伸和[1]，　南　翔太[1]，　森田匡彦[2]，　林田南帆[1]，伊藤慎悟[2]，　高梨功次郎[2]，　杉山暁史[2]，　表　弘志[3]，　森山芳則[3]，グーセンスアラン[4]，守安正恭[1]，矢崎一史[2]　([1]神薬大生薬，[2]京大生存研，[3]岡山大薬，[4]ゲント大)

3D25p09　葉緑体への蛋白質輸送における膜透過中間体の単離(I)―可溶性組換え前駆体蛋白質の作製

15:38 ○秋田　充，Pohare Manoj，三好貴子（愛媛大農）

3D25p10　Isolation of the translocation intermediates formed during protein translocation into chloroplasts(II)―Precursor proteins with steric hindrance to block protein translocation

15:49 ○Manoj POHARE，Mitsuru AKITA（Ehime Univ.）

p11～p15 発表者の接続時間 16:00～16:10

3D25p11　アメリカネムノキの就眠運動に関わる K^+ チャネルの機能解析

16:10 ○及川貴也[1]，　鈴木健史[1]，　石丸泰寛[1]，　浜本　晋[2]，宗正晋太郎[3]，村田芳行[3]，魚住信之[2]，上田　実[1]([1]東北大院・理，[2]東北大院・工，[3]岡山大院・環境生命)

3D25p12　外来性タンパク質を葉緑体で高蓄積させるための「光スイッチ」の機構と応用

16:21 ○柴田考世[1]，　CHUENWARIN Paweena[1]，　清水正則[2]，小林裕和[1]([1]静県大院・食品栄養環境・薬食生命，[2]常葉大・健康プロデュース)

3D25p13　アスタキサンチンを高産生する遺伝子組換えレタスのメタボローム解析

16:32 ○佐々木貴子[1]，　小川拓水[1]，　岡澤敦司[1]，　三沢典彦[2]，太田大策[1]　([1]大阪府立大学大学院，[2]石川県立大学)

3D25p14　オーストラリアシャジクモ節間細胞における細胞内窒素動態の解明

16:43 ○神成夏未[1]，　寺嶋　傑[1]，　佐々木亮介[2]，　三村徹郎[3]，及川　彰[1,2]　([1]山形大農，[2]理研　CSRS，[3]神戸大理)

3D25p15　オーストラリア・シャジクモの節間細胞における細胞内代謝フラックス解析

16:54 ○寺嶋　傑[1]，　神成夏未[1]，　佐々木亮介[2]，　三村徹郎[3]，及川　彰[1,2]　([1]山形大農，[2]理研 CSRS，[3]神戸大理)

p16～p20 発表者の接続時間 17:05～17:15

3D25p16　オオカナダモ葉緑体欠失細胞における細胞生物学的解析

17:15 ○小林永実[1]，　金澤美加子[1]，　平野智也[2]，　阿部知子[2]，伊藤竜一[3]，藤原　誠[1,2]　([1]上智大学，[2]理研，[3]琉球大学)

3D25p17　シロイヌナズナ花粉発生過程における色素体増殖の解析

17:26 ○石川浩樹[1]，　佐々木駿[1]，　鈴木麻央[1]，　平野智也[2]，風間裕介[2]，阿部知子[2]，伊藤竜一[3]，藤原　誠[1,2]　([1]上智大理工，[2]理研仁科セ，[3]琉球大理)

3D25p18　シロイヌナズナ葉緑体分裂異常変異体における花粉色素体の解析

17:37 ○佐々木駿[1]，　石川浩樹[1]，　加賀谷奨[1]，　風間裕介[2]，阿部知子[2]，伊藤竜一[3]，藤原　誠[1]　([1]上智大理工，[2]理研，[3]琉球大理)

3D25p19　光合成生物におけるタンパク質非結合フラビンが関与する鉄還元酵素反応

17:48 ○佐藤純一[1]，　関野滉太[1]，　田中英資[1]，　森　鉄也[1]，石井達也[1]，　武田晃治[2]，　吉村悦郎[3]，　中川純一[4]，　阿部　晃[5]，新町文絵[6]，木俣真弥[1]，川崎信治[1]，新村洋一[1]　([1]東農大応生科・バイオ，[2]東農大・教職，[3]東大院農生科・応生科，[4]東農大生物産業・食香，[5]札幌医大医・眼科，[6]日大短大・生物資源)

3D25p20　パースニップのフラノクマリン経路において膜結合型プレニル化酵素はリニア型/アンギュラー型生合成の運命を決定する

17:59 ○棟方涼介[1]，　KARAMAT Fazeelat[2]，　OLRY Alexandre[2]，

VINCENT Courdavault[3], 杉山暁史[1], 伊達慶明[1], KRIEGER Celia[2], PAPON Nicolas[3], FOURREAU Emilien[3], GROSJEAN Jeremy[2], 矢崎一史[1], BOURGAUD Frederic[2], HEHN Alain[2]（[1]京大・生存研, [2]ロレーヌ大学, [3]トゥール大学）

D34 会場　午前の部（10:16〜12:05）

糖鎖生化学・糖鎖工学―合成，生合成―

a07〜a10 発表者の接続時間 10:06〜10:16

3D34a07　グルコ型糖供与体の 4，6 位水酸基の保護基が及ぼす反応性への影響
10:16 ○堀　綾香[1], 松本佳央梨[1], 小西美紅[1,2], 今村彰宏[1], 安藤弘宗[1,2], 石田秀治[1], 木曽　真[1,2]（[1]岐阜大・応用生物, [2]京都大・iCeMS）

3D34a08　2,3-環状保護糖供与体を用いた立体選択的グリコシル化の検討
10:27 ○八神なほ子[1], 小西美紅[1,2], 玉井秀樹[1,2], 植木章晴[1,2], 今村彰宏[1], 安藤弘宗[1,2], 石田秀治[1], 木曽　真[1,2]（[1]岐阜大・応用生物, [2]京都大・iCeMS）

3D34a09　脱離基中にアルデヒドを持つチオグリコシド型糖供与体の反応挙動
10:38 ○駒井亮太, 木村智文, 堺　英俊, 西田芳弘, 土肥博史（千葉大院融合）

3D34a10　糖受容体中のチオエーテルを用いた立体選択的グリコシル化
10:49 ○小林真己, 田村真奈美, 江澤あやめ, 西田芳弘, 土肥博史（千葉大院融合）

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

3D34a11　カルバグルコース同士のカップリング反応における供与体保護基の影響
11:10 ○舘田尚家，鰺坂勝美，宮崎達雄（新潟薬大院 応用生命科学）

3D34a12　コンドロイチン硫酸 D 型オリゴ糖の化学合成
11:21 ○松下健也[1]，中田有美[2]，田村純一[1,2]（[1]鳥取大院工，[2]鳥取大地域環境）

3D34a13　ビオチン化ケラタン硫酸オリゴ糖の合成
11:32 ○武田尚子[1], 田村純一[2]（[1]学振特研 PD, [2]鳥取大地域環境）

3D34a14　“Sugaring Tag”ライブラリーの構築
11:43 ○狐塚哲也[1,2], 神田由美子[1], 羽田勝二[1], 稲津敏行[1,2]（[1]東海大・工, [2]東海大・糖鎖研）

3D34a15　オクチルグリコシド誘導体の合成と評価
11:54 長谷見早紀，吉村弥生，○松尾一郎（群馬大院理工）

D34 会場　午後の部（14:00〜17:05）

糖鎖生化学・糖鎖工学―合成，生合成―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

3D34p01　4-メチルベンジル保護シアル酸を用いた α-シアリル化の検討
14:00 ○武居俊樹[1,2]，朝比奈雄也[2]，北條裕信[2]（[1]東海大理，[2]阪大蛋白研）

3D34p02　均一な O-結合型糖鎖を有するヒトインターロイキン-2 の全合成
14:11 ○朝比奈雄也[1], 小宮　忍[2], 大萩亜美[2], 藤本梨奈[2], 中川勝博[3], 佐藤　荘[3], 審良静男[3], 石井　彰[2], 中原義昭[2], 北條裕信[1]（[1]阪大蛋白研, [2]東海大工生命, [3]阪大微研）

3D34p03　糖ペプチド化学合成に有用な新規糖 Asn 誘導体の開発
14:22 ○片山秀和（東海大工・生命化学）

3D34p04　糖 - タンパク質間結合を基盤とするオーガニックフレームワークの創成研究：LacNAc 含有環状ペプチドの合成研究
14:33 ○小宮　忍[1]，中川　篤[2]，蟹江　治[1,2]（[1]東海大院 工，[2]東海大 糖鎖研）

3D34p05　酵素－化学法を用いた高マンノース型糖鎖ライブラリーの合成と GlcNAc 転移酵素（GnT-I）の基質特異性解析
14:44 ○藤川紘樹[1], 小泉晶彦[1], 八須匡和[1], 瀬古　玲[1], 武田陽一[1], 伊藤幸成[1,2]（[1]JST, ERATO, [2]理研, 細胞制御化学）

p06〜p10 発表者の接続時間 14:55〜15:05

3D34p06　LacdiNAc 含有糖鎖の合成研究
15:05 ○宇津井隆志，濱田真輝，石井希実，宮沢進平，松尾一郎（群馬大院理工）

3D34p07　LPS/LOS の酸性内部コア糖鎖コンジュゲート合成
15:16 ○長沢祐一[1], 蟻　瑞欽[2], 一柳　剛[3]（[1]鳥取大院・農, [2]鳥取大院・連農, [3]鳥取大・農）

3D34p08　分子内グリコシル化反応を利用する Kdo2 糖の合成研究
15:27 ○田坂瑞葵[1], 一柳　剛[2]（[1]鳥取大院・農, [2]鳥取大・農）

3D34p09　髄膜炎菌の産生するリポオリゴ糖の部分糖鎖合成
15:38 ○岸本勝也，内田佑介，金岡研生，山崎良平（鳥取大･農）

3D34p10　デオキシ化糖を含む蛍光標識化糖脂質の化学合成研究
15:49 ○藤本梨菜[1], 中川　篤[2], 蟹江　治[2,3]（[1]東海大工, [2]東海大　糖鎖研, [3]東海大院工）

p11〜p15 発表者の接続時間 16:00〜16:10

3D34p11　脂質ラフトの一分子イメージングに向けた脂質変換型蛍光 GM3 プローブの合成
16:10 ○山崎彩乃[1], 河村奈緒子[1,2], 鈴木健一[2], 安藤弘宗[1,2], 今村彰宏[1], 石田秀治[1], 楠見明弘[2], 木曽　真[1,2]（[1]岐阜大・応用生物, [2]京都大・iCeMS）

3D34p12　脂質ラフトの一分子イメージングに向けたガラクトサミン標識ガングリオシドプローブの合成
16:21 ○小池田真知[1], 河村奈緒子[1,2], 鈴木健一[2], 安藤弘宗[1,2], 今村彰宏[1], 石田秀治[1], 楠見明弘[2], 木曽　真[1,2]（[1]岐阜大・応用生物, [2]京都大・iCeMS）

3D34p13　脂質ラフトの一分子イメージングに向けた b 系列ガングリオシドプローブの合成研究
16:32 ○小西美紅[1,2], 鈴木健一[2], 今村彰宏[1], 安藤弘宗[1,2], 石田秀治[1], 楠見明弘[2], 木曽　真[1,2]（[1]岐阜大・応用生物, [2]京都大・iCeMS）

3D34p14　MBP のリガンド糖鎖認識機構解明を指向したルイス a タンデムリピートの合成
16:43 ○小林大輔[1], 山路智也[1], 植木章晴[1,2], 安藤弘宗[1,2], 石田秀治[1], 木曽　真[1,2]（[1]岐阜大・応用生物, [2]京都大・iCeMS）

3D34p15　コブヒトデ由来ガングリオシド PNG-2A の全合成
16:54 ○後藤健太[1], 鈴木達哉[1,2], 玉井秀樹[1,2], 安藤弘宗[1,2], 今村彰宏[1], 石田秀治[1], 木曽　真[1,2]（[1]岐阜大･応用生物, [2]京都大･iCeMS）

F11 会場　午前の部（9:00〜12:05）

動物―生理・栄養，生体機能，生体制御―

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

3F11a01　加齢による味嗜好性の変化
9:00 ○幸田理恵，成川真隆，三坂　巧（東大院農生科・応生化）

3F11a02　味刺激に暴露したマウスにおける味嗜好性の変化
9:11 ○谷下道大[1], 匂坂美輝[2], 成川真隆[2], 三坂　巧[2]（[1]東大農, [2]東大院農生科・応生化）

3F11a03　カプサイシン刺激によって生ずる大脳皮質における SNAP25 発現変動の発生要因の探索
9:22 ○匂坂美輝，成川真隆，三坂　巧（東大院農生科・応生化）

3F11a04　味蕾におけるコンプレキシンファミリーの発現と末梢味情報伝達におけるコンプレキシンの関与
9:33 ○成川真隆[1], 黒川あずさ[1], 應本　真[1], 吉本靖東[1], 阿部啓子[1,2], 三坂　巧[1]（[1]東大院農生科, [2]神奈川科学技術アカデミー）

3F11a05　Characterization of ex vivo expanded taste-like cells derived from small intestine

9:44　○Ken IWATSUKI[1], Eitaro Aihara[2], Peihua Jiang[3], Ayako Kimura[1], Takumi Yamane[1], Yuichi Oishi[1], Kazuo Hattori[1], Nobuyuki Takahashi[1], Makoto Shimizu[1]（[1]Tokyo Univ. Agric., [2]Univ. Cincinnati, [3]Monell Chemical Senses Center）

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

3F11a06　鉄欠乏マウスにおける味覚嗜好性の変化

10:05　○宮本　岳，藍原祥子，橋本堂史，水野雅史（神戸大農）

3F11a07　低タンパク質食摂取が膵島の大きさにおよぼす影響

10:16　○堀内真美[1]，向後雄一郎[1]，遠藤　駿[1]，田口雄亮[2]，豊島由香[2]，南　史朗[2]，高橋伸一郎[3]，竹中麻子[1]（[1]明治大・農・農化，[2]日医・老人病研，[3]東大・院・農生科）

3F11a08　NMDA 型グルタミン酸受容体に対する日本酒成分の効果

10:27　○矢吹　智[1]，上村勇貴[1]，曽我部直哉[1]，黒沢　幹[1]，則包潔人[1]，伊豆英恵[2]，山田康枝[1]（[1]近畿大工，[2]酒類総合研究所）

3F11a09　新たな Capsaicin 受容体（TRPV1）作用物質および Capsaicin による神経細胞保護効果の検討

10:38　○佐藤崇弘[1]，山岡裕磨[2]，岡田芳治[1,2]，青島　均[3]，伊豆英恵[4]，山田康枝[1,2]（[1]近畿大・院・工，[2]近畿大・工，[3]山口大・院・医，[4]酒類総合研究所）

3F11a10　ヒト神経芽細胞腫 SK-N-SH へのサリン類似有機リン剤の毒性作用

10:49　○山田耕資[1]，白石弘章[2]，奈女良昭[3]，有馬陽介[3]，長尾正崇[3]，山田康枝[1]（[1]近畿大・院・工，[2]大雄会・第一病院・産婦人科，[3]広島大・医・法医）

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

3F11a11　シアル酸認識レクチンシグレックによるマクロファージの活性調節機構

11:10　○西島謙一，樋口廣士，庄司　徹，村瀬佑介，飯島信司（名大院工）

3F11a12　間葉系幹細胞から脂肪細胞への Wnt シグナルによる分化制御

11:21　○谷口実由紀[1]，田中　牧[1]，鬼丸祐二[1]，鋳方綾香[1]，山岸あづみ[2]，金　東浩[1]，佐伯　茂[1]（[1]大阪市大・院生活科学・生体情報，[2]山形大・地域教育）

3F11a13　エンドウヒゲナガアブラムシの Toll 経路において機能する Toll 受容体の特定

11:32　○丸山航平，志和　睦，河部陽平，和田崇史，竹下勇斗，河野　強，岩崎　崇（鳥取大農）

3F11a14　線虫 CD36 の低温応答への関与

11:43　○小粥みどり[1]，太田夕貴[1]，澤田理奈[1]，谷口芙美[1]，岡松麻衣[1]，桑原未季[1]，田中江来[1]，片岡愛理[1]，土肥奈津子[1]，弥谷智代[1]，加藤康介[2]，松本晋也[1]（[1]京女大家政，[2]京大院農）

3F11a15　飢餓体験が次世代に及ぼす影響について線虫を用いた解析

11:54　○斎藤春佳[1]，森下真有[1]，清　愛[1]，岡田嵯和子[1]，下地頭所理美[1]，西田彩乃[1]，坂上美登理[1]，松村康生[2]，村上　博[2]，松本晋也[1]（[1]京女大家政，[2]京大院農）

F11 会場　午後の部（14:00〜16:54）

動物―細胞－細胞機能，細胞骨格，オルガネラ，輸送―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

3F11p01　ABCA1 と ABCG1 による細胞膜変化と細胞機能の制御

14:00　○伊藤志帆[1]，松尾道憲[2]，植田和光[1,3]（[1]京大院・農・応用生命，[2]京女・家政・食物栄養，[3]京大 iCeMS）

3F11p02　1 分子イメージングによる HDL 産生機構の解析

14:11　○永田　紘[1]，中田千枝子[1,2]，笠井倫志[2]，石神正登[3]，楠見明弘[1,2]，植田和光[1,3]（[1]京大 iCeMS，[2]京大再生研，[3]京大院農）

3F11p03　多価不飽和脂肪酸を含有する HDL の炎症抑制効果の検証

14:22　○斉藤貴将[1]，植田和光[1,3]，松尾道憲[2]（[1]京大院・農・応用生命，[2]京女・家政・食物栄養，[3]京大 iCeMS）

3F11p04　ブタ腎臓および肝臓マクロファージの単離・培養と P2X7 受容体機能解析

14:33　○竹之内敬人[1]，鈴木俊一[2]，新開浩樹[1]，月本光俊[3]，佐藤　充[1]，上西博英[1,4]，木谷　裕[1]（[1]農生資研・動物生体防御，[2]農生資研・医用ブタ，[3]東理大・薬，[4]農生資研・家畜ゲノム）

3F11p05　ブタ卵胞顆粒層細胞の体外培養過程における細胞形態および遺伝子発現プロファイルの変化

14:44　○篠原千裕[1]，沖　嘉尚[2]，加野浩一郎[1,2]（[1]日大院生資科，[2]日大生資科）

p06〜p10 発表者の接続時間 14:55〜15:05

3F11p06　心臓周囲の脂肪組織は心外膜マーカーを発現する

15:05　○金井すみれ，真田洋平，山本岳史，加藤範久，矢中規之（広島大院　生物圏）

3F11p07　細胞外マトリクスの硬さ感知におけるビンキュリンのアクチン繊維結合能の重要性

15:16　○大町朋弘[1]，市川尚文[1]，木村泰久[1]，植田和光[1,2]，木岡紀幸[1]（[1]京都大農，[2]京都大 物質 - 細胞統合システム拠点）

3F11p08　接着斑タンパク質ビネキシン α の両親媒性ヘリックスはビンキュリンと相互作用する

15:27　○日野直也[1]，市川尚文[2]，木村泰久[2]，植田和光[2,3]，木岡紀幸[2]（[1]京大農，[2]京大院農，[3]京大 iCeMS）

3F11p09　リサイクリングエンドソームに局在する低分子量 G タンパク質の解析

15:38　○森　将人[1]，三崎　亮[1]，田口友彦[2]，大橋貴生[1]，藤山和仁[1]（[1]大阪大生国セ，[2]東京大薬）

3F11p10　小腸上皮の栄養吸収機能における小胞輸送制御因子 Rab8 の役割

15:49　○佐藤隆史[1]，加藤将夫[2]，竹田直樹[3]，辻　彰[2]，原田玲子[4]，原田彰宏[1,5]（[1]群馬大生体調節，[2]金沢大院自然科学，[3]熊本大生命資源，[4]宝塚医療大，[5]大阪大院医）

p11〜p14 発表者の接続時間 16:00〜16:10

3F11p11　神経細胞内に蓄積した A β 42 による細胞毒性の発現機構

16:10　○奥　勇紀[1,2]，村上一馬[3,4]，入江一浩[3,4]，寶関　淳[2,4]，阪井康能[1,2,4]（[1]京都大院・総合生存学館，[2]京都大院農・応用生命，[3]京都大院農・食品生物，[4]京大学際・生理化学）

3F11p12　亜鉛トランスポーターによる細胞内シグナル制御機構の解析

16:21　○福江和久，宮前友策，増田誠司，長尾雅哉，神戸大朋（京大農）

3F11p13　亜鉛トランスポーター ZnT5，ZnT6，ZnT7 を介した分泌型亜鉛要求性酵素の活性化機構

16:32　○宮崎志保，宮前友策，増田誠司，永尾雅哉，神戸大朋（京大生命）

3F11p14　シグナルペプチドのアミノ酸配列と成熟タンパク質の細胞内局在との相関

16:43　○濱田康太[1]，高知尾尚志[1]，越中谷賢治[1]，池田（向井）有理[1,2]（[1]明治大・院理工，[2]明治大・理工）

F12 会場　午前の部（9:00〜12:05）

動物―遺伝子・タンパク質－発現制御―

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

3F12a01　Human malonyl-CoA decarboxylase production using silkworm *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus（BmNPV）bacmid system and their decarboxylase activity

9:00　○In-Wook Hwang[1], Yu Makishima[2], Tomohiro Suzuki[3], Tatsuya Kato[2,4], Shin-Kyo Chung[5], Sungjo Park[6],

Enoch Y. Park[1,2,4]（[1]Laboratory of Biotechnology, Integrated Bioscience Section, Graduate School of Science and Technology, Shizuoka University, [2]Laboratory of Biotechnology, Department of Applied Biological Chemistry, Faculty of Agriculture, Shizuoka University, [3]Research Institute of Green Science and Technology, Shizuoka University, [4]Laboratory of Biotechnology, Green Chemistry Research Division, Research Institute of Green Science and Technology, Shizuoka University, [5]School of Food Science and Biotechnology, Kyungpook National University, [6]Center for Regenerative Medicine, Mayo Clinic, Marriott Heart Disease Research Program, Division of Cardiovascular Diseases, Departments of Medicine, Molecular Pharmacology and Experimental Therapeutics, and Medical Genetics, Mayo Clinic.）

3F12a02　マウス組織におけるキチナーゼ様タンパク質の遺伝子発現解析

9:11　◦大野美紗，貴田雄太，坂口政吉，菅原康里，小山文隆（工学院工）

3F12a03　骨格筋分化能はヒストン H3 バリアントの取り込みによって制御されている

9:22　◦原田哲仁，大川恭行（九州大医）

3F12a04　ニワトリ始原生殖細胞における Prdm14 の機能解析

9:33　◦金岡英徳，奥嵜雄也，村瀬佑介，西島謙一，飯島信司（名大院工）

3F12a05　性差因子 MafB の性差発現制御機構の解明

9:44　◦鈴木堅太郎[1]，松下祥子[1]，鈴木裕子[1]，沼田朋和[1]，日野信次朗[2]，佐藤哲也[3]，高橋　智[4]，中尾光善[2]，須山幹太[3]，山田　源[1]（[1]和歌山県立医大先端研，[2]熊本大発生研，[3]九州大生医研，[4]筑波大医）

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

3F12a06　マスト細胞において GATA3 は Th2 型サイトカインの発現を制御する

10:05　◦八代拓也[1]，奥村　康[2]，西山千春[1]（[1]東京理大　生物工，[2]順天堂大　医）

3F12a07　PLSCR3 は脂肪前駆細胞 3T3-L1 細胞分化の負の制御因子として機能する

10:16　◦猪川　亮，犬塚達俊，高原照直，柴田秀樹，牧　正敏（名大院生命農）

3F12a08　網羅的トランスクリプトーム解析による破骨細胞選択的高発現を示す遺伝子の探索

10:27　◦石橋　宰[1]，小谷康斗[1]，今村亮俊[2]，今町直登[2]，鈴木　譲[3]，秋光信佳[2]，目良　恒[4]，吉矢晋一[5]，乾　隆[1]（[1]大阪府大生命環境，[2]東京大アイソトープ，[3]東京大新領域，[4]武庫川女子大スポーツ健康，[5]兵庫医大整形）

3F12a09　血管内皮間葉転換（EndMT）を制御するエピゲノム制御因子の探索

10:38　◦諸岡信克（群馬大生調研）

3F12a10　PKC-δ により誘導される hTERT 転写抑制の分子メカニズム

10:49　◦高木大司[1]，山下俊太郎[2]，片倉喜範[3]（[1]九大院シス生，[2]学振特研，[3]九大院農院）

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

3F12a11　ビタミン B1 欠乏によるマウス海馬ニューロン数とスパイン密度の減少

11:10　◦岸本拓也[1]，大石　諭[1]，永田　幹[1]，長谷川俊介[1,2]，喜田　聡[1,2]（[1]東京農大・農・バイオ，[2]CREST, JST）

3F12a12　海馬レチノイン酸情報伝達経路による記憶形成能力の制御機構の解析

11:21　◦海老原てい[1]，篠沢貴寛[1]，野本真順[1]，内田周作[1]，喜田　聡[1,2]（[1]東京農大院・農・バイオ，[2]科学技術振興機構 CREST）

3F12a13　ERK 情報伝達系による記憶想起のサーカディアン制御

11:32　◦渡辺玉絵[1]，長谷川俊介[1,2]，喜田　聡[1,2]（[1]東京農大院，[2]科学技術復興機構 CREST）

3F12a14　Reconsolidation-update による恐怖記憶制御の組織学的解析

11:43　◦石川理絵[1]，喜田　聡[1,2]（[1]東農大院・農・バイオ，[2]CREST, JST）

3F12a15　PI3K は BMAL1/CLOCK を介する転写制御を正に調節する

11:54　◦森下良一[1]，三浦大樹[1]，喜田　聡[1,2]（[1]東京農大院・農・バイオ，[2]JST, CREST）

F12 会場　午後の部（14:00〜18:10）

動物―遺伝子・タンパク質－構造，機能―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

3F12p01　ヒト MDR1 の基質取り込みゲート機構の解析

14:00　◦末永健人[1]，井上修一[1]，木村泰久[1]，木岡紀幸[1]，加藤博章[2]，植田和光[1,3]（[1]京大院・農，[2]京大院・薬，[3]京大・iCeMS）

3F12p02　ヒト MDR1 の内向き構造安定化機構の検討

14:11　◦津山智美[1]，木村泰久[1]，木岡紀幸[1]，加藤博章[2]，植田和光[1,3]（[1]京大院農，[2]京大院薬，[3]京大・iCeMS）

3F12p03　アミノ酸置換導入による ABCA1 のコレステロール認識機構の解析

14:22　◦小笠原史彦[1]，木村泰久[1]，植田和光[1,2]（[1]京大院農・応用生命，[2]京大・iCeMS）

3F12p04　ATP 加水分解活性測定系を用いたヒト ABCA1 と ABCA7 の輸送基質の解析

14:33　◦橋本秀彦[1]，石神正登[1]，木村泰久[1]，植田和光[1,2]（[1]京大院農，[2]京大 iCeMS）

3F12p05　癌細胞増殖における長鎖非コード RNA, *ANRIL* の機能解明

14:44　◦苗村円佳，紫　千大，神武洋二郎（近大院）

p06〜p10 発表者の接続時間 14:55〜15:05

3F12p06　嗅覚受容体におけるムスクの香りの認識機構

15:05　◦佐藤成見[1,2]，白須未香[1,2]，伊原さよ子[1,2]，東原和成[1,2]（[1]東大院農生科応生化，[2]JST ERATO 東原化学感覚シグナルプロジェクト）

3F12p07　消化管特異的カルパイン CAPN8 及び CAPN9 による胃粘膜保護機能の解析

15:16　◦秦　勝志，北村ふじ子，反町洋之（都医学研　カルパイン PT）

3F12p08　ハタネズミ受精卵における CRISPR/Cas システムを用いた遺伝子組み換え

15:27　◦堀江謙吾，平山貴士，平岡優一，日出間志津，福田智一，西森克彦（東北大院農）

3F12p09　鶏卵中での有用タンパク質生産に向けたニワトリシアル酸転移酵素の機能解析

15:38　◦木溪俊介，小島佑介，奥嵜雄也，金岡英徳，西島謙一，飯島信司（名大院・工）

3F12p10　脊椎動物卵膜形成機構の解明に向けたニワトリ ZP 糖タンパク質の存在形態に関する研究

15:49　◦佐久間梨央[1]，佐藤喬洋[1]，西尾俊亮[2]，松田　幹[2]，氏田　稔[1]，奥村裕紀[1]（[1]名城大院農，[2]名大院生命農）

p11〜p15 発表者の接続時間 16:00〜16:10

3F12p11　特有のアミノ酸配列を有するセリンプロテアーゼ阻害剤オリクチンと標的プロテアーゼ複合体の結晶構造解析

16:10　◦永田宏次[1]，劉　徳生[1]，鈴木達也[1]，堀田彰一朗[1]，片山幸江[1]，侯　峰[1]，河合岳志[1]，王　世鵬[1]，石橋　純[2]，山川　稔[2]，田之倉優[1]（[1]東大院農生科，[2]農生資研）

3F12p12　ミトコンドリア外膜タンパク質 SAMM50 に生ずるタンパク質 N- ミリストイル化の解析

16:21　◦高光恵美，飯尾雄介，福永和貴，守屋康子，内海俊彦（山口大院・医・応用分子生命）

3F12p13　シグナルペプチドに生ずるタンパク質 N-ミリストイル化の解析
16:32　◦南風原樹，　大塚基顕，　林田真梨子，　高光恵美，守屋康子，内海俊彦（山口大院・医・応用分子生命）

3F12p14　酵母 split-ubiquitin システムによるヒトドリコールキナーゼ hDOLK の物理的相互作用の解析（第 2 報）
16:43　◦樋口洋子，高橋哲夫（東海大工生命化学）

3F12p15　酵母 split-ubiquitin システムによるヒト GlcNAc-1-P 転移酵素 hGPT の物理的相互作用の解析
16:54　◦高橋哲夫，吉田花鈴，樋口洋子（東海大工生命化学）

p16〜p20 発表者の接続時間 17:05〜17:15

3F12p16　酸化変性リポタンパク質中に生成される新規修飾構造の解析
17:15　◦柴田貴広[1,2]，清水和真[1]，平野啓太[1]，内田浩二[1]（[1]名大院生命農，[2]JST　さきがけ）

3F12p17　タグを N 端，又は C 端へ付加したオキシトシン受容体の細胞内局在と活性の検討
17:26　◦鈴木紳吾[1]，　堀江謙吾[2]，　日出間志寿[2]，　西森克彦[2]（[1]東北大農，[2]東北大院農）

3F12p18　タンパク質蛍光標識技術を用いた S-ニトロシル化タンパク質検出法の検討
17:37　◦芳村俊広[1]，　黒木勝久[1,2]，　水光正仁[1,2]，　榊原陽一[1,2]（[1]宮崎大学大学院農学工学総合研究科，[2]宮崎大学農学部応用生物科学科）

3F12p19　マウス酸性哺乳類キチナーゼの触媒ドメインの大腸菌での発現とその性質
17:48　◦小山文隆，樫村昭徳，木村将大，大川一明，鈴木博隆，浮田淳史，脇田悟誌，岡崎香奈，大野美紗，坂口政吉，菅原康里（工学院大学工）

3F12p20　RNASeq による木材穿孔性二枚貝キクイガイの代謝経路解析
17:59　◦西　真郎[1]，　芳賀拓真[2]，　小林樹和[1]，　小林英城[1]，臼井けい子[1]，開　俊樹[3]，鶴若祐介[1]，秦田勇二[1]（[1]海洋研究開発機構，[2]国立科学博物館，[3]自治医科大学）

F22 会場　午前の部（9:11〜11:54）

食品―食品機能・栄養－酸化，抗酸化，老化，食品機能・栄養－消化・吸収，循環―

a02〜a05 発表者の接続時間 9:01〜9:11

3F22a02　発芽米抽出物の血管内皮細胞に対する効果
9:11　◦田畑優子，桜井哲人，粂井貴行（ファンケル総合研究所）

3F22a03　与那国島産ボタンボウフウの血管内皮細胞に対する保護作用
9:22　深田楓子，　◦長谷川達也，　作田智洋，　田村亜紀子，鈴木良治（(株)資生堂　新領域研究センター）

3F22a04　芍薬由来成分の血管内皮細胞における機能解析
9:33　◦鈴木志織[1]，関　浩一[2]，宮崎　均[1]（[1]筑波大学生命環境，[2](株)茎崎観光農園）

3F22a05　メチル化カテキンの血管内皮細胞に及ぼす影響
9:44　◦吹野成美[1]，宮崎　均[2]，吉田滋樹[2]（[1]筑波大院・生命環境系，[2]筑波大・生命環境系）

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

3F22a06　ツルレンゲ種子抽出物による視機能低下抑制作用
10:05　◦屋敷圭子，寒林里美，大戸信明，高柿了士，中原達雄（丸善製薬）

3F22a07　低濃度 EGCg がマウス膵 β 細胞に及ぼす影響
10:16　◦山下さやか，望月和樹（山梨大院）

3F22a08　マガキ由来抗酸化物質の Keap1-Nrf2 経路活性化による肝臓保護作用
10:27　◦布田博敏[1]，　渡邉　貢[2]，　上甲紗愛[1]，　恵　淑萍[1]，武田晴治[1]，渡邉孝之[2]，千葉仁志[1]（[1]北海道大学大学院　保健科学研究院，[2]渡辺オイスター研究所）

3F22a09　桂皮酸誘導体への炭素鎖導入による HSP70 発現増強効果
10:38　◦丹治典子，片山　茂，清水綾乃，中村宗一郎（信州大農）

3F22a10　ザクロ由来ポリフェノールによる SIRT3 の活性化
10:49　◦小野友愛[1]，　坂口武則[2]，　藤田幸佑[1]，　伊東秀之[3]，西田典永[4]，長友暁史[4]，松浦洋一[4]，片倉喜範[5]（[1]九大院シス生，[2]九大院生資環，[3]岡山県大保福，[4]森下仁丹株式会社，[5]九大院農院）

a11〜a14 発表者の接続時間 11:00〜11:10

3F22a11　ザクロ葉エキスの血糖値上昇抑制作用とその作用成分
11:10　◦河辺聡子，　赤井衣里阿，　加藤奈々，　我如古菜月，伊東秀之（岡山県大 保健福祉 栄養）

3F22a12　緑茶カテキン EGCG は 67LR を介して抗血栓因子 TFPI の産生を促進する
11:21　◦上崎浩克[1]，高倉卓也[1]，山下修矢[1]，立花宏文[1,2]（[1]九大院農院・生機科，[2]九大食品機能デザイン）

3F22a13　タマネギケルセチンの生体利用性に対する食べ合わせの効果―同時摂取食材がケルセチン血漿濃度に与える影響―
11:32　高橋正子[1]，　庄野裕美[1]，　向井理恵[1]，　井出晋太郎[2]，朝武宗明[2]，濱田康弘[1]，◦寺尾純二[1]　（[1]徳島大院 HBS，[2]ハウスウェルネス(株)）

3F22a14　フラボノイドがコレステロール腸管吸収トランスポーター発現に与える影響
11:43　◦小川真奈[1]，　猫橋茉莉[1]，　山梨義英[2]，　高田龍平[2]，阿部啓子[1,3]，小林彰子[1]（[1]東大院農，[2]東大病院薬，[3]KAST）

F22 会場　午後の部（14:00〜18:10）

食品―食品機能・栄養－消化・吸収，循環―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

3F22p01　ライチ由来ポリフェノールを低分子化した Oligonol のコレステロール低下作用の検証
14:00　◦林　洪太[1]，　日野原顯[1]，　河合咲紀[1]，　長田恭一[1]，高成　準[2]，北舘健太郎[2]（[1]明治大農，[2]アミノアップ化学）

3F22p02　グァーガム酵素分解物添加は飲料中の自由水を減少させ，腸管での水や陽イオン吸収を穏やかにする
14:11　◦高橋　徹[1]，　安川然太[2]，　森田麻友美[2]，　徳永　誠[2]，三ツ矢隆之[2]，徳永美希[1]（[1]福岡女子大学，[2]太陽化学(株)）

3F22p03　難消化性デキストリンの消化管内動態および長期摂取時の内臓脂肪量への影響
14:22　◦近藤位旨[1]，鈴木　魁[2]，日野真吾[1]，森田達也[1]（[1]静岡大院・農，[2]静岡大学・農）

3F22p04　イヌリン型フルクタン摂取時のラット盲腸ムチン濃度とムチン分解細菌の関連性
14:33　◦伊藤　謙[1]，　源田知美[1]，　近藤位旨[1]，　日野真吾[1]，園山　慶[2]，福島道広[3]，森田達也[1]　（[1]静岡大院・農，[2]北大院・農，[3]帯畜大・食品科学）

3F22p05　イソマルトデキストリンによるラット大腸水素生成と腸内細菌叢の変化
14:44　◦西村直道，田邊宏基，山本達朗（名寄市大保健福祉）

p06〜p10 発表者の接続時間 14:55〜15:05

3F22p06　まるごと濃縮かきエキスによる消化管からのエタノール吸収抑制作用
15:05　◦佐藤　敬，上野　栞，北村整一，山口和也，高垣欣也（株式会社　東洋新薬）

3F22p07　トマトがカルシウムの吸収効率に与える影響について
15:16　◦山本　侑，砂堀　諭，菅沼大行（カゴメ株式会社研究開発本部）

3F22p08　黒大豆種皮抽出物の血管に対する作用
15:27　◦難波文男，日下里菜，戸田登志也（フジッコ株式会社）

3F22p09　水溶性製剤化によるルテインの血中移行に及ぼす影響
15:38 ○小林純也[1]，冨永悦子[1]，宮崎聡子[1]，黒野昌洋[1]，小関　誠[1]，大久保勉[1]，仲川清隆[2]，宮澤陽夫[2]（[1]太陽化学株式会社，[2]東北大院農　機能分子解析）

3F22p10　朝食時のリコピン吸収における摂食及び明暗リズムの影響の解明
15:49 ○吉田和敬[1]，小堀暁美[1]，西田由香[2]，加藤秀夫[2]，砂堀　諭[1]，菅沼大行[1]（[1]カゴメ(株)　研究開発本部，[2]県立広島大人間文化）

p11〜p15 発表者の接続時間 16:00〜16:10

3F22p11　Caco-2 細胞を用いた小腸上皮透過性に及ぼすリン脂質消化産物の影響評価
16:10 ○室田佳恵子[1,2]，熊本　舜[2]，福嶋伸之[1,2]，徳村　彰[3]（[1]近畿大・理工，[2]近畿大院・総合理工，[3]安田女子大・薬）

3F22p12　Caco-2 細胞単層膜におけるタイトジャンクションにおよぼすレクチンの影響
16:21 根本　諒，永沼孝子，小川智久，○村本光二（東北大院生命科）

3F22p13　蛍光マーカーを用いたゼブラフィッシュ胚の輸送機構解析
16:32 ○大山結香，後藤優佳，小川智久，村本光二（東北大院・生命科）

3F22p14　大豆イソフラボンの腸管輸送因子の探索
16:43 ○鈴木千尋[1]，安岡顕人[2]，近藤　隆[2]，石井剛志[3]，阿部啓子[1,2]，小林彰子[1]（[1]東大院農，[2]KAST，[3]静県大食品）

3F22p15　安定同位体を用いたラット大腸管腔内プトレッシンの吸収及び組織への分布に関する研究
16:54 ○中村篤央，松本光晴（協同乳業・技術開発）

p16〜p20 発表者の接続時間 17:05〜17:15

3F22p16　解毒代謝酵素の発現を誘導するゲニステインの作用機構解析
17:15 ○大前佑介[1]，戸塚　護[1]，清水　誠[2]，薩　秀夫[3]（[1]東大院・農生科，[2]東農大・応用生物科学・栄養科学，[3]前橋工大・工・生物工学）

3F22p17　ガーリック由来香気成分の抗血栓作用の解明
17:26 ○矢口真実，細野　崇，関泰一郎（日本大院生資科）

3F22p18　高知県産ウバユリ(*Cardiocrinum cordatum*)が有するアンジオテンシン I 変換酵素阻害物質の単離と同定
17:37 ○森本ゆかり[1]，岡川綺華[1]，松尾　茜[1]，陳　新陽[1]，柏木丈拡[1]，金　哲史[1]，渡邊高志[2]，渡邊浩幸[3]，篠原速都[4]，川北浩久[4]，島村智子[1]，受田浩之[1]（[1]高知大農，[2]高知工科大環境理工，[3]高知県立大健康栄養，[4]高知工技セ）

3F22p19　社会的敗北ストレス負荷がマウスの胆汁酸産生に及ぼす影響
17:48 ○麻生愛花[1]，一法師克成[2]，山岸直子[3]，守谷直子[3]，青木(吉田)綾子[3]，後藤達彦[4]，豊田　淳[4]，山本(前田)万里[2]，鈴木チセ[1,3]（[1]東大院農生・応動科，[2]農研機構・食総研，[3]農研機構・畜草研，[4]茨城大農・生物生産科）

3F22p20　小麦全粒粉の消化に伴うアルキルレゾルシノールの可溶化
17:59 ○牧田美希[1]，福田真人[1]，菊池洋介[1]，福留真一[1]，小竹英一[2]，長尾昭彦[2]（[1]日清製粉グループ本社・基礎研，[2](独)農研機構・食総研）

F26 会場　午前の部（9:00〜12:05）

食品―食品化学－タンパク質，アミノ酸―

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

3F26a01　機能性環状ジペプチドの一括分析法の確立とプーアル茶中含有量の定量把握
9:00 ○林　未季[1]，山本憲司[1,2]，村上由佳[3]，荒木陽子[1]，柏木丈拡[1]，島村智子[1]，受田浩之[1]（[1]高知大農，[2]サントリーグローバルイノベーションセンター(株)，[3]サントリービジネスエキスパート(株)）

3F26a02　ショウガプリンの凝固メカニズムについて
9:11 ○西山友貴，荒木朋洋（東海大農）

3F26a03　小麦粉から調製した酸可溶性画分中の ω-グリアジンの製パン性に対する効果
9:22 ○岡　大貴[1]，野口智弘[1]，高野克己[2]（[1]東京農大応生・食加技セ，[2]東京農大応生・化学）

3F26a04　加熱および塩化マグネシウム添加が白ナタマメタンパク質に与える影響
9:33 ○西澤果穂[1]，竹中康之[2]，升井洋至[3]，有井康博[3]（[1]武庫女大院・生活環境，[2]神戸松陰大・人間科学，[3]武庫女大・生活環境）

3F26a05　鶏卵貯蔵中における卵白塩基性様タンパク質(OVAX)の構造変化
9:44 ○赤澤隆志，小川雅廣，早川　茂（香川大農）

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

3F26a06　米胚乳酵素活性量を利用したコシヒカリ近縁品種の比較分析
10:05 ○辻井良政，高野克己（東京農大応生・化学）

3F26a07　鶏肉中での高グルタミン酸生成におけるアスパルチルアミノペプチダーゼの寄与
10:16 ○大谷　彰，吉澤　瞳，股野麻未，柏木　豊，前橋健二（東京農大院醸造）

3F26a08　大豆品種間による GABA 生成量の違いに関する研究
10:27 ○宮澤拓巳[1]，金内　誠[1]，石田光晴[1]，津志田藤二郎[1]，長田　隆[2]（[1]宮城大食産，[2]トーアス株式会社）

3F26a09　ヨーグルト酒中の GABA 生産機構の解析
10:38 ○田原愛華，大島敏久，大森勇門（大工大工）

3F26a10　タウリンによる TXNIP 発現制御機構の解析
10:49 ○嶋中　花[1]，権藤祐輔[1]，戸塚　護[1]，清水　誠[2]，薩　秀夫[3]（[1]東大院・農生科，[2]東農大・応用生物科学・栄養科学，[3]前橋工大・工・生物工学）

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

3F26a11　グリセルアルデヒド由来後期段階生成物「GLAP」による RAGE を介した細胞毒性
11:10 ○長谷川俊樹[1]，藤野峻行[1]，臼井照幸[1,2]，渡辺寛人[1]，早瀬文孝[1]（[1]明治大農，[2]女子栄養大）

3F26a12　アルギニンおよびアルギニン高含有ペプチドによる 膵腺房細胞 mTOR 活性化の作用機構解析
11:21 ○吉田和馬，原　博（北大農）

3F26a13　ペプシン可溶化エラスチンが脂肪細胞の分化及び脂肪蓄積に与える影響
11:32 ○坂野　僚，好田　正，服部　誠（東京農工大学）

3F26a14　コラーゲンペプチドによる骨格筋肥大効果について
11:43 ○坂本知隆[1]，小川真弘[1]，井上直樹[2]，片岡　綾[2]，杉原富人[2]，原田直樹[1]，山地亮一[1]（[1]大阪府大院・生命環境，[2]新田ゼラチン(株)）

3F26a15　*ex vivo* 試験を用いた降圧ペプチドの組織 ACE 阻害特性の検討
11:54 ○小山正浩，興津　翔，渡辺　旭，早崎大輔，石田竜也，中村浩蔵（信州大農）

F26 会場　午後の部（14:11〜18:10）

食品―食品化学－色素，香料―

p02〜p05 発表者の接続時間 14:01〜14:11

3F26p02　植物の色はダイクロマティズムにより変化する　〜サフラン・ライスは何故黄色いのか？〜
14:11 ○笠島一郎，佐々木克友（農研機構・花き研究所）

3F26p03　赤ワインに含まれる高分子色素重合体の呈味

14:22 ◦久本雅嗣，鈴木淳平，斉藤史恵，奥田　徹（山梨大・ワイン研）

3F26p04　アスコルビン酸によるアントシアニン色素退色に対する各種化合物の影響

14:33 ◦野口治子[1]，　江崎正信[2]，　津久井亜紀夫[1]，　高野克己[1]（[1]東京農大応生・化学，[2]東京農大院農・農化）

3F26p05　アスコルビン酸によるアントシアニン退色機構の推定

14:44 ◦江崎正信[1]，　野口治子[2]，　辻井良政[2]，　津久井亜紀夫[2]，高野克己[2]（[1]東京農大院農・農化，[2]東京農大応生・化学）

p06〜p10 発表者の接続時間 14:55〜15:05

3F26p06　界面活性剤によるクロロフィルのミセル化と光退色に対する効果

15:05 ◦安田みどり[1]，田端正明[2]（[1]西九州大健栄，[2]佐賀大学理工）

3F26p07　システイン・グルコース系メイラード反応溶液からの新規色素ピロロチアゾレート（pyrrolothiazolate）の単離，同定と生成条件について

15:16 ◦野田響子[1]，山田眞二[2]，村田容常[1]（[1]お茶大院ライフ・食品栄養，[2]お茶大院理・化学）

3F26p08　キシロース・リジン系メイラード反応における 4-ヒドロキシ-5-メチル-3(*2H*)-フラノン（HMFO）経由の褐変機構の提唱

15:27 ◦見上葉子[1]，山田眞二[2]，村田容常[1]（[1]お茶大院ライフ・食品栄養，[2]お茶大院理・化学）

3F26p09　D-キシロース-グリシン系メイラード反応により生成する新奇青色色素化合物の同定

15:38 ◦泉　雄斗，渡辺寛人，早瀬文孝（明治大農）

3F26p10　LC-MS/MS による食品中のメーラード反応産物の分析

15:49 ◦大塚　譲[1,6]，　中村　愛[1]，　保坂好江[1]，　石井美佳子[1]，橋本侑子[2]，　重森美里[2]，　能見祐里[3]，　中島敬子[4]，　鈴木恵美子[2]，松井芳光[5]，山本祐司[5]，本間清一[1]（[1]お茶の水女子大学　生環研，[2]お茶大大学院，[3]新潟薬科大学，[4]日本女子大，[5]東京農大，[6]戸板女子短大）

p11〜p15 発表者の接続時間 16:00〜16:10

3F26p11　メイラード反応で生じる高分子化合物を分解する微生物

16:10 ◦松井芳光[1]，　加藤　結[1]，　川田　凛[1]，　大塚　譲[2]，山本祐司[1]，本間清一[2]（[1]東農大化，[2]お茶女大）

3F26p12　味噌メラノイジンのコクへの寄与

16:21 ◦加藤祥恵，井上　裕，渡辺寛人，早瀬文孝（明治大農）

3F26p13　萩のナツミカンの花の香気成分の同定

16:32 ◦志方あかね，小山真知，惣田乃絵，赤壁善彦（山口大農）

3F26p14　リンゴ香気成分プロファイルの品種特性

16:43 ◦田中福代[1]，早川文代[2]，葛西　智[3]（[1]農研機構・中央農研，[2]農研機構・食総研，[3]青森産技セ・りんご研）

3F26p15　香気成分シトラールを添加したアガロースゲルの HRMAS-NMR スペクトルとテクスチャーの測定

16:54 ◦山田恭正[1]，瀬河三貴[1]，水野希美子[1]，西成勝好[2]（[1]同志社女子大食栄，[2]湖北工業大）

p16〜p20 発表者の接続時間 17:05〜17:15

3F26p16　イソ及びアンテイソ構造を有する脂肪族高級アルデヒドの香気に関する構造活性相関

17:15 ◦藤川誠二，　和田善行，　稲垣さつき，　佐久間克也，熊沢賢二，作田圭亮（小川香料）

3F26p17　回分培養法によるウサギ盲腸発酵に及ぼすゲラニオールの影響

17:26 ◦島田花純[1]，　富澤由花[1]，　佐上　博[2]，　大谷典正[3]，小酒井貴晴[1,3]（[1]山形大地教，[2]東北大多元研，[3]山形大院理工）

3F26p18　埼玉県産小麦のストリーム粉の一般成分と揮発性成分との相関

17:37 ◦成澤朋之[1]，　小島登貴子[1]，　仲島日出男[2]，　杉山健二郎[3]，山田昌治[3]（[1]埼玉産技セ北部，[2]埼玉産技セ，[3]工学院大工）

3F26p19　高 *β*- グルカン大麦の焙煎香気における搗精と焙煎度の影響

17:48 ◦神山紀子[1]，　一ノ瀬靖則[1]，　金子成延[1]，　小前幸三[2]，高橋飛鳥[2]，吉岡藤治[2]，柳澤貴司[1]（[1]農研機構作物研，[2]農研機構近中四農研）

3F26p20　発芽玄米酒粕の呈味増強効果と活性酸素消去能

17:59 ◦小木曽加奈[1]，岡崎光雄[2]（[1]長野県短大生活科学，[2]岡崎酒造）

F28 会場　午前の部（10:16〜11:54）

食品―食品工学－保蔵，安全性―

a07〜a10 発表者の接続時間 10:06〜10:16

3F28a07　塩麹製造中および保存中における食塩濃度の違いによる抗菌効果について

10:16 ◦相良純一[1]，　尾関健二[1]，　新田陽子[2]，　高橋香澄[3]，北元憲利[3]（[1]金沢工業大学，[2]岡山県立大，[3]兵庫県立大）

3F28a08　腐敗細菌および食品付着細菌に対する塩麹の抗菌効果について

10:27 ◦北元憲利[1]，　高橋香澄[1]，　安方芙実子[1]，　石坂朱里[1]，加藤陽二[1]，新田陽子[2]，相良純一[3]，尾関健二[3]（[1]兵庫県立大環境人間，[2]岡山県立大保健福祉，[3]金沢工大バイオ・化学）

3F28a09　ハーブを用いたアレルギー様食中毒発生予防法の検討

10:38 ◦安方芙実子[1]，　北元憲利[1]，　加藤陽二[1]，　石坂朱里[1]，新田陽子[2]（[1]兵庫県立大学，[2]岡山県立大学）

3F28a10　モデルマウスを用いた低アレルゲン化エビタンパク質の評価

10:49 佐々木萌[1]，　◦佐々木直美[1]，　ロパタアンドレアス[2]，菰田俊一[1]（[1]宮城大学，[2]ジェームス　クック　大学　（豪州））

a11〜a14 発表者の接続時間 11:00〜11:10

3F28a11　マイクロバブルによるカット野菜の除菌・洗浄方法の開発

11:10 杉浦　舞[1]，　◦中居久拓[1]，　高橋正好[2]，　畠山俊穂[3]，千賀淳哉[4]，菰田俊一[1]（[1]宮城大食産業，[2]産総研，[3]畠山電気商会，[4]デザインココ）

3F28a12　ヤーコンの Ca 処理による加熱・凍結時の物性の変化

11:21 倉　悠真，春田直樹，◦石田信昭（石川県大食品）

3F28a13　デンプン系食品の冷凍解凍に伴う品質劣化挙動の解析

11:32 ◦羽山耕平，石川大太郎，藤井智幸（東北大農）

3F28a14　餡粕熱水抽出物の冷凍食品の物性に対する効果

11:43 ◦田川絵理[1]，浦真由美[1]，片倉啓雄[1,2]，河原秀久[1,2]（[1]関西大化学生命工，[2]関西大先端機構）

F28 会場　午後の部（14:00〜17:59）

食品―食品工学－物性，分析―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

3F28p01　DNA アプタマーを用いた on-site かつ real-time に検出可能な新規カフェインセンサーの開発

14:00 ◦森田悠治[1]，冨田康之[1]，菅　裕明[2]，藤原大介[1]（[1]キリン・基盤研，[2]東大院理）

3F28p02　蛍光指紋を用いた黒胡椒の産地判別

14:11 ◦今井真介[1]，　天明裕介[1]，　鎌田庸宏[1]，　蔦　瑞樹[2]，藤田かおり[2]，杉山純一[2]　（[1]ハウス食品グループ本社，[2]農研機構食品産業研究所）

3F28p03　近赤外分光法による茶の非破壊測定

14:22 ◦岡本由希[1]，　山下まゆ美[2]，　築舘香澄[3]，　内山裕美子[4]，加藤みゆき[5]　（[1]和洋女大，[2]高崎商科短大，[3]大妻女大，[4]味香研，[5]香川大）

3F28p04　フーリエ変換型近赤外分光法による清酒の精米歩合予測モデルの構築

14:33 ◦福田泰弘[1,2]，　磯谷敦子[1,3]，　岩下和裕[1,3]，　馬場健史[1,2]，福崎英一郎[1,2]（[1]日本農芸化学会，[2]大阪大工，[3]酒類総合研究所）

3F28p05　分光法融合による泡盛の多面的かつ迅速な品質評価法に関する基礎的研究

14:44　◦蔦　瑞樹[1]，　平良英三[2]，　塚原正俊[3]，　塚原恵子[3]，粉川美踏[1]，　トリヴィッタヤシルヴィパヴィ[1]，　吉村正俊[1]，藤田かおり[1]，杉山純一[1]（[1]農研機構食総研，[2]琉球大農，[3](株)バイオジェット）

p06〜p10 発表者の接続時間 14:55〜15:05

3F28p06　加熱後の位相速度変化量にもとづくミルクコーヒー沈澱発生の迅速判定

15:05　◦田丸竜万，石川奈奈，西津貴久，勝野那嘉子，後藤清和（岐阜大・応生）

3F28p07　電気インピーダンス法によるレトルトパウチ封入食品の加工程度の非破壊計測

15:16　◦岡本拓海，川井清司，羽倉義雄（広大院生物圏科学）

3F28p08　静的および動的弾性率を用いた未開封レトルトパウチ食品の非破壊硬さ測定

15:27　◦田添由真[1]，川井清司[2]，羽倉義雄[2]（[1]広大生物生産，[2]広大院生物圏科学）

3F28p09　嚥下調整食の開発を目的とした食品の飲み込みやすさを評価する系の構築

15:38　◦茅沼友希[1]，　上田玲子[1]，　南　道子[2]，　石丸喜朗[1]，阿部啓子[1]，朝倉富子[1]（[1]東大農，[2]東京学芸生科）

3F28p10　コシヒカリの良食味 QTL が米飯物性に及ぼす効果について

15:49　◦三木崇広[1]，　飯島　健[2]，　辻井良政[3]，　堀　清純[2]，高野克己[3]（[1]東京農大院・農化，[2]生物研，[3]東京農大応生・化学）

p11〜p15 発表者の接続時間 16:00〜16:10

3F28p11　米澱粉の構造改変が物性に及ぼす影響

16:10　◦阿久澤さゆり[1]，峰村貴央[2]，藤田直子[3]，鶴田英一[4]（[1]東京農大健康，[2]東京医療保健大栄養，[3]秋田県大生物資源，[4]昭光サイエンティフィック(株)）

3F28p12　γ-シクロデキストリンを用いたコエンザイム Q10-胆汁酸ミセルの形成とビタミン C による還元反応

16:21　◦上梶友記子[1,2]，　大西麻由[2]，　中田大介[2]，　寺尾啓二[2]，吉井英文[1]（[1]愛媛連大農，[2]シクロケムバイオ）

3F28p13　長期冷凍保存下における O/W エマルション不安定化に及ぼす要因の解明

16:32　◦石橋ちなみ，本同宏成，上野　聡（広島大院生物圏）

3F28p14　氷点下における油脂・糖複合皮膜の水分浸透観察

16:43　◦松田さとみ，渡辺　学，鈴木　徹（海洋大 海洋科）

3F28p15　冷解凍ゲルの「もちもち」食感へのタピオカ加工澱粉の効果

16:54　◦井之上明弘，中村　卓（明治大院農・農化）

p16〜p19 発表者の接続時間 17:05〜17:15

3F28p16　水溶液中におけるゼラチンのゾル・ゲル転移に及ぼす協同的水和効果の解析

17:15　◦宮脇長人，表　千晶，松平景子（石川県大生資環）

3F28p17　グルテニンの物性とナノ構造にたいする塩化ナトリウムの影響

17:26　◦東野ゆうき[1]，　船木智史[1]，　佐藤信浩[2]，　杉山正明[2]，大場洋次郎[2]，井上倫太郎[2]，北尾悠樹[1]，裏出令子[1]（[1]京大院農・農学，[2]京大・原子炉）

3F28p18　乾燥卵白・カゼインナトリウム混合タンパク質フィルムにおけるカゼイン画分添加の効果

17:37　◦太田尚子，荻野健次（日大短大）

3F28p19　キトサンナノファイバーがヒドロゲルの物性や機能性に与える影響

17:48　◦岩本博行，懸谷しのぶ，新田祥子（福山大生命工）

F37 会場　午前の部（9:00〜12:05）

食品―食品機能・栄養－脂質代謝―

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

3F37a01　食事脂質の腸内細菌代謝産物が肥満状態での脂肪組織炎症モデル系に与える影響

9:00　◦梁　夏恩[1]，西村　哲[1]，李　泳佳[1]，大植隆司[1]，後藤　剛[1,2]，北村苗穂子[3]，朴　時範[4]，岸野重信[3]，小川　順[2,3]，高橋信之[1,2]，河田照雄[1,2]（[1]京大院農・食品生物，[2]京大・生理化学研究ユニット，[3]京大院農・応用生命，[4]京大院農・産業微生物）

3F37a02　*waxy/amylose-extender* 二重変異体米に含まれる機能性成分による脂質代謝改善効果のトランスクリプトーム解析

9:11　◦山室　渉[1]，　中屋　慎[1]，　湯野川春信[2]，　松本健司[3]，北村進一[1]（[1]阪府大院生命，[2]メッセンジャー・スケープ(株)，[3]石川県大・生物資源環境）

3F37a03　Caco-2 細胞に透過させたカフェインが 3T3-L1 脂肪細胞の分化に与える影響

9:22　◦原田聖也，山下陽子，芦田　均（神戸大・院・農）

3F37a04　香醋由来の糖・脂質代謝改善成分の単離・同定

9:33　◦安　芝英[1]，　山津敦史[1]，　栗田ちひろ[1]，　山下裕輔[1]，原田清佑[1]，　丸　勇史[1]，　高尾敏文[2]，　辻野義雄[3,4]，　吉國義明[1]，金　武祚[1]（[1](株)ファーマフーズ，[2]大阪大蛋白質研，[3]北陸先端大マテリアル，[4]千葉科学大薬）

3F37a05　メタボリックシンドロームモデルラットにおけるワサビ葉熱水抽出物の脂質代謝改善効果

9:44　◦大渡康夫[1]，　小川哲郎[1]，　勝部拓矢[1]，　飯沼清栄[2]，吉富久恵[3]，高　　明[3]（[1]島根産技セ，[2]健康栄養素材研，[3]武庫川女大薬）

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

3F37a06　キサントフモール精製物投与による KKAy マウスの抗肥満作用

10:05　◦高橋光輝，長田恭一（明治大農）

3F37a07　卵巣摘出ラットにおける共役リノール酸と温州みかん抽出物の肥満予防効果

10:16　◦小栗幹也[1]，谷澤　郁[1]，長田恭一[1]，向井克之[2]（[1]明治大農，[2]ユニチカ）

3F37a08　オキアミ由来の 8- ヒドロキシエイコサペンタエン酸（8-HEPE）による抗肥満作用

10:27　◦山田秀俊[1]，　菊地明香[1]，　箱崎真友佳[1]，　本舘香織[1]，長洞　希[1]，弘瀬雅教[2]（[1]岩手生工研・生物資源，[2]岩手医大・薬）

3F37a09　長期高脂肪・高ショ糖摂取マウスにおけるリンゴプロシアニジン類摂取による肥満・脂質代謝および腸内細菌叢に与える影響

10:38　◦升本早枝子[1]，寺尾明莉[1]，向井孝夫[1]，庄司俊彦[2]（[1]北里大・獣医，[2]農研機構・果樹研）

3F37a10　微生物制御発酵茶由来新規成分テアデノールの機能性に関する研究

10:49　◦渡邉知佳子[1]，　池谷　翼[1]，　洪　銘蔚[1]，　吉田滋樹[1]，河村傳兵衛[2]，宮崎　均[1]（[1]筑波大 生命環境，[2]株式会社 RIVERSON）

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

3F37a11　緑茶品種「サンルージュ」の肥満抑制作用

11:10　◦和才昌史[1,2]，村田　希[2]，野中遥奈[2]，河岡明義[1]，立花宏文[2,3]（[1]日本製紙(株)アグリ・バイオ研究所，[2]九大院・農院・生機科，[3]九大・食品機能デザインセンター）

3F37a12　マウス脂肪細胞の脂肪代謝に対する EGCG およびカフェインの影響

11:21　◦杉浦千佳子[1]，劉リタン[2]，茶山和敏[2]（[1]常葉大健プロ，[2]静岡大院農）

3F37a13　マウスの摂食および脂肪蓄積に対する EGCG とカフェ

インの効果

11:32 ○劉栗タン[1]，茶山和敏[1]，原　征彦[2]，杉浦千佳子[3]（[1]静岡大学・農・院，[2](株)茶研究・原事務所，[3]常葉大学・健康プロ・栄養）

3F37a14　各種茶の膵リパーゼ阻害活性と活性物質の同定

11:43 ○小池勇介[1]，藤田智之[1]，古賀邦正[2]（[1]信州大院農，[2]東海大開発工学）

3F37a15　ウンシュウミカン（*Citrus unshiu*）葉のリパーゼ阻害活性物質

11:54 ○高田雄輔[1]，松川哲也[1,2]，伊藤仁久[2]，志水恒介[2]，堀川勇次[2]，友廣教道[2]，津本光貴[2]，橋爪淳二[2]，藤田卓也[2]，文室政彦[2]，宇都宮直樹[2]，中垣友太[3]，村田和也[3]，松田秀秋[2,3]，梶山慎一郎[1]（[1]近畿大生物理工，[2]近畿大附属農場，[3]近畿大薬）

F37 会場　午後の部（14:00〜18:10）

食品―食品機能・栄養－脂質代謝，食品機能・栄養－糖質代謝―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

3F37p01　イチゴ種子エキスのヒト表皮三次元培養モデルにおける表皮バリアーおよび保湿機能分子に及ぼす作用

14:00 ○竹田翔伍，下田博司（オリザ油化(株)）

3F37p02　食餌性紫黒米の血漿脂質レベル改善効果

14:11 ○近藤(比江森)美樹[1]，中川咲良[1]，永易あゆ子[2]（[1]徳島文理大，[2]岡山県大）

3F37p03　In vitro screening on 3T3-L1 adipocytes reveals Eurycoma longifolia Jack and Piper nigrum L. as dual active Indonesian medicinal plants for anti-diabetes and anti-obesity

14:22 ○Lucy LAHRITA，Eisuke KATO，Jun KAWABATA（Hokkaido University）

3F37p04　前糖尿病患者の食後高血糖におけるバイオマーカーの探索

14:33 ○実広亜希子[1]，本嶋秀子[2]，松川隼也[3]，Villareal Myra[2,4]，荒木理沙[5]，藤江敬子[5]，橋本幸一[5]，礒田博子[2,4]（[1]筑波大生命環境，[2]筑波大北アフリカ研究センター，[3]筑波大院生命環境，[4]筑波大生命環境系，[5]筑波大医学医療系）

3F37p05　前糖尿病患者及び健常人における表面研削加工玄米単回摂取による食後血糖値の白米，玄米との比較検討　－プロテオーム解析による作用メカニズムの検討―

14:44 ○本嶋秀子[1]，実広亜希子[5]，松川隼也[6]，Villareal Myra[2]，荒木理沙[3]，藤江敬子[3]，奥西智哉[4]，鈴木彌生子[4]，岡留博司[4]，橋本幸一[3]，礒田博子[2]（[1]筑波大学北アフリカ研究センター，[2]筑波大学生命環境系，[3]筑波大学医学医療系，[4]農研機構食品総合研究所，[5]筑波大学生命環境学群，[6]筑波大学生命環境科学研究科）

p06〜p10 発表者の接続時間 14:55〜15:05

3F37p06　肥満・糖尿病モデル KK-A^{y} マウスにおける少量エタノール摂取の影響

15:05 ○伊豆英恵[1]，木本晶子[2]，浦上真治[2]，藤井　力[1]，加藤範久[2]（[1]酒総研，[2]広大院・生物圏）

3F37p07　海藻由来酸性多糖類の血糖値上昇抑制作用

15:16 ○本三保子[1]，高見澤菜穂子[2]，仲村麻恵[1]，鬘谷　要[1]，岩崎一泰[3]，田中克幸[3]，室田明彦[4]（[1]和洋女大生活，[2]早大規範科学総合研究所，[3]奥野製薬工業，[4]明治大理工）

3F37p08　米アルブミンの食後血糖値上昇抑制メカニズムの解明

15:27 ○長谷　歩，安藤俊希，旭恵里奈，稲　成信，赤尾　真，熊谷日登美（日大・生資科・生化）

3F37p09　膵 β 細胞における *S*-エクオールのエナンチオ選択的なインスリン分泌増強作用について

15:38 ○堀内寛子[1]，白井理絵[1]，原田直樹[1]，中野長久[2]，乾　博[3]，山地亮一[1]（[1]大阪府大・生命環境，[2]大阪女子短大，[3]大阪府大・栄養）

3F37p10　ルイボス抽出物およびその構成成分の抗糖尿病作用の解析

15:49 ○清水裕美子，鎌倉麗未，孫　銘辰，矢ヶ崎一三，三浦　豊（農工大・院・応用生命）

p11〜p15 発表者の接続時間 16:00〜16:10

3F37p11　乳児期の低栄養により誘導されるインスリン分泌能の低下に対する魚油の効果

16:10 ○都築　毅，畠山雄有，鄂　爽，山本和史，坂本有宇（東北大院農）

3F37p12　食用菊熱水中抽出物における抗糖尿病作用およびそのメカニズムの解明

16:21 ○山本純平，只石　幹，山根拓実，大石祐一，清水　誠，服部一夫（東農大応生科栄養）

3F37p13　分離緑豆タンパク質のインスリン感受性亢進作用の解析

16:32 ○木村早佑[1]，佐伯健太[1]，小林美里[1]，村井篤嗣[1]，橘　伸彦[2]，本山貴康[2]，河野光登[2]，堀尾文彦[1]（[1]名大院農，[2]不二製油・基盤研）

3F37p14　シナモン熱水抽出物による 2 型糖尿病改善効果とそのメカニズム

16:43 ○小林克也[1]，沈　燕[1]，陳静セン[1]，本間貴大[1]，山口夏澄[1]，細野　崇[1]，五十嵐喜治[2]，関泰一郎[1]（[1]日本大院生資科，[2]山形大・農）

3F37p15　ブルーベリー葉抽出物によるインスリン抵抗性改善作用

16:54 ○松山勇介[1]，早瀬川倫太郎[1]，濱田健作[1]，甲斐孝憲[2]，亀長浩蔵[2]，松浦　靖[3]，柚木崎千鶴子[3]，西山和夫[1]，山崎正夫[1]（[1]宮崎大農，[2](株)なな葉コーポレーション，[3]宮崎県食品開発センター）

p16〜p20 発表者の接続時間 17:05〜17:15

3F37p16　小麦タンパク質加水分解物による GLP-1 分泌促進機構の解明

17:15 ○加藤正樹，中西健悟，谷　翼，津田孝範（中部大応生）

3F37p17　アントシアニンによる GLP-1 分泌促進作用とその分泌経路の解明

17:26 ○谷　翼，加藤正樹，津田孝範（中部大応生）

3F37p18　人参サポニン代謝物 M1 による GLP-1 分泌促進の作用機序解析

17:37 ○野渕　翠，下条洋輔，宮崎寿次（長瀬産業(株)）

3F37p19　グァバ葉熱水抽出物が DPP-4 欠損ラットおよび 2 型糖尿病患者の血中 GLP-1 濃度に及ぼす影響

17:48 牧野久美子[1]，○吉田康人[1]，神野志ゆう[1]，中平育恵[2]，鈴木　淳[3]，郷内めぐみ[2]，倉崎康太郎[2]，浜野久美子[2]，長南　治[1]，宮崎幸司[1]（[1]ヤクルト中研，[2]関東労災病院　糖尿病･内分泌内科，[3]横浜市立大大学附属市民総合医療センター　内分泌・糖尿病内科）

3F37p20　オリゴ糖の組み合わせがビフィズス菌の増殖に与える影響の検討

17:59 ○江原達弥，津田宗哉，和泉裕久，中里友紀，岩本　洋，難波和美，武田安弘（森永乳業(株)栄養科学研究所）

F45 会場　午前の部（9:00〜11:54）

食品―食品機能・栄養－その他―

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

3F45a01　鶏足由来ヒアルロン酸産生促進物質（HA-II）の開発

9:00 ○渡部和哉，安　芝英，原田清佑，青笹正義，吉國義明，金　武祚（(株)ファーマフーズ）

3F45a02　鶏足由来ヒアルロン酸産生促進物質（HA-II）の膝軟骨に及ぼす効果

9:11 ○丸　勇史，安　芝英，原田清佑，渡部和哉，青笹正義，吉國義明，金　武祚（(株)ファーマフーズ）

3F45a03　低濃度のアルコール摂取による変形性関節症予防効果

9:22 ○柴田紗知[1]，味八木茂[2]，石飛博之[2]，萱島知子[3]，伊豆英恵[4]，藤井　力[4]，松原主典[1]（[1]広島大院教育，[2]広島大病院，

[3]佐賀大文化教育，[4]酒総研(独))

3F45a04　含硫化合物の sulforaphane, sulforaphene 及び erucin は破骨細胞融合因子の発現抑制を介して破骨細胞分化を調節する

9:33　◦高木智弘，井上博文，高橋信之，上原万里子（東農大院）

3F45a05　Equol 鏡像異性体の有効性と安全性 : *in vivo* と *in vitro* 評価系の差異

9:44　◦藤井駿吾[1]，井上博文[1]，高橋信之[1]，上野友美[2]，内山成人[2]，上原万里子[1]（[1]東農大院・農・食品栄養，[2]大塚製薬(株)・佐賀栄養製品研）

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

3F45a06　植物発酵エキス「OM-X」の筋持久力向上作用の検討

10:05　◦三宅康賀[1]，伊藤智広[2]，塚口祥太[2]，山口剛幸[2]，御手洗玲奈[2]，榎本みゆき[2]，延生聖也[2]，下宮淑恵[1]，中村由貴[1]，安藤正史[2]，塚正泰之[2]，高畑宗明[1]（[1]バイオバンク，[2]近大農）

3F45a07　E3 ユビキチンリガーゼに着目した筋萎縮予防効果を示すスパイス・ハーブの探索

10:16　◦山下貴仙[1]，山村淳貴[1]，平山善丈[3]，上野正一[2]，南　俊哉[2]，加藤久典[1]（[1]東京大学総括プロジェクト機構食と生命，[2]ハウス食品グループ本社株式会社　中央研究所，[3]ハウスウェルネスフーズ株式会社 開発研究所）

3F45a08　食用担子菌アンニンコウ（*Grifola gargal*）抽出物の筋肉細胞におけるグルコース取り込み促進作用メカニズムの解明

10:27　◦吉岡泰淳[1]，葛　丹瑶[2]，澤田圭介[2]，原田栄津子[3]，森園智浩[3]，芦田　均[2]（[1]神戸大自然科学，[2]神戸大院農，[3]株式会社岩出菌学研究所）

3F45a09　黒ショウガ由来のメトキシフラボンは骨格筋におけるタンパク質合成を促進する

10:38　◦斧伸太朗[1]，原田直樹[1]，大桑(林)浩孝[2]，藤田貴則[2]，中野長久[3]，山地亮一[1]（[1]大阪府立大院生命環境，[2]日本タブレット株式会社，[3]大阪女子短大）

3F45a10　卵白ペプチドの筋肥大へ与える影響

10:49　◦坂下真耶[1]，松原　守[2]，山下裕輔[1]，丸　勇史[1]，吉國義明[1]，金　武祚[1]（[1](株)ファーマフーズ，[2]京都学園大学・バイオ環境）

a11〜a14 発表者の接続時間 11:00〜11:10

3F45a11　β-カロテンの骨格筋量増加作用における mTOR シグナル経路の関与

11:10　◦北風智也[1]，原田直樹[1]，中野長久[2]，山地亮一[1]（[1]大阪府大院生命環境，[2]大阪女子短大）

3F45a12　特殊精米技術を用いた米の生活習慣病関連因子への影響

11:21　◦許　鳳浩[1,4]，浦田哲郎[1]，上馬塲和夫[1,3]，齋藤義憲[2]，宇住晃治[2]，鈴木信孝[4]　([1]医療法人ホスピィー 浦田クリニック，[2](株)ライフサイエンス研究所，[3]帝京平成大学　ヒューマンケア学部　東洋医学研究所，[4]金沢大学大学院　医薬保健学総合研究科　臨床研究開発 補完代替医療学講座）

3F45a13　中高年者に対する乳たんぱく質 10 g 摂取が身体栄養状態に及ぼす影響

11:32　◦川上智美[1]，宮崎桂介[1]，秋山正行[1]，牛田吉彦[1]，山内恒治[1]，冨永友也[2]，熊谷　修[3]（[1]森永乳業株式会社，[2]とみなが内科医院，[3]人間総合科学大学）

3F45a14　ビサクロン高含有秋ウコンエキスが健常成人の二日酔いに及ぼす影響

11:43　◦井出晋太郎[1]，向田直弘[1]，田岡幸一[1]，室崎伸二[1]，山本佳弘[1]，市川　寛[2]（[1]ハウスウェルネスフーズ開発研，[2]同志社大院生命医）

F45 会場　午後の部（14:00〜18:10）

食品―食品機能・栄養－その他―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

3F45p01　イメージング質量顕微鏡によるファイトケミカルの高感度分布解析

14:00　◦藤村由紀[1]，中村純也[2]，一瀬智美[1]，金　允喜[3]，佐々木雅子[2]，海野結実[4]，緒方是嗣[4]，中島宏樹[4]，立花宏文[1,3,5,6]，割石博之[1,3,5,7]，三浦大典[1]（[1]九大レドックスナビ，[2]九大院生資環，[3]九大院農院，[4]島津製作所，[5]九大バイオアーク，[6]九大食品機能デザイン，[7]九大基教）

3F45p02　ケルセチン抱合体代謝物に対する腎臓の脱抱合化反応の解析

14:11　◦向井理恵[1]，鈴木里穂[1]，田中義章[1]，嶺川祥子[1]，河合慶親[2]，寺尾純二[1]（[1]徳島大 HBS 研・食品，[2]名大院・生命農）

3F45p03　*O*-desmethylangolensin 産生菌 SY8519 株の代謝に関する研究

14:22　◦丹羽利夫[1]，横山慎一郎[2]，鈴木　徹[3]，大澤俊彦[4]（[1]尚絅学院大学総合人間，[2]岐阜県・生物工学研，[3]岐阜大・連農，[4]愛知学院大心身科学）

3F45p04　黒ショウガ（*kaempferia parviflora*）のポリメトキシフラボンにおける時計遺伝子発現調節

14:33　◦吉田　泉，熊谷百慶，小泉慶子，渡辺章夫，三嶋　隆，藤田和弘，渡井正俊（日本食品分析セ）

3F45p05　食品ポリフェノールによる世代を超えての代謝改善に関わるエピジェネティクス修飾

14:44　◦高須亮佑[1]，ホナーギエクレア[4]，近藤　隆[3]，阿部啓子[1,3]，三坂　巧[1]，白髭克彦[2]，安岡顕人[3]，岡田晋治[1]（[1]東大院農生科・応生化，[2]東京大学分子生物学研究所，[3]神奈川科学技術アカデミー，[4]東京大学 先端科学技術研究センター）

p06〜p10 発表者の接続時間 14:55〜15:05

3F45p06　グァバ葉のスキンケア化粧品素材としての機能性

15:05　◦西川規代[1]，吉金　優[2]，中島悦子[2]，樋口慶郎[2]，沢村正義[2]（[1](有)アフロディア，[2]高知大土佐 FBC）

3F45p07　ヘアレスマウスにおいてアスタキサンチンの経口摂取は UVA に誘導される皮膚光老化を抑制する

15:16　佐々木克[1]，小松俊之[1]，真鍋祐樹[1]，斎藤仁美[2]，平田　孝[1,3]，◦菅原達也[1]（[1]京大院農，[2]富士フイルム(株)，[3]四条畷学園大）

3F45p08　清酒に含まれる甘苦味物質エチル-α-D-グルコシドの味覚受容体刺激

15:27　◦中島香奈[1]，中尾暁彦[1]，木野内春香[2]，股野麻未[2]，柏木　豊[1,2]，前橋健二[1,2]（[1]東京農大院醸造，[2]東京農大醸造）

3F45p09　甘味受容体における甘味抑制物質作用モデルの構築

15:38　◦中北智哉[1]，広川貴次[2]，三坂　巧[1]（[1]東大院農生科・応生化，[2]産業技術総合研究所）

3F45p10　ヒト甘味受容体の活性を抑制するフレーバー化合物

15:49　◦野尻健介[1,2]，藤原　聡[1]，小黒大地[1]，山本直人[1]，三坂　巧[2]（[1]長谷川香料(株)，[2]東大院農生科・応生化）

p11〜p15 発表者の接続時間 16:00〜16:10

3F45p11　ハチドリにおける甘味受容能の進化

16:10　◦戸田安香[1]，Baldwin Maude[2]，中北智哉[3]，Connell Mary[4]，Klasing Kirk[5]，Edwards Scott[2]，Liberles Stephen[6]，三坂　巧[3]（[1]東大院農生科･応生化（現･キッコーマン株式会社），[2]Dept. OEB, Harvard Univ.，[3]東大院農生科・応生化，[4]Sch. Biotech. Dublin City Univ.，[5]Dept. Anim. Sci., UC Davis.，[6]Dept. Cell Biol., Harvard Med. Sch.）

3F45p12　細胞系を用いた低甘味度甘味料の評価

16:21　◦久野美菜子，鈴川　縁，三坂　巧（東大院農生科）

3F45p13　ルシフェラーゼレポーターアッセイを用いた味覚受容体評価系の構築

16:32　◦鈴川　縁，三坂　巧（東大院農生科・応生化）

3F45p14　pH 低下を伴う蛍光イメージングにおける局所 pH センサーの開発

16:43　◦三島　誠，吉本靖東，三坂　巧（東大院農生科･応生化）

3F45p15　メダカ味覚受容体の転写制御配列の取得

16:54　◦横井京子，三坂　巧，岡田晋治（東大院農生科･応生化）

p16〜p20 発表者の接続時間 17:05〜17:15

3F45p16　アスタキサンチン含有鶏卵摂取による高血圧抑制に関する研究
17:15　○原田　巧[1]，　堀内達也[2]，　望月厚哉[2]，　山里明弘[2]，近藤康博[1]，畑生俊光[1]（[1]岡山大学，[2]ケイアイ化成）

3F45p17　高血圧自然発症ラットを用いた無塩みそ風調味料の有効性の検討
17:26　○中原達雄[1]，川野隆史[2]，加藤範久[3]（[1]丸善製薬株式会社，[2]株式会社ますやみそ，[3]広島大院生物圏科学）

3F45p18　血圧降下作用を有する新規糠漬けの開発
17:37　○小田耕平[1]，永井　武[2]，上野義栄[3]，森　義治[4]（[1]京工繊，[2]日本食品分析センター，[3]京都府中小企業技術センター，[4](株)もり）

3F45p19　Processed soymilk significantly reduced blood pressure in spontaneously hypertensive rats compared to regular soymilk.
17:48　○Alauddin Md[1]，Hitoshi Shirakawa[1]，Kazuyuki Hiwatashi[2]，Atsushi Shimakage[3]，　Saori Takahashi[2]，　Mamoru Shinbo[3]，Michio Komai[1]（[1]Laboratory of Nutrition, Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University, [2]Akita Research Institute of Food and Brewing, [3]Yamada Foods Co., Ltd.）

3F45p20　茶葉タンパク質分解物の血圧降下作用
17:59　武田和哉，小林泰次，鳥田祥子，後藤慶一，○南条文雄（三井農林株式会社）

G41 会場　午前の部（9:00〜11:54）

食品―食品機能・栄養－免疫，炎症，アレルギー―

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

3G41a01　オリーブ果実に含まれるマスリン酸摂取によるロコモティブシンドローム(軽度膝関節炎)軽減効果
9:00　○福光　聡，間　和彦，栗本洋一（日本製粉中研）

3G41a02　大麦若葉末の性状の違いによる整腸作用に及ぼす影響の比較
9:11　○北村整一，佐藤　敬，上野　栞，森川琢海，友澤　寛，山口和也，高垣欣也（株式会社東洋新薬）

3G41a03　褐藻サガラメ由来フロロタンニンによる抗アレルギー性の免疫調節作用
9:22　○杉浦義正，　野元つかさ，　布施美保子，　百合野瑛子，宮田昌明（水大校 食品科学）

3G41a04　接触過敏症抑制効果に与えるザクロポリフェノール濃縮物の投与量の影響
9:33　○長野隆男[1]，烏烏日娜[1]，西田典永[2]（[1]川崎医福大臨床栄養，[2]森下仁丹）

3G41a05　マウス NK 活性低下モデルにおける各種食品成分の効果
9:44　○山澤拓実，緒里真一，守住孝輔，片山誠一，西　勝英（株式会社 LSI メディエンス　創薬支援事業本部　試験研究センター　薬理研究部）

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

3G41a06　緑茶カテキン代謝物の免疫機能調節作用
10:05　○楊　雪[1]，　金　允喜[1]，　原　彩[2]，　高垣晶子[2]，後藤慶一[2]，立花宏文[1,3]（[1]九大院農院・生機科，[2]三井農林，[3]九大食品機能デザイン）

3G41a07　自然免疫リガンドとしての EGCG 修飾アルブミン
10:16　○畑佐行紀[1]，　古橋麻衣[2]，　伊藤美香[1]，　近澤未歩[1]，柴田貴広[1]，赤川　貢[3]，田中浩士[4]，立花宏文[5]，内田浩二[1]（[1]名大院・生命農，[2]名大農，[3]大阪府大・生命環境科学，[4]東工大院・理工，[5]九州大院・農）

3G41a08　ルテオリンの炎症抑制効果に対するフラボノイド同時摂取の影響
10:27　○山下紗枝，橋本堂史，藍原祥子，水野雅史（神戸大院・農）

3G41a09　植物由来食品因子エリオジクチオールによるマウス制御性 T 細胞誘導機能の解析
10:38　○松本優樹[1]，　松田　幸[1]，　古川智宏[1]，　鈴木道生[1]，作田庄平[1]，清水　誠[1,2]，戸塚　護[1]　（[1]東大院農生科・応生化，[2]東京農大・応生・栄養）

3G41a10　フラボノイド類による制御性 B 細胞の IL-10 および IL-35 産生増強効果と形質細胞分化誘導活性との関連
10:49　○堀内準矢[1]，葉　鎮豪[1]，清水　誠[1,2]，戸塚　護[1]（[1]東大院農生科・応生化，[2]東京農大・応生・栄養）

a11〜a14 発表者の接続時間 11:00〜11:10

3G41a11　Diallyl trisulfide の LPS/D-GaIN 誘導性劇症肝炎予防効果
11:10　○日吉滉平[2]，細野　崇[1,2]，関泰一郎[1,2]　（[1]日本大生資科，[2]日本大院生資科）

3G41a12　米糠アラビノキシラン誘導体(MGN-3)のラットにおける急性アルコール性肝炎への影響
11:21　○杉田俊祐[1]，　仲村英里[1]，　朱　霞[2]，　猪狩直樹[2]，平井　静[1]，江頭祐嘉合[1]（[1]千葉大院・園芸・応生化，[2]大和薬品株式会社）

3G41a13　染毛剤および関連化合物によるマウスの炎症性皮膚炎におけるフルボ酸の抑制作用
11:32　○安蒜明成，滝口泰之（千葉工大工）

3G41a14　Modulatory effect of apple polyphenols on chemokine expression in mouse intestinal epithelial cells.
11:43　○PENG LI[1]，YASUHARU ISHIHARA[1]，TAKU IWAMOTO[1]，MAKOTO SHIMIZU[1,2]，MAMORU TOTSUKA[1]　([1]Dept. Appl. Biol. Chem., The Univ. Tokyo, [2]Dept. Nutr. Sci., Tokyo Univ. Agric.)

G41 会場　午後の部（14:00〜18:10）

食品―食品機能・栄養－免疫，炎症，アレルギー―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

3G41p01　ペクチンの炎症応答調節構造の探索
14:00　○石其慧太[1]，北口公司[1,2]，矢部富雄[1,2]（[1]岐阜大院･応生科･応用生命，[2]岐阜大・応生科・応用生命）

3G41p02　ヤマブシタケ由来エルゴステロール誘導体の LPS 誘導炎症に対する抑制作用
14:11　○森光一郎[1]，菊地晴久[2]，大島吉輝[2]，大内謙二[1]（[1]ホクト(株)，[2]東北大薬）

3G41p03　The anti-viral activities and mode of action of a herbal medicines from Salvia miltiorrhiza (Danshen) & Angelica tenuissima Nakai.
14:22　○Myun Soo KIM[1,2]，Prasanna Weeratunga[2]，Tae-Sik Yoon[2]，Byeong-Hoon Lee[2]，Ki Jong Yu[1]，Hongik Kim[1]，Jong-Soo Lee[2]（[1]R&D Division, Vitabio, [2]College of veterinary medicine, Chungnam National University）

3G41p04　Zerumbone の抗炎症作用におけるタンパク質ストレスの役割
14:33　○五十嵐洋子[1]，　大西康太[2]，　入江一浩[1]，　村上　明[1]（[1]京大院・農・食品生物，[2]名大院・生命農・応用分子生命）

3G41p05　「藤枝かおり」緑茶抽出物による抗炎症活性の実証
14:44　○中山紗由莉，服部　誠，好田　正（東農工大）

p06〜p10 発表者の接続時間 14:55〜15:05

3G41p06　イソマルトデキストリンの経口投与による IgA 産生増強作用
15:05　○櫻井岳夫，吉實知代，谷口美文，渡辺　光，福田恵温（(株)林原　研究開発本部）

3G41p07　イソマルトデキストリンの経口投与による IgE 応答および接触性皮膚炎に対する作用
15:16　○谷口美文，櫻井岳夫，吉實知代，渡辺　光，福田恵温（(株)林原 研究開発本部）

3G41p08　温州ミカン果皮配合ヨーグルトのアレルギー症状緩和効果の検討

15:27　◦安永　翔[1]，　原　裕子[2]，　白石　敦[2]，　坂根由梨[2]，鎌尾知行[2]，　竹澤由起[2]，　大橋裕一[2]，　菊池泰三[3]，　窪　千明[3]，門田　歩[4]，菅原卓也[1]（[1]愛媛大農，[2]愛媛大医眼科，[3]四国乳業(株)，[4]伊方サービス(株)）

3G41p09　菌体成分によるマスト細胞の Fc ε RI 発現抑制

15:38　◦笠倉和巳[1]，原むつ子[2]，奥村　康[2]，西山千春[1]（[1]東京理大 生物工，[2]順天堂大 医）

3G41p10　アレルギーを誘導することなく経口免疫寛容を誘導しうる食品抗原の簡便な調製法の検討

15:49　◦古田早紀[1]，服部　誠[1]，後藤真生[2]，石川(高野)祐子[2]，好田　正[1]（[1]東農工大農・応生化，[2]食総研）

p11〜p15 発表者の接続時間 16:00〜16:10

3G41p11　豆乳発酵物の制御性 T 細胞誘導機能と食物アレルギー抑制効果

16:10　◦藤田友紀[1]，　川島忠臣[1]，　渡邊要平[2]，　佐藤亜美[2]，辻　典子[2]（[1]キッコーマン株式会社，[2]産総研）

3G41p12　乳酸菌 2 本鎖 RNA による Interferon-β 産生誘導と Th1 免疫増強

16:21　◦川島忠臣[1]，　渡邊要平[2]，　碇　菜穂[1]，　福井竜太郎[3]，佐藤亜美[2]，　斉藤　隆[4]，　筒井ひろ子[5]，　三宅健介[3]，　辻　典子[3]（[1]キッコーマン株式会社，[2]産業技術総合研究所，[3]東京大学医科学研究所，[4]理化学研究所　統合生命医科学研究センター，[5]兵庫医科大学）

3G41p13　*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* JCM 5805 由来 DNA の pDC 活性化配列の解析

16:32　◦堀江　暁，藤井敏雄，大塩木乃実，冨田康之，藤原大介（キリン・基盤研）

3G41p14　*Lactobacillus paracasei* K71 の経口投与による血中 IgE レベル抑制と Th1 偏向誘導

16:43　◦三原敏敬[1]，　五十嵐晶[2]，　渡邉由梨子[2]，　佐藤佳太[3]，熊谷武久[1]，城斗志夫[3]，原　　崇[3]（[1]亀田製菓，[2]新潟大院自然科学，[3]新潟大農）

3G41p15　*Lactococcus lactis* C59 株による潜在型 TGF-β から活性型 TGF-β への変換作用

16:54　◦山田剛史[1]，　西田実紗[1]，　青木－吉田綾子[2]，　鈴木チセ[2]，清水　誠[1,3]，戸塚　護[1]（[1]東大院農生科･応生化，[2](独)農研機構･畜草研，[3]東京農大・応生・栄養）

p16〜p20 発表者の接続時間 17:05〜17:15

3G41p16　L-ヒスチジンが腸管免疫応答に及ぼす効果

17:15　◦羽多野安曇[1]，　曹　　元[1]，　内田順也[1]，　薩　秀夫[1,2]，清水　誠[1,3]，戸塚　護[1]（[1]東大院農生科・応生化，[2]前橋工科大・工，[3]東京農大・応生・栄養）

3G41p17　ヒト腸管上皮細胞株 HT-29 のインターフェロン λ 産生に及ぼすラクトフェリンの影響

17:26　◦新光一郎，織田浩嗣，若林裕之，山内恒治，阿部文明（森永乳業食基研）

3G41p18　牛乳中エクソソームの RNA 解析とヒト細胞（THP-1）への作用

17:37　◦津田宗哉[1]，　和泉裕久[1]，　佐藤洋平[1]，　小坂展慶[2]，落谷孝広[2]，岩本　洋[1]，難波和美[1]，武田安弘[1]　([1]森永乳業(株)栄養科学研究所，[2]国立がん研究センター研究所）

3G41p19　牛乳ラクトフォリンがロタウイルスゲノムの転写および複製に与える影響

17:48　◦稲垣瑞穂[1]，　大野翔平[2]，　小林純子[3]，　山田佳太[4]，高橋　毅[5]，　中込とよ子[6]，　中込　治[6]，　金丸義敬[2]，　鈴木　徹[1]（[1]岐阜大院連農，[2]岐阜大応用生物，[3]北大院医，[4]大阪大谷大薬，[5]株式会社明治，[6]長崎大院医歯薬総合）

3G41p20　形質細胞様樹状細胞における MHC class II 発現制御因子 CIITA の転写調節に対する PU.1 の役割

17:59　◦三浦亮介[1]，　笠倉和巳[1]，　中野信浩[2]，　前田隆浩[3]，八代拓也[1]，西山千春[1]（[1]東京理大・生物工，[2]順天堂大・医，[3]長崎大・医歯薬）

講演番号
開始時間　　演　　題　　発表者氏名（所属）

A32 会場　午前の部（9:00〜11:00）

微生物―物質生産－酵素，タンパク質―

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

4A32a01　耐熱性放線菌由来の新規 PET 分解酵素の分解特性
9:00　◦河合富佐子[1]，　飯嶋悠司[1]，　織田昌幸[2]，　水嶋裕樹[3]，宮川拓也[3]，田之倉優[3]（[1]京工繊大繊科セ，[2]京府大院生環科，[3]東大院農生科）

4A32a02　PET 分解酵素 Cut190 の Ca^{2+} 依存的な活性化及び耐熱化の構造基盤
9:11　◦宮川拓也[1]，　水嶋裕樹[1]，　大塚　淳[1]，　織田昌幸[2]，河合富佐子[3]，田之倉優[1]（[1]東大院・農生科，[2]京府大院・生環科，[3]京工繊大・繊科セ）

4A32a03　深海由来 *Novosphingobium* sp. MBES04 株のリグニン代謝関連酵素群の特性解析
9:22　◦佐藤玲央奈[1,2]，　大田ゆかり[2]，　西　真郎[2]，　小林樹和[2]，坪内泰志[2]，秦田勇二[1,2]　（[1]横浜市立大生命ナノ，[2]海洋研究開発機構）

4A32a04　澱粉またはショ糖を主要原料とした *Trichoderma reesei* セルラーゼの効率的生産系の構築
9:33　◦池　正和，田伏美峰，徳安　健（農研機構・食総研）

4A32a05　バイオマス工学利用へのトリコデルマリーゼイ由来キシラナーゼ遺伝子の発現検討
9:44　◦岸川昭太郎，村田武英，小幡裕一（理研バイオリソースセンター）

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

4A32a06　*Rhodovulum sulfidophilum* T7 RNA ポリメラーゼ発現株を用いた細胞外 RNA 生産系
10:05　◦長尾信義[1]，米川千夏[1]，梅影　創[1]，菊池　洋[2,3]　（[1]豊橋技大工，[2]早稲田大先進理工，[3]豊橋技大 RAC）

4A32a07　担子菌酵母における異種タンパク質分解のリン酸による制御
10:16　◦吉崎　稔[1,2]，正木和夫[1,2]（[1]広島大学，[2]独立行政法人酒類総合研究所）

4A32a08　*Coprinopsis cinerea* に存在する新規 CaMK（CoPK02）の解析
10:27　◦山下雅史，片山将一，千賀由佳子，杉山康憲，末吉紀行，亀下　勇（香川大農）

4A32a09　好熱性ファージ φ OH2 由来溶菌酵素 holin によるガン細胞のアポトーシス誘導
10:38　◦黒木未知瑠，原田額郎，マルトノヒンドラ，片倉喜範，土居克実（九大院生資環）

4A32a10　酵素固定化電極による継続的還元反応
10:49　◦櫻井伸樹[1]，　田中恵理[2]，　東条直樹[2]，　吉田健太郎[2]，小野哲也[2]，柏木良友[2]（[1]JNC 株式会社　水俣研究所，[2]奥羽大学薬学部）

A34 会場　午前の部（9:00〜12:05）

微生物―細胞－複合微生物，共生微生物，難培養性微生物―

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

4A34a01　有機質肥料活用型養液栽培に適した微量金属元素供給資材の開発
9:00　◦篠原　信[1]，　太田香菜子[2]，　藤原和樹[1]，　安藤晃規[3,4]，宮本憲二[5]，　加藤康夫[6]，　浅川　晋[7]，　小川　順[3,4,8]，　高野雅夫[2]（[1]農研機構，[2]名大院・環境，[3]京大院農・応用生命，[4]京大・生理化学，[5]慶大・理工，[6]富山県立大工・生工研セ，[7]名大院・生命農，[8]京大農・応用生命）

4A34a02　有機質肥料活用型養液栽培に有用な微生物群集における病原性細菌の解析
9:11　宇佐美晶子[1]，　藤原和樹[2]，　◦溝渕久恭[1]，　安藤晃規[1,3,4]，サイジャイサクンタラ[1]，　志村悠暉[4]，　篠原　信[2]，　宮本憲二[5]，加藤康夫[6]，浅川　晋[7]，小川　順[1,3,4]（[1]京大院農・応用生命，[2]農研機構，[3]京大・生理化学，[4]京大農・応用生命，[5]慶大・理工，[6]富山県立大工・生工研セ，[7]名大院・生命農）

4A34a03　有機質肥料活用型養液栽培における硝化菌および硝化関連遺伝子の動態解析
9:22　◦篠原　亘[1]，吉田昭介[1]，川上了史[1]，安藤晃規[2,3]，小川　順[2,3]，加藤康夫[4]，浅川　晋[5]，篠原　信[6]，宮本憲二[1]（[1]慶大理工，[2]京大院農・応用生命，[3]京大・生理化学，[4]富山県立大工・生工研セ，[5]名大院・生命農，[6]農研機構）

4A34a04　有機質肥料活用型養液栽培の改良を目的とした硝化菌の有機成分耐性の研究
9:33　◦藤原和樹[1]，　高田惟名[2]，　安藤晃規[3,4]，　宮本憲二[5]，加藤康夫[6]，　浅川　晋[7]，　小川　順[3,4,8]，　高野雅夫[2]，　篠原　信[1]（[1]農研機構，[2]名大院・環境，[3]京大院農・応用生命，[4]京大・生理化学，[5]慶大・理工，[6]富山県立大工・生工研セ，[7]名大院・生命農，[8]京大農・応用生命）

4A34a05　硝化特性が向上した微生物群集からの亜硝酸酸化菌の単離取得
9:44　◦宇佐美晶子[1]，　安藤晃規[1,2,3]，　志村悠暉[3]，　犬飼龍矢[1]，池本成美[1]，　宮本憲二[4]，　加藤康夫[5]，　浅川　晋[6]，　藤原和樹[7]，篠原　信[7]，小川　順[1,2,3]（[1]京大院農･応用生命，[2]京大･生理化学，[3]京大農・応用生命，[4]慶大・理工，[5]富山県立大工・生工研セ，[6]名大院・生命農，[7]農研機構）

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

4A34a06　Construction of a model nitrifying bacteria community for organic hydroponics
10:05　◦Sakuntala SAIJAI[1], Akinori Ando[1,2,3], Hisanori Mizobuchi[1], Shoko Usami[1], Yuki Shimura[2], Kenji Miyamoto[4], Yasuo Kato[5], Susumu Asakawa[6], Makoto Shinohara[7], Jun Ogawa[1,2,3]（[1]Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]Dep. Appl. Life. Sci., Fac. Agric., Kyoto Univ., [3]Res. Unit Physiol. Chem. Kyoto Univ., [4]Dept. Biosci. Inform., Keio Univ., [5]Biotech. Res. Cent., Toyama Pref. Univ., [6]Gead. Sch. Bioagric., Nagoya Univ., [7]NARO）

4A34a07　水素資化性メタン生成菌の凝集性低下変異株を用いた凝集メカニズムの解析
10:16　◦澄川佳奈[1]，　松谷峰之介[2]，　木本光明[3]，　有働公一[3]，高坂智之[2]，山田　守[1,2]（[1]山口大院医，[2]山口大農，[3]山口大研究推進機構）

4A34a08　水素資化性メタン生成菌の凝集性が水素生成菌の共生的水素生成に与える影響
10:27　◦高坂智之[1]，　馬屋原範聡[2]，　澄川加奈[2]，　山田　守[1,2]（[1]山口大農，[2]山口大院医）

4A34a09　木質分解性メタン発酵系確立のための有用菌群の単離同定
10:38　◦白鳥初美[1]，　大川桃世[1]，　榊田達哉[1]，　石井　匡[2]，高野英晃[1]，上田賢志[1]（[1]日大生物資科，[2]アゴラ造園株式会社）

4A34a10　地下高温環境における導電性鉱物を介した電子移動に基づく共生的メタン生成の可能性
10:49　◦和田　薫[1]，　加藤創一郎[1,2,3]，　浅野行蔵[1]，　鎌形洋一[1,2]（[1]北大院・農，[2]産総研・生物プロセス，[3]東大・先端研）

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

4A34a11　微生物の付着現象に基づく複合微生物の分離手法の検討
11:10　◦松尾朋昇，大西章博，藤本尚志，鈴木昌治（東農大院･農）

4A34a12　腸管内プトレッシンは腸内細菌の異なる環境適応を介して高生産される
11:21　◦北田雄祐[1]，村松幸治[1]，栗原　新[2]，松本光晴[1]（[1]協同乳

業・技術開発，[2]石川県大・生資環）

4A34a13　高脂肪食摂取がラット盲腸内容物の胆汁酸分泌および菌叢変化に与える影響

11:32　○渡辺真通[1]，　萩尾真人[2]，　藤田祐己[1]，　李　慈英[1]，馬場菜那子[1]，　小椋義俊[3,4]，　林　哲也[3,4]，　清水英寿[1]，　石塚,敏[1]，吹谷　智[1]，横田　篤[1]（[1]北大院農，[2]東洋大生命科学，[3]宮崎大医，[4]宮崎大フロンティア）

4A34a14　カメムシと細菌による協力的な農薬分解

11:43　○佐藤由也[1]，　小池英明[2]，　竹下和貴[2]，　柳澤真紀[1]，NAVARRO Ronald[1]，伊藤英臣[2]，堀　知行[1]，菊池義智[2]（[1]産総研 環境管理，[2]産総研 生物プロセス）

4A34a15　エゾノギシギシを摂食する Gastrophysa 属ハムシ腸内フローラの地域的差異

11:54　○大坪和香子[1]，　宮城敦子[2]，　小島紀幸[3]，　川合真紀[2]，内宮博文[4]，宮内啓介[1,5]，遠藤銀朗[1,5]（[1]東北学院大学工学総合研究所，[2]埼玉大学大学院理工学研究科，[3]東北学院中学高等学校，[4]埼玉大学環境科学研究センター，[5]東北学院大学工学部）

A34 会場　午後の部（14:00〜17:05）

微生物―細胞－複合微生物，共生微生物，難培養性微生物―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

4A34p01　混合バイオフィルム中でのプラスミドの挙動

14:00　○李昇ウク[1]，　水口(鈴木)千穂[1]，　清川達則[2]，　野村暢彦[2]，岡田憲典[1]，野尻秀昭[1]（[1]東大生物工学セ，[2]筑波大院生命環境）

4A34p02　三菌株混合培養系における代謝変化と遺伝子発現制御

14:11　○鈴木研志[1]，　犬塚友麻[1]，　ファティマアズワニ[2]，田代陽介[1]，二又裕之[1]（[1]静岡大院工，[2]Putra Malaysia univ.）

4A34p03　共培養が与える *Methylobacterium* sp. 121 株への影響

14:22　○若林　佑[1]，清水　哲[2]，中村　顕[2]，伊藤政博[1]（[1]東洋大学大学院・生命科学研究科，[2]筑波大学・生命環境科系）

4A34p04　ミヤコグサ根粒菌 *Mesorhizobium loti* による共生時特異的なジベレリンの生合成

14:33　○立上陽平[1,2]，　南部真実[1]，　森坂裕信[1,3]，　黒田浩一[1]，植田充美[1,3]（[1]京大院農・応用生命，[2]日本学術振興会特別研究員(DC1)，[3]京都バイオ計測センター）

4A34p05　外生菌根菌の生育に対するフラボノイド類の効果-2

14:44　○加瀬谷泰介，足立亜衣（(公財)東洋食品研究所）

p06〜p10 発表者の接続時間 14:55〜15:05

4A34p06　Autoinducer-2 inactivation by outer membrane porin in periodontopathogenic bacterium *Eikenella corrodens*

15:05　○Fariha Jasin MANSUR[1]，　Natsumi MORISHIGE[1]，Yuichiro NOIRI[2]，Hiroyuki AZAKAMI[1]（[1]Yamaguchi Univ.，[2]Osaka Univ.）

4A34p07　大腸菌における脂肪酸供給不全とコロニー形成能の関係

15:16　○納庄一樹，三井智玄，小川哲弘，日高真誠，正木春彦（東大院農）

4A34p08　VBNC 化を緩和する遺伝子の解析

15:27　○西尾優宏，高丸玲子，小川哲弘，日高真誠，正木春彦（東大院農生科・応生工）

4A34p09　大腸菌の VBNC 化を緩和する 2 つの遺伝子の共働効果

15:38　○福嶋凡子，高丸玲子，西尾優宏，小川哲弘，日高真誠，正木春彦（東京大農）

4A34p10　酵母への接着に関与する *Lactobacillus plantarum* ML11-11 細胞表層タンパク質の解析

15:49　○平山　悟，古川壮一，荻原　淳，安井雅人，森永　康（日大院・生資科）

p11〜p15 発表者の接続時間 16:00〜16:10

4A34p11　酵母と酵母接着性乳酸菌の共生関係

16:10　○牧　大剛，古川壮一，森永　康（日大院・生資科）

4A34p12　*Leuconostoc citreum* と *Saccharomyces cerevisiae* の共培養におけるバイオフィルム形成機構

16:21　○山岸明日香，　平山　悟，　古川ソウイチ，　荻原博和，森永　康（日大院・生資科）

4A34p13　耐塩性酵母と乳酸菌のバイオフィルム形成に関する研究

16:32　○佐藤有紗，古川壮一，森永　康（日大院・生資科）

4A34p14　*Acetobacter pasteurianus*, *Lactobacillus plantarum* および *Saccharomyces cerevisiae* の 3 菌種複合培養による酢酸発酵

16:43　○東垂水彩乃，増田裕明，古川壮一，森永　康（日大院・生資科）

4A34p15　伝統的パン種の発酵機構に関する研究

16:54　○山本暁久[1]，　平山　悟[1]，　藤本章人[2]，　伊藤円香[2]，伊藤惠介[2]，藤田善樹[2]，井藤隆之[2]，森永　康[1]，古川壮一[1]（[1]日大院・生資科，[2]MC フードスペシャリティーズ）

B21 会場　午前の部（9:00〜12:05）

微生物―細胞－栄養，生育，増殖―

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

4B21a01　金属腐食に及ぼす環境微生物の影響評価(1)鉄粒を用いた腐食性細菌の探索

9:00　○長岡　亨，平野伸一，松本伯夫（電中研）

4B21a02　金属腐食に及ぼす環境微生物の影響評価(2) 電気化学的手法を用いた腐食微生物の選択的集積とその解析

9:11　○平野伸一，長岡　亨，松本伯夫（電中研）

4B21a03　金属腐食に及ぼす環境微生物の影響評価(3)集積培養菌群による炭素鋼試験片の腐食試験

9:22　○松本伯夫，平野伸一，長岡　亨（電中研）

4B21a04　プラスミド RP4 保持に伴う負荷に関与する転写単位の発見

9:33　○杉山大介[1]，水口(鈴木)千穂[1]，高橋裕里香[2]，岡田憲典[1]，野尻秀昭[1]（[1]東大生セ，[2]富山県大生工科・生工研セ）

4B21a05　LysR 型転写制御因子 MexT がプラスミド負荷を引き起こす分子機構の解析

9:44　○久保　彩，　水口(鈴木)千穂，　能登　優，　岡田憲典，野尻秀昭（東大・生物工学セ）

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

4B21a06　大腸菌におけるフラビン還元酵素による鉄貯蔵タンパク質からの二価鉄放出反応

10:05　佐藤純一[1]，　中元翔太[1]，　○石井達也[1]，　武田晃治[2]，吉村悦郎[3]，　中川純一[4]，　阿部　晃[5]，　木俣真弥[1]，　川崎信治[1]，新村洋一[1]（[1]東農大応生科・バイオ，[2]東農大・教職，[3]東大院農生科・応生科，[4]東農大生物産業・食香，[5]札幌医大医・眼科）

4B21a07　*Amphibacillus xylanus* における遊離フラビンが関与する好気代謝と，微生物界における遊離フラビンの分布(第 2 報)

10:16　木俣真弥[1]，　富塚　駿[1]，　○名須川哲哉[1]，　望月大地[1]，藤田信之[2]，　阿部　晃[3]，　中川純一[4]，　佐藤純一[1]，　川崎信治[1]，新村洋一[1]（[1]東農大応生科･バイオ，[2]NITE，[3]札幌医大医･眼科，[4]東農大生物生産・食香）

4B21a08　グルコース添加による *Lactobacillus brevis* の沈降作用について

10:27　○齋藤勝一，中村敏英（(独)農研機構・食総研）

4B21a09　鉄呼吸微生物による不溶性鉄酸化物の還元とフミン酸の影響

10:38　○水沼　環，斉木　博，鈴木義規（東京工科大学）

4B21a10　ベチバー抽出物の枯草菌のストレス応答機構に与える影響の解析

10:49　○小澤良基[1]，　今泉　優[1]，　吉川博文[2]，　長谷川登志夫[1]，朝井　計[1]（[1]埼玉大学院理工，[2]東京農大応生科）

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

4B21a11　ビフィズス菌の O_2感受性に関与する原因酵素に関する研究
11:10　○大形篤史，加藤史朗，國分雪絵，木村優介，新村洋一，川崎信治（東農大バイオ）

4B21a12　*N*-アセチルスクロサミンの腸内細菌による資化性
11:21　○篠崎佑子[1]，　萩原未来[2]，　平野貴子[2]，　袴田　航[1,2]，西尾俊幸[1,2]（[1]日大院生資科・生物資源利用，[2]日大生資科・生命化）

4B21a13　*Lactobacillus delbrueckii* のイヌリン型フルクタン資化機構の解析
11:32　○辻川勇治[1,2]，大澤　朗[1]（[1]神戸大農，[2]日本農芸化学）

4B21a14　高脂肪食における難消化性オリゴ糖 DFAIII の投与による 腸内細菌叢への影響
11:43　○鳳　諒介，石上純佳，北川　航，曾根輝雄，鎌形洋一，浅野行蔵（北大農）

4B21a15　エタノール存在下での真性ホモ火落ち菌 *Lactobacillus homohiochii* の菌体脂肪酸組成変化
11:54　○徳井美里，浅井拓也，山下伸雄，明石貴裕（白鶴酒造・研究）

B21 会場　午後の部（14:00〜17:05）

微生物―細胞－栄養，生育，増殖―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

4B21p01　好アルカリ性細菌 *Bacillus pseudofirmous* OF4 株由来の機能未同定 Small Protein, BpOF4 _01690 の機能解析
14:00　○高橋哲亮，伊藤政弘（東洋大生命）

4B21p02　*Streptomyces* 属放線菌が産生する菌体外ジアホラーゼの解析
14:11　老沼研一[1]，　進藤大騎[2]，　高野英晃[2]，　高谷直樹[1]，○上田賢志[2]（[1]筑波大生命環境，[2]日大生資科）

4B21p03　*Rhodococcus* 属細菌の有機溶媒耐性における *groEL2* の影響
14:22　○岩淵範之，瀧原速仁，砂入道夫（日大生資科応生科）

4B21p04　絶対嫌気性菌 *Clostridium* 属細菌の O_2 代謝機構に関する研究
14:33　○工藤貴靖，岡田拓也，井山朗典，大矢浩士，岡田沙季，新村洋一，川崎信治（東農大バイオ）

4B21p05　*Pseudomonas aeruginosa* における Psl 非依存的バイオフィルム形成
14:44　○森　栄揮，石井正治，新井博之（東大院農生科・応生工）

p06〜p10 発表者の接続時間 14:55〜15:05

4B21p06　大腸菌の拡散チャネル OmpC は高塩濃度下で透過性が上昇する
15:05　○児島征司[1,2]，Nikaido Hiroshi[2]（[1]東北大院生命，[2]カリフォルニア大学バークレー校）

4B21p07　出芽酵母 Δ *zds1* 株の Ca^{2+}感受性を抑圧する多コピーサプレッサーの寿命への影響
15:16　○上野史記，小山哲也，久米一規，水沼正樹（広島大院）

4B21p08　出芽酵母の *SSG1* 長寿変異株における寿命制御機構の解析
15:27　○小川貴史[1]，　椿山諒平[1]，　金井宗良[2]，　藤井　力[2]，家藤治幸[2]，宮川都吉[1]，平田　大[1]，水沼正樹[1]（[1]広島大院・先端研・分子生命，[2]酒類総合研究所）

4B21p09　出芽酵母の寿命制御に関わるメチル基転移酵素の探索
15:38　○橋本沙也加，小川貴史，久米一規，水沼正樹（広島大院・先端研・分子生命）

4B21p10　出芽酵母の高浸透圧シグナルによる寿命制御機構の解析
15:49　○米北久美子，小山哲也，久米一規，水沼正樹（広島大院・先端研・分子生命）

p11〜p15 発表者の接続時間 16:00〜16:10

4B21p11　出芽酵母における染色体からのセントロメア DNA の切り出し誘導時に出現する生存細胞の解析
16:10　○松崎浩明，宮本昭弘，柳本敏彰，秦野琢之　（福山大生命工）

4B21p12　分裂酵母の細胞溶解を引き起こす外的要因
16:21　○櫛間満咲，西野耕平，松尾安浩，川向　誠（島根大院生物資源）

4B21p13　分裂酵母のアミノ酸取り込みにおける適応現象を制御する内因性物質の同定
16:32　○孫　暁穎[1,2]，　八代田陽子[1]，　植木雅志[3]，　廣田　洋[3]，高橋秀和[4]，長田裕之[3]，浜本牧子[2]，吉田　稔[1]（[1]理研・化学遺伝学，[2]明治大院・農，[3]理研・抗生物質，[4]山口大院・医）

4B21p14　麹菌 *Aspergillus oryzae* 実用株の細胞融合能および不和合性の解析
16:43　○岡部知弥[1]，　塚崎和佳子[1]，　金　鋒杰[1]，　岩下和裕[2]，藤井郁雄[3]，丸山潤一[1]，北本勝ひこ[1]（[1]東大院・農生科・応生工，[2]酒総研，[3]阪府大院・理）

4B21p15　麹菌 *Aspergillus oryzae* における有性生殖関連遺伝子の高発現による子嚢胞子形成の促進
16:54　○田中勇気，金　鋒杰，丸山潤一，北本勝ひこ（東大院・農生科・応生工）

C31 会場　午前の部（9:00〜12:05）

環境―バイオマス，バイオマス変換，バイオ燃料，バイオ化成品―

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

4C31a01　パン酵母とトルラ酵母を用いた微生物燃料電池の検討
9:00　○東　雅之，後山元洋，立花太郎（大阪市立大学工）

4C31a02　蓄電性ナノ物質を生成する嫌気性複合微生物系の解析
9:11　○久保田博子[1]，　鈴木　渓[2]，　餅原弘樹[1]，　細川拓也[1]，千葉悠介[1]，由井嵐士[3]，田代陽介[1]，二又裕之[1]（[1]静大院工，[2]静大創造院，[3]静大工）

4C31a03　微生物により生成される蓄電性ナノ物質の物質科学的解析
9:22　○由井嵐士[1]，　久保田博子[2]，　餅原弘樹[2]，　鈴木　渓[3]，細川拓也[2]，田代陽介[2]，小暮敏博[4]，二又裕之[2]（[1]静大・工，[2]静大院・工，[3]静大院・自然科学系教育部，[4]東大院・理学系研究所）

4C31a04　偏性嫌気性細菌 *Megasphaera elsdenii* の水素発酵機構に関する研究
9:33　○村山　蘭，大西章博，藤本尚志，鈴木昌治（東農大院・農）

4C31a05　バイオガス生産への消化汚泥分解微生物の利用可能性
9:44　○佐藤颯音，藤井克彦（山口大院農）

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

4C31a06　放射性物質汚染バイオマス減容化プロセスを目指したバイオマス前処理技術と UASB メタン発酵システムの開発
10:05　○木村光平[1]，　原川洋明[1]，　大塚祐一郎[2]，　中村雅哉[2]，新谷政己[1]，金原和秀[1]（[1]静岡大工，[2]森林総研）

4C31a07　高温可溶化メタン発酵に関する新規好熱性細菌 KK2012 − 0012 株の研究
10:16　○薬師寺佑佳[1]，　中島琢自[2]，　甲斐穂高[5]，　中道隆弘[6]，松本厚子[3,4]，高橋洋子[3,4]，石橋康弘[1]（[1]熊本県大院環境，[2]北里大感染制御研究機構，[3]北里大生命研，[4]北里大院感染制御科学府，[5]鈴鹿高専生物応用，[6]長崎総科大情報学）

4C31a08　鶏糞のメタン発酵における珪藻土焼結体添加の細菌解析
10:27　○根本大輔，大貫　純，滝口泰之（千葉工大工）

4C31a09　Effects of feed solid content and alkalinity on biogas production from mango peel waste using a plug flow reactor
10:38　Phongphun WATTANAKANKITIKUL[1]，Worakrit SUVAJITTANONT[2]，　Chureerat PUTTANLEK[3]，

Dudsadee UTTAPAP[4], ○Vilai RUNGSARDTHONG[1] ([1]Department of Agro-Industrial, Food and Environmental Technology, Faculty of Applied Science, King Mongkut's University of Technology North Bangkok, [2]Biochemical Engineering and Pilot Plant Research and Development Unit (BEC), National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), King Mongkut's University of Technology Thonburi, [3]Department of Biotechnology, Faculty of Engineering and Industrial Technology, Silapakorn University, [4]Division of Biochemical Technology, School of Bioresources and Technology, King Mongkut's University of Technology Thonburi)

4C31a10　土壌中における堆肥および有機資材の無機化

10:49 ○向　真樹, Adhikari Dinesh, 荒木希和子, 久保　幹（立命館大学）

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

4C31a11　ワックスエステル生産に関わる緑藻ユーグレナの RNA-Seq 解析

11:10 ○冨山拓矢[1], 吉田勇太[2], 丸田隆典[1], 澤　嘉弘[1], 荒川和晴[2], 石川孝博[1,3] ([1]島根大・生物資源・生命工, [2]慶応大・先端生命, [3]JST/CREST)

4C31a12　ラン藻 FBP/SBPase 遺伝子導入によるユーグレナのバイオ燃料生産性の向上

11:21 ○木村彩子[1,2], 小川貴央[1,2], 作山治美[1,2], 丸田隆典[2,3], 鈴木健吾[2,4], 石川孝博[2,3], 田茂井政宏[1,2], 重岡　成[1,2] ([1]近畿大・農・バイオ, [2]JST, CREST, [3]島根大・生資科・生命工, [4](株)ユーグレナ)

4C31a13　ラパマイシンが *Euglena gracilis* の脂質生産に与える影響

11:32 ○向田志保, 有田正規（国立遺伝学研究所）

4C31a14　ユーグレナ 3-ケトアシル CoA チオラーゼ発現抑制によるワックスエステル生産の制御

11:43 ○中澤昌美[1,2], 小山啓一郎[1], 安藤博子[1,2], 渡辺　嘉[4], 中井猛夫[4], 上田光宏[1], 阪本龍司[1], 乾　博[3], 中野長久[5], 宮武和孝[6] ([1]阪府大生命, [2]JST さきがけ, [3]阪府大総リハ, [4]阪市工研, [5]大阪女子短大, [6]帝塚山学院大)

4C31a15　バイオディーゼル燃料生産に利用可能な微細藻類の単離とその増殖最適化に関する研究

11:54 ○高　未麗[1], 新居由莉[1], 岡本早紀[1], 松村吉信[1,2] ([1]関西大・生命生物工, [2]関西大・ORDIST)

C22 会場　午前の部（9:00〜11:54）

酵素―核酸代謝関連酵素，脂質代謝関連酵素―

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

4C22a01　ヒト RNase P タンパク質 Pop5 と Rpp30 の古細菌相当タンパク質の機能

9:00 ○杷山紘輔, 濱崎真人, 中島　崇, 角田佳充, 木村　誠（九大院生資環）

4C22a02　リボヌクレアーゼ PRNA の Rpp21-Rpp29 結合部位に関する研究

9:11 ○泉　健太[1], 江　丹[2], 上田敏史[2], 中島　崇[1,2,3], 角田佳充[1,2,3], 木村　誠[1,2,3] ([1]九大農, [2]九大院　システム生命, [3]九大院農)

4C22a03　超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* RNase P 構成タンパク質の構造と活性

9:22 ○末松光太郎, 上田敏史, 垣内洋介, 中島　崇, 角田佳充, 木村　誠（九大院生資環）

4C22a04　シロイヌナズナ前駆体 tRNA プロセシング酵素・PRORP の結晶構造に関する研究

9:33 ○前田　卓, 今井崇喜, 中島　崇, 角田佳充, 木村　誠（九大院生資環）

4C22a05　超好熱性アーキア RNase P タンパク質の遺伝子診断への応用に関する研究

9:44 ○宮ノ下充, 中島　崇, 角田佳充, 木村　誠（九大院生資環）

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

4C22a06　超好熱性アーキア由来ミスマッチ特異的エンドヌクレアーゼ

10:05 ○織田宗一郎[1], 西　祐紀[1], 石野園子[1], 山上　健[1], 上森隆司[2], 相良武宏[2], 石野良純[1] ([1]九大院・農, [2]タカラバイオ)

4C22a07　中度好塩性および非好塩性 *Shewanella* 属細菌由来の膜結合 5'- ヌクレオチダーゼの耐塩性の違い

10:16 ○栗林貴明[1], 藤井創太郎[2], 政成美沙[2], 三本木至宏[2], 為我井秀行[3], 山中　優[4], 若井　暁[5] ([1]広島大・生物生産, [2]広島大院・生物圏, [3]日本大・文理, [4]奈良先端大・物質, [5]神戸大院・自然科学)

4C22a08　放線菌由来の新規 nucleoside hydrolase の機能解析と核酸医薬生産プロセスへの応用開発

10:27 ○光川侑輝[1], 日比　慎[2], 松谷成裕[1], 堀之内伸行[1], 高橋里美[2], 小川　順[1] ([1]京大院・農・応用生命, [2]京大院・農・産業微生物)

4C22a09　5-メチルシトシンの脱アミノにより生成する T/G ミスマッチ修復酵素の配列特異性

10:38 大内優彦[1], 渡辺文昭[2], ○喜多恵子[1] ([1]京大院農, [2]三菱レイヨン)

4C22a10　*Thermus thermophilus* 由来アデニンホスホリボシルトランスフェラーゼホモログの構造・機能解析

10:49 ○富田武郎, 西山　真（東大生物工学セ）

a11〜a14 発表者の接続時間 11:00〜11:10

4C22a11　*Chlorella kessleri* 由来新規ガラクトリパーゼの精製とその特性解析

11:10 ○藤内恒有[1], 羽城周平[2], 安枝　寿[2], 杉森大助[1] ([1]福島大・理工, [2]味の素・イノベ研)

4C22a12　*Chlorella* 由来新規ガラクトリパーゼの遺伝子取得とその応用

11:21 ○羽城周平[1], 藤内恒有[2], 杉森大助[2], 安枝　寿[1] ([1]味の素・イノベ研, [2]福島大・理工)

4C22a13　組換え大腸菌を用いた *Candida antarctica* lipase B の菌体外分泌発現系の構築

11:32 ○氏家彩奈, 中野秀雄, 岩崎雄吾（名大農）

4C22a14　カイコで発現させたヒトアセチル CoA カルボキシラーゼ 1 の解析

11:43 牧島　悠[1], ○加藤竜也[1,2,3], パクサンジョウ[4], タージックアンドレ[4], 朴　龍洙[1,2,3] ([1]静大農・応生化, [2]静大・創科技院, [3]静大・グリーン研, [4]メイヨクリニック)

C22 会場　午後の部（14:11〜16:43）

酵素―その他―

p02〜p05 発表者の接続時間 14:01〜14:11

4C22p02　MMLV 逆転写酵素の RNase H ドメインの調製と性状解析

14:11 ○西村耕作[1], 横川貫太[1], 深津浩佑[2], 久世郁実[2], 久好哲郎[1], 小西　篤[1], 三上文三[1], 兒島憲二[1], 保川　清[1] ([1]京大院・農, [2]京大・農)

4C22p03　RNase H 触媒部位から離れた部位へのアミノ酸変異による MMLV 逆転写酵素の耐熱化と RNase H 活性の消失

14:22 ○久好哲郎[1], 小西　篤[1], 横川貫太[1], Barrioluengo Veronica[2], Menendez-Arias Luis[2], 保川　清[1] ([1]京大院・農, [2]Centro de Biologiacute Molecular "Severo Ochoa")

4C22p04　ヘリカーゼを用いた高感度核酸検出技術の開発

14:33 ○藤原綾子[1], 横山高広[2], 保川　清[2], 藤原伸介[1] ([1]関西学院大院理工, [2]京都大院農)

**4C22p05　封入体を形成する酵素のランダム変異による活性型酵

素としての発現
14:44 ○松井大亮[1,2]，浅野泰久[1,2]　（[1]富山県大工・生工研セ，[2]JST ERATO）

p06〜p10 発表者の接続時間 14:55〜15:05

4C22p06　回転磁場を用いた酵素・磁性粒子複合体の活性の促進
15:05 ○平田圭亮，水木　徹，立原直人，長岡　豊，森本久雄，前川　透（東洋大）
4C22p07　*Streptomyces griseoloalbus* SN-22 株由来エラスターゼ様酵素遺伝子のクローニングと発現
15:16 ○浴野圭輔[1]，尾山　廣[2]，岡　拓二[1]，野村善幸[1]，新　隆志[1]（[1]崇城大　応微工，[2]摂南大学　理工　生命科学）
4C22p08　微生物による第 4 級アンモニウム化合物の分解（第 14 報）：γ-ブチロベタイニル CoA 合成酵素遺伝子のクローニングとリコンビナント酵素の諸性質検討
15:27 ○藤光洋志[1]，田窪沙也加[2]，松本　彬[2]，有馬二朗[2]，森　信寛[2]（[1]鳥取大院連農，[2]鳥取大農）
4C22p09　希少糖生産酵素 *Pseudomonas cichorii* 由来 D-タガトース 3-エピメラーゼの変異酵素を用いた糖アルコールおよびデオキシ希少糖との複合体構造解析
15:38 ○吉田裕美[1]，吉原明秀[2]，石井知彦[3]，何森　健[2]，神鳥成弘[1]（[1]香川大・総合生命研究セ，[2]香川大・希少糖研究セ，[3]香川大・工学部）
4C22p10　ニトリル合成酵素の多機能性
15:49 ○山田優駿，橋本義輝，熊野匠人，小林達彦　（筑波大院生命環境）

p11〜p13 発表者の接続時間 16:00〜16:10

4C22p11　フタル酸モノエステル加水分解酵素と基質カルボキシル基の相互作用
16:10 ○西山　孝[1]，岩田眞人[1,2]，美馬健作[1]，春口康輔[1]，藤井隆夫[1]（[1]崇城大・応生命，[2]アイエムビー株式会社）
4C22p12　ビタミン K の新規代謝経路としての硫酸化
16:21 ○武安智樹[1]，黒木勝久[1]，榊原陽一[1]，Liu Ming-Cheh[2]，水光正仁[1]（[1]宮崎大院農，[2]トレド大薬）
4C22p13　ナメコ由来チロシナーゼ活性化に関与する金属プロテアーゼ
16:32 ○犬塚竜馬[1]，寺岡　佑[1]，小原涼太[2]，野田文雄[2]，小西康子[1]（[1]石川県大，[2]株式会社スギヨ）

E32 会場　午前の部（9:00〜12:05）

酵素―糖質代謝関連酵素―

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

4E32a01　変異型ガラクトキナーゼによる糖 1 リン酸の調製
9:00 ○西本　完，北岡本光（農研機構　食品総合研究所）
4E32a02　ビフィズス菌由来 *N*-アセチルヘキソサミン 1-キナーゼのオリゴ糖合成を目指した機能改変
9:11 ○佐藤真与[1]，荒川孝俊[1]，西本　完[2]，北岡本光[2]，伏信進矢[1]（[1]東大・院農，[2]農研機構・食総研）
4E32a03　Sd[a] 抗原を分解するビフィズス菌由来のバイファンクショナル酵素
9:22 ○芦田　久[1]，鈴木里奈[2]（[1]近畿大・生物理工，[2]京大院・生命科学）
4E32a04　石川県の伝統食品から単離された乳酸菌由来 GH ファミリー 1 に属する酵素の性質決定
9:33 ○本多裕司，坂田　優，片山高嶺，熊谷英彦，小柳　喬（石川県大 生資環）
4E32a05　マルトトリオース生成アミラーゼを用いたマルトトリオシル配糖体の合成
9:44 ○松岡智里[1]，掃部正浩[1]，西村重徳[1]，谷　修治[1]，炭谷順一[1]，多田俊治[2]，川口剛司[1]（[1]阪府大院・生環科，[2]阪府大院・理）

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

4E32a06　澱粉様貯蔵多糖を蓄積するシアノバクテリア由来枝作り酵素の構造解析と機能改変
10:05 ○鈴木龍一郎，林　真里，藤田直子，鈴木英治（秋田県大生物資源）
4E32a07　澱粉を基質とする環状イソマルトオリゴ糖生産に重要な酵素の解析
10:16 ○一ノ瀬仁美[1,2]，鈴木龍一郎[3]，木村啓太郎[1]，齋藤勝一[1]，荒木紀美[4]，小林幹彦[4]，藤本　瑞[5]，木村淳夫[6]，舟根和美[1]（[1]農研機構食総研，[2]信州大農，[3]秋田県立大生物資源，[4]実践女子大生活科学，[5]農生資研，[6]北大院農）
4E32a08　澱粉を原料とした環状イソマルトオリゴ糖・メガロ糖の酵素生産と分離精製
10:27 ○舟根和美[1]，一ノ瀬仁美[1,2]，鈴木龍一郎[3]，木村啓太郎[1]，齋藤勝一[1]，荒木紀美[4]，小林幹彦[4]，藤本　瑞[5]，石塚　敏[6]，木村淳夫[6]（[1]農研機構　食総研，[2]信州大　農学，[3]秋田県立大　生物資源，[4]実践女子大　生活科学，[5]農生資研，[6]北大院農）
4E32a09　嫌気性細菌 *Clostridium paraputrificum* のファミリー 18 キチナーゼ遺伝子の解析
10:38 西村仁宏[1]，大島健志朗[2]，服部正平[2]，粟冠真紀子[1]，○木村哲哉[1]，粟冠和郎[1]（[1]三重大院生資，[2]東大院新領域）
4E32a10　*Listeria* 由来チナーゼの機能解析
10:49 ○本田翔太郎，菅原康里，小山文隆，坂口政吉　（工学院大工）

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

4E32a11　GH19 キチナーゼとしては異常に高い分子量をもつ *Aeromonas* キチナーゼの構造と機能
11:10 ○河本大毅[1]，西平知世[2]，大沼貴之[2]，上田光宏[3]，深溝　慶[2]（[1]近畿大農，[2]近畿大院・農，[3]阪府大院生環科・応生科）
4E32a12　ガジュマル（*Ficus microcarpa*）乳液由来キチナーゼ-B の抗真菌活性におけるキチン結合ドメインの役割
11:21 ○花城清俊，平安名一，伊藤　進，平良東紀（琉大農）
4E32a13　植物由来ファミリー GH19 キチナーゼのループ構造の多様性と機能に関する研究
11:32 ○高島智也[1]，北奥喜仁[1]，梅本尚之[1]，大沼貴之[1]，平良東紀[2]，深溝　慶[1]（[1]近畿大農，[2]琉球大農）
4E32a14　*Serratia marcescens* 2170 のキチン分解利用機構の解析：ChiD, Ctb の発現系構築と CBP21 欠損株の構築
11:43 ○今井裕也[1]，五十嵐瑞礎[1]，三浦拓馬[1]，桜井大地[1]，杉本華幸[1,2]，鈴木一史[1,2]，渡邉剛志[1,2]（[1]新潟大院・自然科，[2]新潟大農・応生化）
4E32a15　LysM ドメインの構造と機能：Receptor 型 LysM と Carbohydrate-Binding Module 型 LysM との比較
11:54 ○北奥喜仁[1]，平良東紀[2]，沼田倫征[3]，深溝　慶[1]，大沼貴之[1]（[1]近大院・農，[2]琉大・亜熱生資，[3]産総研・バイオメディカル）

E23 会場　午前の部（9:00〜11:54）

有機―天然物－単離構造決定－微生物―

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

4E23a01　細菌のヒスチジンキナーゼの Hbox を標的とする新規抗生物質 waldiomycin
9:00 ○犬飼洋一[1]，江口陽子[1]，清水莉子[1]，岡島俊英[2]，梅北まや[3]，五十嵐雅之[3]，内海龍太郎[1]（[1]近畿大院・農・バイオ，[2]阪大・産研，[3]微化研）
4E23a02　Waldiomycin と大腸菌ヒスチジンキナーゼ EnvZ の DHp ドメイン間の相互作用
9:11 ○清水莉子[1]，江口陽子[1]，犬飼洋一[1]，栃尾尚哉[2]，木川隆則[3]，岡島俊英[4]，新家粧子[1]，深溝　慶[1]，梅北まや[5]，五十嵐雅之[5]，内海龍太郎[1]（[1]近畿大・院・農，[2]広島大学，[3]理研，

[4]大阪大学，[5]微化研）

4E23a03　ナラ枯れ被害木より分離した糸状菌 TT-12 株の生産する物質について

9:22　◦塩野義人，高野智也，村山哲也，小関卓也，小山浩正（山形大農）

4E23a04　新規 *epi*-cochlioquinone 誘導体とその生合成前駆体の単離と構造

9:33　◦荒山美紀[1]，田中和明[1]，前多隼人[1]，根平達夫[2]，橋本　勝[1]（[1]弘前大農，[2]広島大院総合）

4E23a05　phomolide C の相対及び絶対配置の決定

9:44　◦伊藤　厚[1]，殿内暁男[2]，前多隼人[2]，橋本　勝[2]（[1]岩手大連合農，[2]弘前大農）

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

4E23a06　新規ジュリマイシン類縁化合物の化学構造と生物活性

10:05　◦菰田俊一[1]，佐伯奈央子[1]，小関良卓[2]　（[1]宮城大食産業，[2]東北大院）

4E23a07　Akaemycin, a new macrolide isolated from marine Streptomyces

10:16　◦Tao Zhou[1]，Seizo Sato[2]，Hisayuki Komaki[3]，Yasuhiro Igarashi[1]（[1]Toyama Prefectural University，[2]Nippon Suisan K. K.，[3]NBRC）

4E23a08　放線菌 *Planomonospora sphaerica* から得られた抗菌ペプチドの単離と構造決定

10:27　◦小谷真也[1]，井上雄斗[1]，逸見　光[2]，亀山眞由美[2]（[1]静岡大農，[2]農研機構）

4E23a09　糸状性硫黄酸化細菌 *Thiothrix fructosivorans* 由来のマイクロチューブ形成多糖の構造決定

10:38　◦河崎雄太[1]，成塚理絵[1]，遠藤智友樹[1]，稲田　敦[1]，近藤敬子[2]，片平正人[2]，武田　穣[1]（[1]横国大院・工，[2]京大・エネルギー理工研）

4E23a10　未開拓薬物資源タテヤママリモからの新規抗生物質の探索

10:49　◦架田貴美[1]，奥　直也[1]，朴木英治[2]，五十嵐康弘[1]（[1]富山県大・生工・生工研セ，[2]富山市科学博物館）

a11〜a14 発表者の接続時間 11:00〜11:10

4E23a11　希少食用ラン藻スイゼンジノリ由来新規 sacrolide 類縁体の発見

11:10　◦端紗也加[1]，松本　京[1]，奥　直也[1]，丹生慶次郎[2]，五十嵐康弘[1]（[1]富山県大生工・生工研セ，[2]水前寺のり本舗　丹誠堂）

4E23a12　クロイソカイメンに共生する微生物の純化および二次代謝産物の構造研究

11:21　◦岡田華弥，長由扶子，山下まり，此木敬一（東北大院農）

4E23a13　*Aspergillus ustus* 由来新規イソキノリンアルカロイド

11:32　◦齊藤太樹，仁戸田照彦，神崎　浩（岡山大院・環境生命）

4E23a14　*β-N*-acetylglucosaminidase 阻害物質 TMG-chitotriomycin の新規類縁体の単離，構造解析

11:43　◦淺尾昂平，神崎　浩，仁戸田照彦（岡山大院・環境生命）

D23 会場　午前の部（9:00〜12:05）

植物―遺伝子ー構造解析，ゲノム，遺伝，変異，遺伝子ー機能，発現制御―

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

4D23a01　ヘテロ接合性喪失による無性生殖するカンキツの遺伝的分化

9:00　◦永野幸生[1]，PENJOR Tshering[2]，三村高史[2]，松本亮司[2]，山本雅史[3]（[1]佐賀大総合分析セ，[2]佐賀大農，[3]鹿児島大農）

4D23a02　シロイヌナズナにおける IAN family 遺伝子の分子生物学的および形態学的解析

9:11　◦久場　遥[1]，上野可南子[1]，塩田真友[2]，玉栄空輝[1]，藤山加奈子[1]，田代　淳[1]，市原直巳[1]，高坂智之[2]，内海俊彦[1,2]，山田　守[1,2]（[1]山口大学大学院　医学系研究科　応用分子生命科学系専攻，[2]山口大学大学　農学部　生物機能科学科）

4D23a03　チューリップの花弁特異的 *TgMYB1* プロモーターにおけるシスエレメントの同定と花色改変への応用

9:22　◦荘司和明（富山県農総技セ・農研）

4D23a04　イネのサクラネチン生合成酵素遺伝子 *OsNOMT* の転写を制御する因子の探索

9:33　◦小川哲史[1]，宮本皓司[2]，山根久和[2]，野尻秀昭[1]，岡田憲典[1]（[1]東大・生物工学セ，[2]帝京大・バイオ）

4D23a05　イネのジテルペン型ファイトアレキシン生産に関与する bZIP 型転写因子 OsTGAP1 の根における機能

9:44　◦吉田悠里[1]，宮本皓司[2]，山根久和[2]，野尻秀昭[1]，岡田憲典[1]（[1]東大・生物工学セ，[2]帝京大・バイオ）

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

4D23a06　一酸化窒素による AtNAS1 遺伝子の発現調節機構の解析

10:05　◦打田拓也，小原達矢，矢野俊介，土井萌子，宇野知秀，金丸研吾，山形裕士（神大院農・生機科）

4D23a07　青色光/UV-A シグナルによるダイズ ELIP 遺伝子の転写調節機構

10:16　◦北條昭弘[1]，桑本　知[1]，岸本光菜[2]，宇野知秀[1]，金丸研吾[1]，山形裕士[1]（[1]神大院農・生機科，[2]神大農・生機科）

4D23a08　ククミシン遺伝子の果実特異的発現機構　－転写因子と形質転換トマトにおける発現の解析－

10:27　◦岡田　香[1]，河野美貴[1]，古川温子[1]，家藤愛梨[2]，宇野知秀[1]，金丸研吾[1]，山形裕士[1]（[1]神戸大院農，[2]神戸大農）

4D23a09　小麦粒登熟過程における PDI 発現量解析

10:38　◦徳本　脩[1]，野口治子[3]，野口智弘[2]，高野克己[3]（[1]東京農大院農・農化，[2]東京農大応生・食加技セ，[3]東京農大応生・化学）

4D23a10　Important roles of stress-responsive NAC transcription factors SNAC-A in leaf senescence.

10:49　◦Hironori TAKASAKI[1]，Kyonoshin Maruyama[2]，Miki Fujita[1]，Takuya Yoshida[3]，Kazuo Nakashima[2]，Fumiyoshi Myouga[1]，Kiminori Toyooka[1]，Fuminori Takahashi[1]，Kazuko Yamaguchi-Shinozaki[3]，Kazuo Shinozaki[1]（[1]RIKEN Center for Sustainable Resource Science，[2]Japan International Research Center for Agricultural Sciences（JIRCAS），[3]Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo）

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

4D23a11　シロイヌナズナ VTC2 遺伝子破壊株の機能解析

11:10　◦竹内　崇[1]，丸田隆典[1]，吉村和也[2]，澤　嘉弘[1]，重岡　成[3]，石川孝博[1]（[1]島根大・生物資源・生命工，[2]中部大・応生・食栄，[3]近畿大・農・バイオ）

4D23a12　シロイヌナズナのアスコルビン酸生合成調節因子 VTC2 の機能解析

11:21　◦種子田隼人[1]，丸田隆典[1]，吉村和也[2]，澤　嘉弘[1]，重岡　成[3]，石川孝博[1]（[1]島根大・生物資源・生命工，[2]中部大・応生・食栄，[3]近畿大・農・バイオ）

4D23a13　ヒメツリガネゴケにおけるアスコルビン酸生合成主要経路の検証

11:32　◦袖山　翼[1]，丸田隆典[1]，澤　嘉弘[1]，重岡　成[2]，石川孝博[1]（[1]島根大・生物資源・生命工，[2]近畿大・農・バイオ）

4D23a14　トマトのアスコルビン酸生合成におけるガラクツロン酸レダクターゼの発現機構と生理機能

11:43　◦末川麻里奈，藤川愉吉，江坂宗春（広島大院生物圏）

4D23a15　オオムギ由来酸化ヌクレオチド加水分解 Nudix hydrolase（HvNUDX12）の構造と機能解析

11:54　◦田中小百合[1]，木原　誠[2]，杉本　学[1]（[1]岡山大学・植物研，[2]サッポロビール・バイオ研究開発部）

D23 会場　午後の部（14:00〜16:00）

植物―遺伝子ー機能，発現制御，その他―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

4D23p01　シロイヌナズナ F_1雑種での non-coding RNA による劣性遺伝子の発現制御
14:00　○志村卓哉[1]，中川原真澄[2]，鈴木　穣[3]，矢野健太郎[4]，高山誠司[5]，柴　博史[2]（[1]茨大・理，[2]筑波大・生命環境系，[3]東大・新領域，[4]明大・農，[5]奈良先端大・バイオサイエンス）
4D23p02　シロイヌナズナの種内雑種（F_1 雑種）で観察される雑種強勢に関与するノンコーディング RNA の探索
14:11　○垰野　裕[1]，中川原真澄[2]，鈴木　穣[3]，矢野健太郎[4]，高山誠司[5]，柴　博史[2]（[1]茨大・理，[2]筑波大・生命環境系，[3]東大・新領域，[4]明大・農，[5]奈良先端大・バイオサイエンス）
4D23p03　短鎖 RNA による高等植物スプライシングへの干渉作用
14:22　○中川原咲恵，申　美來，児玉浩明（千葉大学）
4D23p04　ポティウイルス感染性 cDNA クローンの転写産物の 3' 末端構造の推定
14:33　○木村貴志[1]，瀧尾　進[2]，齋藤　彰[1]（[1]農研機構・九沖農研，[2]熊本大・沿岸域セ）
4D23p05　アピオス塊茎由来ポリガラクツロナーゼインヒビター（PGIP）の分離精製，性質と cDNA クローニング
14:44　○劉　　佳，米倉政実，上妻由章（茨城大院農）

p06〜p10 発表者の接続時間 14:55〜15:05

4D23p06　リンゴ果実が生産するプロシアニジン重合体の生合成研究
15:05　○小山愛美[1]，常盤野哲生[1]，川井　悟[2]，吉澤結子[1]（[1]秋田県立大院生資科，[2]東京電機大理工）
4D23p07　NMR メタボリックプロファイリングを利用した農作物の特性解析
15:16　○冨田　理[1]，池田成志[2]，津田昌吾[2]，染谷信孝[2]，浅野賢治[2]，小野裕嗣[1]，菊地　淳[3,4,5]，関山恭代[1,3]（[1]農研機構・食総研，[2]農研機構・北農研，[3]理研 PSC，[4]横市大院・生命ナノ，[5]名大院・生命農）
4D23p08　Variation in antioxidant capacity and antioxidant composition of seri (Oenanthe javanica) grown over multiple seasons in different regions in Japan
15:27　○Rosaly MANAOIS[1], Tomoyuki OKI[2], Manabu WAKAGI[1], Yuko TAKANO-ISHIKAWA[1], Jun WATANABE[1]（[1]National Food Research Institute, NARO, [2]Kyushu Okinawa Agricultural Research Center, NARO）
4D23p09　青汁専用大麦若葉「むぎおう」の栄養成分および乳酸菌増殖能に関する研究
15:38　○神谷智康，鍔田仁人，青木幸久，永瀧達大，山口五太郎（株式会社大地の力研究所）
4D23p10　農耕地土壌におけるミネラル成分と微生物数の関係
15:49　○中辻貴広，樋口空生，向　真樹，ADHIKARI Dinesh，荒木希和子，久保　幹（立命館大）

F11 会場　午前の部（9:00〜12:05）

動物―無脊椎動物ー生理，細胞，遺伝子，タンパク質―

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

4F11a01　ラッパウニ毒素タンパク質 Contractin A の cDNA クローニングと大腸菌による発現
9:00　○畠山智充[1]，東絵梨花[1]，海野英昭[1]，郷田秀一郎[1]，中川秀幸[2]（[1]長崎大院工，[2]徳島大院 SAS 研究部）
4F11a02　トランスクリプトームから予想される超深海性ヨコエビの視覚の可能性
9:11　○小林英城[1]，針山孝彦[2]，高見英人[1]，荒井　渉[1]，高久康春[2]，山濱由美[2]，外山美奈[2]（[1]海洋機構，[2]浜松医大医）
4F11a03　ミズクラゲの刺激性化合物による麻酔効果と TRPM チャネル関与の可能性
9:22　○稲垣英利[1]，久保　泰[1]，山本俊政[2]，大塚隆尚[2]（[1]産総研バイオメディカル，[2]岡山理大工）
4F11a04　ミズクラゲ幼生に対する変態誘導物質 indomethacin の構造活性相関
9:33　○国吉久人[1]，黒田理絵[1]，辻田菜摘[1]，中谷みなみ[1]，小路　淳[1]，荒川賢治[2]（[1]広島大院・生物圏，[2]広島大院・先端研）
4F11a05　ミズクラゲ幼生の変態に伴って発現上昇する遺伝子の解析
9:44　○辻田菜摘[1]，桑原宏行[1]，今井つかさ[1]，矢中規之[1]，小路　淳[1]，荒川賢治[2]，国吉久人[1]（[1]広島大院・生物圏，[2]広島大院・先端研）

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

4F11a06　RNA-sequencing 解析によるフタホシコオロギ *Gryllus bimaculatus* の脳神経系ペプチドの同定
10:05　○永田晋治[1]，塚本悠介[1]，鈴木　穣[2]（[1]東大院・新領域・先端生命，[2]東大院・新領域・メディカル情報）
4F11a07　フタホシコオロギ *Gryllus bimaculatus* におけるアラトスタチン B タイプによる摂食行動の制御機構の解明
10:16　○塚本悠介，永田晋治（東大院・新領域・先端生命科学）
4F11a08　フタホシコオロギ *Gryllus bimaculatus* における自然免疫に関わる転写因子 dorsal の同定
10:27　○伊藤尚子，永田晋治（東大院・新領域・先端生命科学）
4F11a09　フタホシコオロギ *Gryllus bimaculatus* の脂肪酸不飽和化酵素 Δ 9-および Δ 12-desaturase の発現変動解析
10:38　○福村圭介[1]，小沼貴裕[2]，永田晋治[1]（[1]東大院・新領域・先端生命科学，[2]東大院・農生科・応生化）
4F11a10　昆虫前胸腺刺激ホルモンのレセプター Torso はジスルフィド結合を介して二量化している
10:49　○此上祥史，楊　易文，荻原麻理，引場樹里，片岡宏誌，齋藤一樹（東大院・新領域・先端生命）

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

4F11a11　ボンビコール産生メカニズムにおけるリパーゼの活性化機構
11:10　○大西　敦[1,2]，松本正吾[2]（[1]帝京平成大薬，[2]理研分子昆虫）
4F11a12　アブラムシ口針に存在する構造タンパク質の探索
11:21　○大中悠斗[1]，深尾陽一朗[2]，青木　考[1]（[1]大阪府大，[2]奈良先端大）
4F11a13　線虫 *C. elegans* における新たなインスリン様シグナル制御機構
11:32　○河野　強[1]，松永洋平[1,3]，本田陽子[2]，本田修二[2]，岩崎　崇[1]，門田裕志[3]，Benian Guy[3]（[1]鳥取大院・連農，[2]都・健康長寿医療センター，[3]エモリー大・病理）
4F11a14　サツマイモネコブセンチュウの忌避/誘引物質
11:43　○井藤恭仁子，中島清実，岩崎　崇，一柳　剛，河野　強（鳥取大院・農・生命資源科学）
4F11a15　クマムシにおける乾燥耐性獲得時の遺伝子発現変動解析
11:54　○近藤小雪[1]，加藤由起[2]，白髭克彦[2]，久保健雄[1]，國枝武和[1]（[1]東大・院理・生物科学，[2]東大・分生研）

F26 会場　午前の部（9:11〜11:54）

食品―食品化学ーその他―

a02〜a05 発表者の接続時間 9:01〜9:11

4F26a02　配糖体 Leptosperin の免疫化学的検出によるマヌカ蜂蜜の認証評価
9:11　○加藤陽二[1]，荒木裕佳子[1]，重里真希[1]，藤中里衣[1]，石坂朱里[1]，北元憲利[1]，新田陽子[2]，丹羽利夫[3]，瀧本陽介[4]（[1]兵庫県大環境人間，[2]岡山県大保健福祉，[3]尚絅学院大健康栄養，

[4](株)ヘルスケアシステムズ）

4F26a03　ショウガオールによる β-グルクロニダーゼ活性の阻害

9:22　紀岡怜奈[1]，大場輝子[2]，遠藤栄一[2]，◦橋本　啓[1]（[1]宇都宮大農，[2]遠藤食品）

4F26a04　ペパーミントに含有されるリファンピシン処理 HepG2 細胞における CYP3A4 mRNA 誘導阻害物質の研究

9:33　◦小林　司，名取李花，南葉美穂，煙山紀子，菅谷紘一，小野瀬淳一，阿部尚樹（東農大・応生科）

4F26a05　醤油中 hTRPV1 活性化成分の単離および味修飾作用の評価

9:44　◦押田麻由[1]，松浦靖典[1]，茂木喜信[1]，渡辺達夫[2]（[1]ヤマサ醤油，[2]静岡県立大学食品栄養科学部）

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

4F26a06　ピロロキノリンキノンによる AGEs 形成抑制作用の解析

10:05　◦大関菖平，大塚　曜，早瀬文孝，渡辺寛人（明治大農）

4F26a07　β3 アドレナリン受容体に作用する抗肥満食品成分の探索に向けた高感度スクリーニング系の構築

10:16　◦太田広人，大野秀美，森村　茂，新留琢郎（熊本大院・自然科学）

4F26a08　ソバスプラウト乳酸発酵物に含まれる血管拡張物質

10:27　◦中村浩蔵[1]，石田竜也[1]，野尻恵資[1]，小山正浩[1]，猪狩直樹[2]（[1]信州大農，[2]大和薬品）

4F26a09　ソバスプラウト乳酸発酵物に含まれる新規コリンエステルの探索

10:38　◦興津　翔[1]，山崎　遼[1]，森田恵梨[1]，石田竜也[1]，小山正浩[1]，猪狩直樹[2]，中村浩蔵[1]（[1]信州大農，[2]大和薬品）

4F26a10　食品中コリン化合物の同時定量法の開発

10:49　◦森田恵梨[1]，三輪優莉絵[1]，興津　翔[1]，小山正浩[1]，猪狩直樹[2]，中村浩蔵[1]（[1]信州大農，[2]大和薬品）

a11〜a14 発表者の接続時間 11:00〜11:10

4F26a11　ソラマメスプラウトのポリフェノール成分

11:10　◦奥村小春[1]，細谷孝博[1]，河原崎海[2]，熊澤茂則[1]（[1]静岡県大・食栄，[2]エコプロ・リサーチ）

4F26a12　ブドウ球菌エンテロトキシン A 遺伝子伝播の作用機序およびポリフェノール成分によるその制御機構の解明

11:21　◦尾崎順哉，島村裕子，柴田昌治，増田修一　（静岡県立大学）

4F26a13　アピオスの茎部におけるイソフラボン

11:32　◦奈良一寛[1]，小笠原康雄[2]（[1]東京家政学院大，[2]青森県庁）

4F26a14　苦味受容体 TAS2Rs を用いた太田ポンカン果皮に含まれる苦味成分の探索

11:43　◦黒田侑希，池田りこ，山崎豊実，中村俊之，宇田一成，若林敬二，渡辺達夫（静岡県大院薬食）

F26 会場　午後の部（14:00〜16:00）

食品―食品化学－その他―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

4F26p01　ウメ`露茜'果肉のフェノール性化合物の解析

14:00　◦堀西朝子[1]，雪本　亮[2]，谷　佳樹[1]，森　一[3]，岸田邦博[2]，尾崎嘉彦[2]（[1]近畿大･生物理工，[2]近畿大院･生物理工，[3]和歌山県工技セ）

4F26p02　茶製品中のカテキン重合生成物に関する化学的研究(第一報)

14:11　◦寺本世生，稲田　葵，松尾洋介，齋藤義紀，田中　隆（長崎大薬）

4F26p03　NMR を用いた多変量解析による紅茶のプロファイリング

14:22　◦細谷孝博，吉田周平，熊澤茂則（静岡県大・食栄）

4F26p04　ビタミン類によるアマドリ化合物の分解作用

14:33　◦酒井伸崇[1]，臼井照幸[1,2]，渡辺寛人[1]，早瀬文孝[1]（[1]明治大農，[2]女子栄養大栄養）

4F26p05　寒締めホウレンソウの良食味に関する呈味性と成分研究

14:44　◦山田伽奈子[1]，大澤真理[1]，富永直樹[2]，六角啓一[2]，森光康次郎[1]（[1]お茶大院・食物，[2]タキイ種苗・研究農場）

p06〜p10 発表者の接続時間 14:55〜15:05

4F26p06　新潟県産エノキタケ「雪ぼうし 3 号」の加熱調理による旨味成分の増加要因の解明

15:05　◦宮本晶子[1]，池田裕一[2]，御所窪誠[3]，古澤睦月[3]，五百崎淳[1]，原　崇[1]，城斗志夫[1]（[1]新潟大学農，[2]新潟県森林研究所，[3]新潟大院自然科学）

4F26p07　茹でエダマメのメタボローム解析

15:16　◦清水康貴[1]，佐々木亮介[2]，及川　彰[1,2]（[1]山形大農，[2]理研 CSRS）

4F26p08　新精米法による新たな機能性米の創出とその機能成分の可視化

15:27　◦財満信宏[1]，郡　俊之[1]，森山達哉[1]，川西孝彦[2]，寺下隆夫[3]，白坂憲章[1]（[1]近畿大学農，[2]幸南食糧株式会社，[3]日本米飯管理士協会）

4F26p09　泡盛油が泡盛酒質に及ぼす影響

15:38　◦新垣壱馬[1]，宮澤　舞[2]，玉城康智[1]（[1]沖縄高専，[2]三洋化成工業株式会社）

4F26p10　タイの伝統的発酵米麹カノムチンの物性における発酵工程の影響

15:49　◦吉橋　忠[1]，サトマリープラジョンウェート[2]，スロジャナメタクンビパ[2]（[1]国際農研，[2]カセサート大食品研）

F37 会場　午前の部（9:11〜10:49）

食品―食品機能・栄養－タンパク質・アミノ酸代謝―

a02〜a05 発表者の接続時間 9:01〜9:11

4F37a02　「新規酸性乳飲料」は乳たんぱく質の吸収が速い

9:11　◦東誠一郎，北出晶美，高杉　諭，圷　美穂，野間晃幸，山地健人，伊藤裕之（(株)明治　研究本部　食機能科学研）

4F37a03　「新規酸性乳飲料」は運動後の骨格筋合成を速やかに促進する

9:22　◦中山恭佑，神田　淳，三本木千秋，池上秀二，伊藤裕之（(株)明治　研究本部　食機能科学研）

4F37a04　乳たんぱく質強化乳飲料の継続摂取が男子大学生長距離ランナーのコンディションならびに運動パフォーマンスに及ぼす影響

9:33　◦小田宗宏[1]，大西一政[2]，柳楽明佳[2]，山田成臣[2]，長田昌士[2]，山地健人[2]，伊藤裕之[2]，鈴木公一[1]，川島一明[1]（[1]日大･生物資源，[2](株)明治・食機能科学研）

4F37a05　乳たんぱく質強化乳飲料摂取によるスポーツ愛好家の HR-QOL 改善効果

9:44　◦大西一政[1]，柳樂明佳[1]，山田成臣[1]，長田昌士[1]，山地健人[1]，伊藤裕之[1]，川島一明[2]，鈴木公一[2]，小田宗宏[2]（[1](株)明治・食機能科学研，[2]日大・生物資源）

a06〜a09 発表者の接続時間 9:55〜10:05

4F37a06　スケトウダラタンパク質の骨格筋重量増加効果－性差，飼料条件および飼育条件の影響－

10:05　◦岸田太郎[1]，原　由真[1]，澤井真梨子[1]，速水耕介[2]，横井香里[2]，川端二功[2]，辻　智子[2]，魚住圭佑[1]，安井万智[1]，水重貴文[1]（[1]愛媛大農，[2]日本水産(株)生活機能研）

4F37a07　酒粕の体を温める効果

10:16　◦村上直之，入江元子，大浦　新，堤　浩子，秦　洋二（月桂冠総研）

4F37a08　キノコに存在する D-アミノ酸の同定と定量

10:27　◦余　卓尓[1]，吉野一晴[2]，渡邉　彰[2]，伊藤智和[1]，邊見　久[1]，麻田恭彦[2]，吉村　徹[1]（[1]名大院生命農，[2]香川大農）

4F37a09　HepG2 細胞においてロイシン欠乏に応答する miRNA

の探索とその応答機序解析
10:38 ○山村淳貴，加藤久典 （東京大学総括プロジェクト機構食と生命）

F37 会場 午後の部（14:00〜16:00）

食品―食品機能・栄養－ビタミン，ミネラル―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

4F37p01 鉄欠乏時では活性酸素シグナルセンサーとオートファジーを活性化することで細胞内恒常性を維持する
14:00 ○井上博文[1]，勝間田真一[2]，高橋信之[1]，上原万里子[1]（[1]東京農大・健康，[2]東京農大・栄養）
4F37p02 実験的大腸炎及びそれに伴う腎肥大発症における血中ミネラルの関与
14:11 ○常木生也，清水英寿，岩谷一史，原 博，石塚 敏（北大院農・応生科）
4F37p03 成長期の潜在的亜鉛欠乏がラットのオレキシン分泌に及ぼす影響
14:22 ○後藤知子，小松裕介，住友将洋，真柳佑希，白川 仁，駒井三千夫（東北大院農）
4F37p04 Menaquinone-4 and geranylgeraniol regulates testosterone production testis-derived tumor I-10 cells
14:33 ○Hsin-Jung Ho，Hitoshi Shirakawa，Risa Yoshida，Misato Maeda，Tomoko Goto，Michio Komai（Tohoku Univ.）
4F37p05 ビオチンがテストステロン産生に及ぼす影響とその作用機序の解析
14:44 ○前田美里，白川 仁，桂井朋子，駒井三千夫 （東北大院農）

p06〜p10 発表者の接続時間 14:55〜15:05

4F37p06 all-*trans*-レチナールによる網膜色素上皮細胞の細胞死誘導機構の解析とピリドキサミンによる保護効果の検証
15:05 ○井出涼子[1]，甲斐建次[2]，須山享三[3]，赤川 貢[2]（[1]大阪府大・生命環境，[2]大阪府大院・生命環境，[3]東北大院・医学）
4F37p07 マクロファージ分化におけるビタミン D の影響
15:16 ○安藤 恵，湊健一郎，小原章裕（名城大院農）
4F37p08 DGK α 欠損マウスにおける糖尿病性腎症に対するビタミン E の効果
15:27 ○林 大輝[1]，八木敬子[2]，上田修司[1]，山之上稔[1]，江本憲昭[2]，斎藤尚亮[3]，白井康仁[1]（[1]神戸大院・農・生命機能，[2]神戸薬大・臨床薬学，[3]神戸大・バイオ研）
4F37p09 ビタミン B_{12} 欠乏線虫（*Caenorhabditis elegans*）のアミノ酸及びポリアミン代謝異常について
15:38 ○美藤友博，藪田行哲，河野 強，渡邉文雄（鳥取大院連合農学）
4F37p10 リンゴ果汁によるアスコルビン酸の血中保持効果と排泄への影響
15:49 ○井澤弘美（青森県立保健大学）

F45 会場 午前の部（9:22〜11:54）

食品―食品機能・栄養－癌―

a03〜a05 発表者の接続時間 9:12〜9:22

4F45a03 発酵米糠抽出物のヒト急性 T 細胞性白血病株に対するデスレセプター経路によるアポトーシス誘導作用
9:22 ○堀江裕紀子[1]，伊藤麻里[1]，根本英幸[1]，小坂弘明[1]，村井 毅[2]，池川繁男[3]（[1](株)コーケン，[2]北海道医療大学，[3](株)玄米酵素）
4F45a04 マンゴスチン（*Garcinia mangostana*）から単離したキサントン類の DNA 合成酵素阻害活性と抗がん作用について
9:33 ○小野寺威文[1,2,3]，坂本裕香[1]，竹仲由希子[4]，神前祥子[4]，棚橋孝雄[4]，水品善之[1,2]（[1]神戸学院大・栄養，[2]神戸学院大・LSC，[3]神戸学院大・薬，[4]神戸薬科大）
4F45a05 トコトリエノールの抗癌作用に対するフェルラ酸の相乗効果
9:44 ○永塚貴弘[1]，舘脇直人[1]，西田浩志[1]，仲川清隆[2]，宮澤陽夫[2,3]（[1]新潟薬大・応用生命，[2]東北大院農・機能分子解析学，[3]東北大学未来科学技術共同研究センター）

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

4F45a06 酵母スクリーニング系を用いた benzyl isothiocyanate のがん予防機構解明
10:05 ○安部奈緒美[1,2]，國末成美[1]，宗正晋太郎[1]，村田芳行[1]，佐藤あやの[3]，守屋央朗[4]，中村宜督[1]（[1]岡山大院・環境生命，[2]学振特別研究員，[3]岡山大院・自然科学，[4]岡山大・異分野コア）
4F45a07 *Crithmum maritimum* 抽出物のメラニン合成促進作用
10:16 ○畑岡薫乃[1]，VILLAREAL Myra[2,3]，礒田博子[2,3]（[1]筑波大生命環境，[2]筑波大生命環境系，[3]筑波大北アフリカ研究センター）
4F45a08 酵素消化低分子化フコイダン抽出物によるガン細胞の細胞表面糖鎖構造変化の誘導
10:27 ○林 寛大[1]，片山貴博[1]，杉本昌紀[2]，江藤 博[3]，白畑實隆[1,2,4]，照屋輝一郎[1,2,4]（[1]九大院シス生，[2]九大院生資環，[3]第一産業，[4]九大院農院）
4F45a09 酵素消化低分子化フコイダン抽出物と抗ガン剤との併用による抗腫瘍作用増強効果の評価
10:38 ○加治佐真吾[1]，後藤梨々子[2]，江藤 博[3]，吉田年宏[4]，白畑實隆[1,2,5]，照屋輝一郎[1,2,5]（[1]九大院生資環，[2]九大院シス生，[3]第一産業(株)，[4]吉田医院，[5]九大院農院）
4F45a10 酵素消化低分子化フコイダン抽出物とナタ豆抽出物との併用による抗腫瘍作用増強効果
10:49 ○宮本菜摘[1]，山本諭司[2]，江藤 博[3]，白畑實隆[1,2,4]，照屋輝一郎[1,2,4]（[1]九大院生資環，[2]九大院シス生，[3]第一産業(株)，[4]九大院農院）

a11〜a14 発表者の接続時間 11:00〜11:10

4F45a11 1-デオキシノジリマイシンは大腸がんを予防する
11:10 ○鄂 爽[1]，木村俊之[2]，都築 毅[1]（[1]東北大院農，[2]農研機構）
4F45a12 スフィンゴミエリンによる肝癌細胞死誘導とその機構解析
11:21 ○山田佳奈，高宮奈津子，三浦 豊（東京農工大学・大学院・応用生命化学）
4F45a13 原子状水素によるガン細胞死誘導機構の解析
11:32 ○黒田敦子[1]，中島麻美[2]，金城智也[3]，濱崎武記[3]，樺山 繁[4]，照屋輝一郎[1,2,3]，白畑實隆[1,2,3]（[1]九大院生資環，[2]九大院シス生，[3]九大院農院，[4]日本トリム）
4F45a14 原子状水素を利用した抗がん治療法の開発を目的とした検討
11:43 ○中島麻美[1]，黒田敦子[2]，金城智也[3]，濱崎武記[3]，樺山 繁[4]，照屋輝一郎[1,2,3]，白畑實隆[1,2,3]（[1]九大院シス生，[2]九大院生資環，[3]九大院農院，[4]日本トリム）

F45 会場 午後の部（14:11〜16:54）

食品―食品機能・栄養－神経，内分泌―

p02〜p05 発表者の接続時間 14:01〜14:11

4F45p02 米胚乳タンパク質の血清尿酸値低下効果（第 2 報）
14:11 ○近藤葉月[1]，樋口裕樹[1]，藤井幹夫[1]，丸山健太郎[1]，北原祐樹[2]，山本哲郎[2]，齋藤次郎[3]，近藤澄夫[4]，門脇基二[5]，細島康宏[6]，斎藤亮彦[6]（[1]亀田製菓(株)，[2](株)TTC，[3]メディカルステーションクリニック，[4]医療法人健昌会福島健康管理センター，[5]新潟大・農，[6]新潟大・医）
4F45p03 リジンとオルニチンは消化管運動を促進するが，逆にアルギニンは抑制する

14:22 ○中戸絢也[1]，ホーイーイン[1]，金子賢太朗[1]，水重貴文[1,2]，金本龍平[1]，大日向耕作[1]（[1]京大農，[2]京大学際融合教育研究推進センター・生理化学研究ユニット）

4F45p04　難吸収性ポリフェノールの消化管における認識機構 1.―知覚神経除去モデルラット脊髄後根神経節の遺伝子発現解析―

14:33 ○渡辺尚貴[1]，安岡顕人[2]，稲川広大[1]，神尾直哉[1]，江部力彦[1]，鈴木拓真[1]，阿部啓子[3]，越阪部奈緒美[1]（[1]芝工大システム理工，[2]公益財団法人神奈川科学技術アカデミー（KAST），[3]東大院農学生科）

4F45p05　食用菊抽出物の神経栄養因子様作用

14:44 ○若生　豊（八戸工大）

p06～p10 発表者の接続時間 14:55～15:05

4F45p06　AgRP 神経由来の神経ペプチドが脂質・糖質食の選択に与える影響

15:05 ○傅　欧，成川真隆，三坂　巧，中島健一朗（東大院農生科・応生化）

4F45p07　離乳期ラットの摂食変化が脳幹カテコールアミンニューロンの活動に及ぼす影響

15:16 ○宮田　徹，須山勝光，白木裕夏，石井由実恵（玉川大農）

4F45p08　フェルラ酸のアミロイド前駆体タンパク質分解に対する作用の二相性

15:27 ○木野内忠稔[1]，北波利雄[2]，藤井紀子[1]（[1]京大原子炉実験所，[2]社会福祉法人きたば会）

4F45p09　2 型糖尿病併発型アルツハイマーモデルマウスにおけるカルノシンの認知記憶障害に対する予防・改善作用

15:38 ○金子　順，芝原　恵，木村康太，エルクラーノブルーノ，久恒辰博（東京大学）

4F45p10　高機能ジペプチドを摂取した中高齢者の拡散 MRI 解析を介した脳老化予防に関する研究

15:49 ○貴田潤平[1]，金子　順[1]，今林悦子[2]，松田博史[2]，久恒辰博[1]（[1]東京大学，[2]国立精神・神経医療研究センター）

p11～p14 発表者の接続時間 16:00～16:10

4F45p11　Tg2576 マウスにおけるロスマリン酸による脳内 A β 凝集抑制効果のトランスクリプトーム解析

16:10 ○宍戸　駿[1]，豊田　集[1]，濱口　毅[2]，篠原もえ子[2]，小野賢二郎[2]，山田正仁[2]，阿部啓子[1,3]，小林彰子[1]（[1]東大院農，[2]金沢大医，[3]神奈川科学技術アカデミー）

4F45p12　MKP-1 発現調節を介したロズマリン酸の抗うつ薬様効果

16:21 ○近藤真司[1]，HAN Junkyu[2,3]，礒田博子[2,3]（[1]筑波大院生命環境，[2]筑波大院生命環境系，[3]筑波大北アフリカ研究センター）

4F45p13　大豆由来の情動調節ペプチド 1－大豆タンパク質酵素消化物の抗うつ薬様作用

16:32 ○森　薫葉[1]，山本あかね[1]，金本龍平[1]，鈴木秀幸[2]，柴田大輔[2]，大日向耕作[1]（[1]京大院農食品生物，[2]公益財団法人かずさ DNA 研究所）

4F45p14　大豆由来の情動調節ペプチド 2 －酵素消化により生成する新しい抗うつペプチド

16:43 森　薫葉[1]，山本あかね[1]，金本龍平[2]，鈴木秀幸[2]，柴田大輔[2]，○大日向耕作[1]（[1]京大院農，[2]かずさ DNA 研究所）

講演番号：2A21a01
講演日時、会場：3 月 27 日 09:00～ A 校舎 21 会場

低価値な再生可能資源から油脂を高生産する *Lipomyces* 属酵母のスクリーニング

Screening of yeast *Lipomyces* producing lipid from low value resources

○柳場 まな、松本 美穂、長沼 孝文（山梨大院・医工総合・生命）
○Mana YANAGIBA, Miho MATSUMOTO, Takafumi NAGANUMA (Yamanashi Univ.)

【背景と目的】エネルギー自給率 4%の日本では再生可能エネルギーの開発は急務であり、その中でも石油に替わる液体燃料の自国生産は重要である。軽油は植物油脂を原料とするバイオディーゼル燃料(BDF)で代替が可能であるが、我が国では栽培面積の拡大や気候の影響および少ない収穫回数など、植物油脂を潤沢に得ることはできない。我々はこの解決策の一つとしてタンク培養を用いた油脂酵母 *Lipomyces* による植物性油脂の発酵生産の実用化を目指している。この場合、コスト低減のためには低価値再生可能資源を炭素源として利用できることが重要であり、これらに含まれる炭素源から油脂が高生産できる菌株を取得することは本酵母による油脂生産実用化の成否に強く影響する。

このような背景のもと、現在我々は第一次スクリーニングとして多種類の再生可能資源と多数の菌株の組み合わせから各炭素源に対応した油脂生産能力の高い菌株の選抜を、第二次スクリーニングとして 90L ジャーファメンターでの実証試験に供試して油脂が多量に生産できる菌株の選抜を行った。

【方法】多数の組み合わせを効率良くこなすために、一次スクリーニングにはモデル再生可能資源の寒天プレート培地を作製し、一枚につき 6 菌株を接種する方法を用いた。プレート培地は温度の異なるインキュベーター中で培養し、コロニーを形成した菌株は、*Lipomyces* の形態的特徴である菌体内脂肪球の体積(油脂生産能力)を測定し油脂生産能力を判定した。実証試験はジャーファメンターによる液体培養であることから、二次スクリーニングでは液体培養法を用いて、一次スクリーニングで生産能力の高かった菌株を対象に高い油脂生産量(油脂量／培養液)を示す菌株の絞り込みを行った。

【結果・考察】一次スクリーニングで油脂高生産能力を示す菌株は各再生可能資源によって異なり、供試 373 菌株中同じ菌株が多くの再生可能資源(13 種類)に共通している場合はほとんどなかった。油脂生産能力が高い菌株が多く選抜された再生可能資源と供試酵母が油脂生産に利用しにくい再生可能資源があった。また、同じ菌株でもその油脂生産能は温度の影響を受けることがわかった。今回の一次スクリーニングのように固体表面で生育しコロニーを形成していく菌体と、二次スクリーニングのような液体中で生育している菌体では環境要因の影響の受け方に明らかな違いがある。そのため、二次スクリーニングでは一次よりも培養温度の幅を狭めたり、実証試験とできる限り同じ再生可能資源を供試した条件下で菌株の選抜を試みた。その結果、一次スクリーニングで高い油脂生産能力を示した菌株が二次スクリーニングでも高い生産量を示す場合もあれば、異なる結果となる場合もあった。これらの結果は、多数の実験系から優秀菌株を選抜する一次スクリーニングと、実証試験に即した菌株を絞り込む二次スクリーニングの必要性を強く示唆した。

Lipomyces, lipid synthesis, screening

講演番号：2A21a02
講演日時、会場：3 月 27 日 09:11～ A 校舎 21 会場

低価値な再生可能資源を *Lipomyces* 酵母の油脂生産に利用するための処理
Treatment of low value renewable resources for lipid production of yeast *Lipomyces*
○松本 美穂、柳場 まな、長沼 孝文 (山梨大院・医工総合・生命)
○Miho Matsumoto, Mana Yanagiba, Takafumi Naganuma (Yamanashi Univ.)

【背景・目的】化石燃料は利用しやすいエネルギーであるが有限の資源でもあり、さらに使用することで発生する二酸化炭素は温暖化を推し進め地球環境の悪化を招いている。エネルギー自給率 4%の我が国においては再生可能エネルギーの開発、利用は重要であり、これの使用により二酸化炭素の増加が抑えられ、地球温暖化防止への貢献も可能となる。再生可能エネルギーの一つであるバイオディーゼル燃料（BDF）は植物油脂を原料とするが、日本の油脂自給率は 2%と低く燃料として利用するのは難しい。そこで、我々は *Lipomyces* 酵母を利用した植物性油脂生産の実用化を試みているが、炭素源として低価値な再生可能資源の使用が可能になればコスト面から有利である。

低価値な再生可能資源として、出荷できない規格外果実、規格外や余剰および備蓄保存で芽を吹いたジャガイモ、給食で残った炊飯米（残飯)、廃食油から BDF を得る際に副生される廃グリセリンの使用を想定したが、これらは天然物ゆえに取り扱いが難しい。しかも、個々の天然物毎に保存法、液体培地化法、生育阻害物質の除去法など解決する点が異なる。本報告では再生可能資源を培地成分として使用する際の各天然物の処理法について検討した結果を報告する。

【方法および結果】〈規格外モモ〉一年に夏の約 2 カ月間収集できる規格外モモ果実は腐敗が速い。省スペース下で長期間品質を保持するには果汁での凍結保存が良い。果実を粉砕後搾汁し果汁とし、それらの処理時に混入したり果実に付着していた雑菌が長時間を要する凍結中や解凍中に繁殖しないよう果汁 pH を 2.2 付近にまで下げることで品質保持は可能であった。

〈ジャガイモ〉粉砕ジャガイモを滅菌のために加熱すると、激しいでんぷん糊化が起こってしまい、偏性好気性酵母を培養するのに必要な培地への通気が不足となるため、でんぷん糊化を低減する方法を検討した。金属塩添加や酸添加などを検討した結果、破砕ジャガイモの pH を硫酸で 1.5 に調整してオートクレイブ滅菌をすることで目的が達成できた。芽を吹いたジャガイモからの油脂生産について調べた結果でんぷんの劣化に起因する生産量の低下が見られたが実質的には問題ないと判断した。

〈残飯〉炊飯米はそのまま培地に添加しても、米でんぷんが *Lipomyces* 酵母の油脂生産に効率よく利用された。しかし、取り扱いの面から判断し風乾物が最も利用しやすいと判断した。

〈廃グリセリン〉廃食油を BDF 化する際に副成されたものを利用するが、この液はアルカリ性が強く未回収 BDF/メタノールが含まれる。そこで、酵母の培養に利用できるようにするために、水添加と pH 調整をおこなうことで未回収 BDF/メタノール画分が分離できグリセリンの回収が可能になった。

Lipomyces, lipid production, low value resources

講演番号：2A21a03
講演日時、会場：3 月 27 日 09:22～ A 校舎 21 会場

未精製グリセロールを用いた油脂生産酵母 *Lipomyces starkeyi* による高密度培養

Development of high density culture method for oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi* from crude glycerol

○浜本 友佳[1]、黒川 博史[1]、長沼 孝文[2]、二階堂 雅則[1]、大寺 基靖[1]、戸堀 悦雄[1] ([1]ライオン株式会社、[2]山梨大院生命)
○Yuka Hamamoto[1], Hiroshi Kurokawa[1], Takafumi Naganuma[2], Masanori Nikaido[1], Motoyasu Oodera[1], Norio Tobori[1] ([1]Lion Corporation, [2]Yamanashi Univ.)

【目的】

バイオディーゼル燃料（BDF）や界面活性剤原料として利用される脂肪酸メチルエステル（FAME）は 2020 年には 2011 年の 2.4 倍に増加し [1)]、副生するグリセロールの使途が問題となることが予想される。我々は今後生産量の伸びが期待されるパーム油由来の BDF の副生物である未精製グリセロールを油脂に変換し、燃料や化成品原料として有効使用するスキームを考えている。

我々は、油脂生産酵母 *Lipomyces starkeyi* を用いて各種培養条件におけるグリセロールの資化性を検討し、試薬グリセロールでは高密度培養が可能だが、未精製グリセロールでは菌の生育阻害が生じること、活性炭処理により生育がある程度改善されることがわかっている。本報告では、実際にパーム油から BDF 製造時に副生した未精製グリセロールを用いて、パーム油由来の未精製グリセロールの資化性、阻害要因及び高密度培養の可能性を明らかにすべく検討を行った。

【方法・結果】

パーム油由来未精製グリセロール組成をGC/MSを用いて分析した結果、中～長鎖脂肪酸メチルエステルを含む原料または工程由来の多様な不純物質が含まれていることを確認した。その未精製グリセロールを炭素源として試験管で*L. starkeyi* CBS 1807を培養したところ、菌体は全く生育しなかった。そこで、前報同様に未精製グリセロールを活性炭により簡易精製を行った結果、活性炭の種類及び処理条件によっては菌体増殖が見られ、資化性が改善することがわかった。最も良好な菌体増殖性が見られた活性炭により処理した未精製グリセロールを用いて、5 Lジャーファーメンターで培養を行ったところ、菌体は試薬グリセロールを用いた場合と同様に高密度に達し、35 g/Lの油脂を生産する事が出来た。さらに、極性が高い有機物が阻害要因であることが示唆されたため、この影響についても報告する。本研究は独立行政法人科学技術振興機構「研究成果最適展開プログラム A-STEP ハイリスク挑戦タイプ」により実施した。

1) OECD-FAO Agricultural Outlook 2011-2020(2011)

Lipomyces, lipid production, crude glycerol

講演番号：2A21a04
講演日時、会場：3 月 27 日 09:33～ A 校舎 21 会場

油糧微生物 *Mortierella alpina* への *Pythium* sp. 由来ω3 不飽和化酵素遺伝子の導入によるエイコサペンタエン酸の常温生産

Eicosapentaenoic acid production by *Mortierella alpina* expressing a ω3-desaturase from *Pythium* sp. at room temperature

○菊川 寛史[1]、中辻 諒平[1]、浅井 大貴[1]、櫻谷 英治[1,2]、安藤 晃規[1,3]、小川 順[1,3]（[1]京大院農・応用生命、[2]徳島大院・ソシオ、[3]京大・生理化学）
○Hiroshi Kikukawa[1], Ryohei Nakatsuji[1], Hirotaka Asai[1], Eiji Sakuradani[1,2], Akinori Ando[1,3], Jun Ogawa[1,3]（[1]Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]Inst. Technol. Sci., Univ. Tokushima, [3]Res. Uni. Physiol. Chem., Kyoto Univ.）

【背景・目的】ω3 脂肪酸は，抗炎症作用など多彩な生理機能を有することから，その医薬・健康食品としての需要が高まっている．しかし, ω3 脂肪酸の生産は魚油からの抽出に依存しており，安定供給源として期待される微生物を用いた生産が検討されている．本研究では，常温培養にてエイコサペンタエン酸（EPA）を生産する *Pythium* sp.より, ω6 脂肪酸から ω3 脂肪酸への変換を担う ω3 不飽和化酵素（ω3DS）遺伝子を単離し，その機能解析を行った．さらに，アラキドン酸（ARA）の生産株として利用されている *Mortierella alpina* 1S-4 において，単離した *ω3ds* 遺伝子を発現することで，常温下における EPA 生産を試みた．
【方法・結果】土壌より単離した EPA 生産糸状菌 *Pythium* sp.のゲノム DNA と cDNA を鋳型とし、近縁種の *ω3ds* 遺伝子のアミノ酸相同配列をもとに設計した縮重プライマーを用いてクローニングを行った．結果，369 残基のアミノ酸からなるタンパク質をコードする *ω3ds* ホモログ遺伝子を取得した．また，本 *ω3ds* ホモログ遺伝子発現酵母にて遺伝子産物の機能解析を行った結果，ω6 脂肪酸を対応する ω3 脂肪酸へと変換する ω3 不飽和化活性を示すことを確認した．続いて，コドン使用頻度を *M. alpina* 1S-4 様に改変した本 *ω3ds* を高発現プロモーターの制御下に配置した形質転換ベクターを，アグロバクテリウム法により *M. alpina* 1S-4 に導入した．得られた形質転換株の菌体内総脂肪酸をガスクロマトグラフィーにて分析したところ，常温（28°C）培養において ω3 脂肪酸の蓄積を確認した．結果, 7 日間培養における脂肪酸生産性は約 0.4 g/L，その際の EPA 含量は総脂肪酸の約 20%に達した．

eicosapentaenoic acid, *Pythium*, ω3-desaturase

講演番号：2A21a05
講演日時、会場：3 月 27 日 09:44～ A 校舎 21 会場

油糧微生物 *Mortierella alpina* 1S-4 株における Δ12 不飽和化酵素遺伝子破壊によるミード酸高生産株の構築

Construction of Mead acid-producting strain by knocking out *Δ12-desaturase* gene from an oleaginous fungus *Mortierella alpina* 1S-4 strain

○盤若 明日香[1]、菊川 寛史[1]、安藤 晃規[1,2]、櫻谷 英治[1,3]、落合 美佐[4]、清水 昌[1,5]、小川 順[1,2] ([1]京大院農・応用生命、[2]京大・生理化学ユニット、[3]徳島大院・ソシオ、[4]サントリーグローバルイノベーションセンター株式会社、[5]京都学園大・バイオ環境)

○Asuka HANNYA[1], Hiroshi KIKUKAWA[1], Akinori Ando[1,2], Eiji Sakuradani[1,3], Misa Ochiai[4], Sakayu Shimizu[1,5], Jun Ogawa[1,2] ([1]Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]Res. Uni. Physiol. Chem., Kyoto Univ., [3]Inst. Technol. Sci., [4]Suntory Global Innovation Center Ltd., [5]Fac. Bioenviron. Sci., Kyoto Gakuen Univ.)

【背景・目的】

近年、高度不飽和脂肪酸(PUFA)が心疾患の予防や、脳機能の発達、さらには、アレルギー抑制などに有効であることが報告され、医療・食品分野での需要が高まっている。これまでに我々は，化学変異剤を用いた油糧微生物 *M. alpina* 1S-4 の育種により、種々の PUFA の特異的生産を可能としてきた。本研究では、相同組換えによる遺伝子破壊を利用した稀少脂肪酸の高生産を目指し、Δ12 脂肪酸不飽和化酵素（Δ12DS）遺伝子破壊によるミード酸高生産株の取得を試みた。

【方法・結果】

非相同末端結合に不可欠な *lig4* 遺伝子をノックアウトすることで相同組換え頻度が向上した株を宿主とした。まず、二回交差相同組換えを想定した *Δ12ds* 遺伝子破壊コンストラクトを構築し、アグロバクテリウム法により *M. alpina* 1S-4 *Δlig4* 株の胞子に導入した。得られた形質転換株を GY 液体培地（Glucose 2%, Yeast extract 1%）にて培養後、菌体内総脂質をメチルエステル誘導体化し、ガスクロマトグラフィー分析に供した。その結果、形質転換株 13 株中 3 株において ω6 脂肪酸蓄積量の減少に伴った ω9 脂肪酸、特にミード酸の蓄積を認めた。宿主株との比較においてこれらの形質転換株の生育に差はなく、化学変異剤により取得した *Δ12ds* 欠損株との比較において、より高いミード酸蓄積量を示した。

Mortierella alpina 1S-4, Mead acid, Δ12-desaturase

講演番号：2A21a06
講演日時、会場：3 月 27 日 10:05～ A 校舎 21 会場

油糧微生物 *Mortierella alpina* 1S-4 株における Δ6 不飽和化酵素遺伝子をターゲットとした分子育種株の構築

Δ6-desaturase-targeted molecular breeding of oleaginous fungus *Mortierella alpina* 1S-4

○阪本 鷹行[1]、菊川 寛史[1]、安藤 晃規[1,2]、櫻谷 英治[1,3]、落合 美佐[4]、島 純[5]、清水 昌[1,6]、小川 順[1,2] ([1]京大院農・応用生命、[2]京大・生理化学ユニット、[3]徳島大院・ソシオ、[4]サントリーグローバルイノベーションセンター株式会社、[5]龍谷大、[6]京都学園大・バイオ環境)

○Takaiku SAKAMOTO[1], Hiroshi KIKUKAWA[1], Akinori ANDO[1,2], Eiji SAKURADANI[1,3], Misa OCHIAI[4], Jun SHIMA[5], Sakayu SHIMIZU[1,6], Jun OGAWA[1,2] ([1]Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]Res. Uni. Physiol. Chem., Kyoto Univ., [3]Inst. Tcchnol. Sci., Univ. Tokushima, [4]Suntory Global Innovation Center Ltd., [5]Ryukoku Univ., [6]Fac. Bioenviron. Sci., Kyoto Gakuen Univ.)

【背景・目的】

油脂は炭化水素骨格を有する化合物であり，化学工業における石油代替原料として有用である。特に，オレイン酸（OA）及びリノール酸（LA）は水酸化を経てポリマー原料であるセバシン酸へと変換可能である。*Mortierella alpina* は脂質を多量に蓄積する性質を有する油糧微生物であるが，OA 及び LA からさらに長鎖の不飽和脂肪酸を合成し、その脂肪酸組成は複雑である。本研究では、*M. alpina* において OA 及び LA の不飽和化に関与する Δ6 不飽和化酵素（DS）遺伝子の転写抑制及び破壊による長鎖不飽和脂肪酸合成抑制株の構築を試みた。

【方法・結果】

M. alpina のゲノムデータベースから予想される *Δ6ds* ホモログ遺伝子において、shRNA 転写による RNAi 誘導コンストラクト、及び、二回交差相同組換えを介する遺伝子破壊コンストラクトを作成した。次に、それぞれのベクターをアグロバクテリウム法によって *M. alpina* 1S-4 株及び *M. alpina* 1S-4 Δ*lig4* 株へ導入した。*Δ6ds*RNAi 株を GY 液体培地（Glucose 2%, Yeast extract 1%）にて培養後、ガスクロマトグラフィーを用いて菌体内総脂質の脂肪酸組成を調べた。その結果、脂肪酸合成経路における Δ6 位不飽和化が抑制され、下流の長鎖不飽和脂肪酸蓄積率の減少が認められた。続いて、遺伝子破壊ベクター導入株の評価を試みる。

Mortierella alpina 1S-4, Δ6-desaturase, homologous recombination

講演番号：2A21a07
講演日時、会場：3 月 27 日 10:16～ A 校舎 21 会場

脂質蓄積性の出芽酵母形質転換株によるパルミトオレイン酸生産

Palmitoleic acid production by oleaginously engineered Saccharomyces cerevisiae

○神坂 泰、木村 和義、植村 浩、山岡 正和（産総研生物プロセス）
○Yasushi KAMISAKA, Kazuyoshi KIMURA, Hiroshi UEMURA, Masakazu YAMAOKA (AIST, Bioproduction RI)

【目的】我々は、出芽酵母 *S. cerevisiae* を用いて脂質蓄積機構の解明及び油脂生産系の構築をめざしている。これまでに、出芽酵母の貯蔵脂質合成酵素ジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼである Dga1p の N 末端領域を欠失させると活性型になり、この N 末端欠失 Dga1p（Dga1ΔNp）を *dga1* 破壊株に過剰発現させると、脂質含量 45%の脂質蓄積性株が得られることを見出した。さらに、この *dga1* 形質転換株では、*DGA1* に隣接する遺伝子であるヒストンアセチルトランスフェラーゼをコードする *ESA1* の発現低下が脂質蓄積に重要であることを見出した。今回は、出芽酵母に含有される機能性脂肪酸であるパルミトオレイン酸（16:1(n-7),POA）に着目し、取得した脂質蓄積性の出芽酵母株による POA 生産を、さらに向上させる条件を検討した。POA は、近年生理活性等が注目されているが、一般的な油糧植物にはあまり含まれておらず、新たな供給源の開発が求められている。
【方法及び結果】まず、Dga1ΔNp を過剰発現させた *dga1* 破壊株の培養条件を検討したところ、要求アミノ酸であるメチオニンを通常培養に用いる 0.02g/l よりはるかに高い 2g/l まで上げると、脂質含量はそれほど変化せずに全脂肪酸中の POA 含量が 40%から 50%まで増加することを見出した。このメチオニンの効果は、濃度依存的であり、イオウ含有アミノ酸であるシステインや他のアミノ酸であるグリシン、グルタミンの添加では認められなかった。また、この株のメチオニン要求性を相補する遺伝子 *MET17* の過剰発現では、POA 含量の増加は認められないことから、メチオニン自体の濃度が重要であることが示唆された。さらに、培養温度を 30℃から 20℃に低下させたところ、POA 含量は 55%まで増加し、POA 生産量も当初の 2.5 倍に増加した。このメチオニン添加及び低温培養の効果は、Dga1ΔNp を過剰発現させた野生株でも認められた。一方、Dga1ΔNp を過剰発現させていない野生株、*dga1* 破壊由来の形質転換株では、メチオニン添加の効果は認められず、脂質蓄積の増加がこの効果に必要であることが示された。以上の結果より、高濃度のメチオニン添加と低温培養が、脂質蓄積性出芽酵母による POA 生産に適した培養条件であることが見出された。

palmitoleic acid, Saccharomyces cerevisiae, methionine

講演番号：2A21a08
講演日時、会場：3 月 27 日 10:27～ A 校舎 21 会場

Cryptococcus diffluens 由来のガラクチュロン酸還元酵素発現組換え酵母による L-ガラクトン酸生産系の改良

Improvement of L-galactonic acid production system using transformant *Saccharomyces cerevisiae*.

○松原 健生[1]、若林 彩香[2]、濱田 翔平[1]、岸田 正夫[1] ([1]阪府大院生環科・応生科、[2]阪府大生環科・応生科)

○Takeo Matsubara[1], Ayaka Wakabayashi[2], Syohei Hamada[1], Masao Kishida[1] ([1]Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. of Life Environ. Sci., Osaka Pref. Univ., [2]Div. Appl. Biol. Chem., Sch. of Life Environ. Sci., Osaka Pref. Univ.)

[目的]

ペクチンは植物の細胞壁の構成成分や細胞間接着物質として甜菜や柑橘類などに多く含まれる複合多糖であり、D-ガラクチュロン酸はペクチンの主な構成糖である。ペクチンは主に家畜の飼料や増粘剤等の安価な商品に利用されているが、加工コスト等の問題を有しており本来ペクチンが持つ価値に比べ現在その利用範囲は限定的である。我々はペクチンの新たな利用を目的に、微生物の働きを利用したペクチンおよびその主要構成糖であるガラクチュロン酸の高付加価値化と再資源化を目指している。当研究室ではガラクチュロン酸資化酵母 *Cryptococcus diffluens* OPU-FC11 株を単離しており、本酵母のガラクチュロン酸代謝の第一反応が、D-ガラクチュロン酸を希少糖である L-ガラクトン酸に変換するガラクチュロン酸還元反応であることを明らかにしている。この酵素を用いて L-ガラクトン酸の高効率生産系を確立する為に、クローニングしたこの酵素遺伝子 *GAR1* を *Saccharomyces cerevisiae* に導入した組換え体を作成し、この組換え酵母を用いた L-ガラクトン酸の効率的発酵生産の培養条件の検討を目的とした。

[方法と結果]

クローニングした *C. diffluens* OPU-FC11 由来のガラクチュロン酸還元酵素遺伝子 *GAR1* を、YIp 型、YEp 型、YCp 型の三種のプラスミドに導入した。これを *S. cerevisiae* BY4741 株及び *S. cerevisiae* IFO10455 株に導入し、各々三種の組換え酵母を育種し組換え *GAR1* 酵素を発現させた。これらの組換え酵母を D-ガラクチュロン酸含有培地で培養し、L-ガラクトン酸を発酵生産する時の培養条件を検討した。その結果、YIp 型の組換え酵母を用いた L-ガラクトン酸の発酵生産量が向上した。また組換え酵母を用いて継代培養を行い、L-ガラクトン酸の発酵生産能力が安定に維持されるかどうかこれらの組換え酵母について比較検討した。その結果、これらのデータから、D-ガラクチュロン酸から高収率で安定した L-ガラクトン酸の生産が可能になる酵母とその培養条件を決定した。

L-galactonic acid, *Cryptococcus diffluens*, Galacturonic acid reductase

講演番号：2A21a09
講演日時、会場：3 月 27 日 10:38～ A 校舎 21 会場

混合糖を基質とした高効率乳酸発酵のための *Enterococcus mundtii* QU 25 株の分子育種

Molecular breeding of *Enterococcus mundtii* QU 25 for efficient lactic acid fermentation with mixed sugars

○藤原 治子[1]、簗瀬 弘明[2]、志波 優[3]、児島 友子[2]、渡辺 智[2]、田代 幸寛[1]、善藤 威史[1]、千葉櫻 拓[2]、門多 真理子[2,4]、吉川 博文[2,3]、園元 謙二[1,5]（[1]九大院・農、[2]東農大・バイオ、[3]東農大・ゲノムセンター、[4]武蔵野大・環境、[5]九大・バイオアーク）

○Haruko FUJIWARA[1], Hiroaki YANASE[2], Yuh SHIWA[3], Tomoko ARAYA-KOJIMA[2], Satoru WATANABE[2], Yukihiro TASHIRO[1], Takeshi ZENDOU[1], Taku CHIBAZAKURA[2], Mariko SHIMIZU-KADOTA[2,4], Hirofumi YOSHIKAWA[2,3], Kenji SONOMOTO[1,5] ([1]Fac. Agr., Kyushu Univ., [2]Dept. of Bioscience, Tokyo Univ. of Agric., [3]NGRC, Tokyo Univ. of Agric., [4]Fac. Environmental Science, Musashino Univ., [5]Bio-Arch, Kyushu Univ.)

【背景】石油資源の枯渇や石油消費に伴う環境の悪化といった問題に対して、近年持続的に利用可能なバイオマス資源を原料にした、発酵による物質生産が注目を集めている。例えば乳酸菌による発酵で得られる光学活性乳酸は、プラスチックの代替品となるポリ乳酸の原料として活用できる。バイオマス資源の中でも、特に食糧と競合しないリグノセルロース系バイオマスの有効活用が求められている。リグノセルロース系バイオマスは、複数の多糖とリグニンからなり、前処理によってグルコース（G）・グルコースの二糖であるセロビオース（C）・キシロース（X）などを含む混合糖に分解される。一般的に複数種の糖の存在下では、微生物にとって資化しやすい糖（G,C 等）が先に代謝され、他の糖の資化を阻害するカーボンカタボライト抑制（CCR）が働く。本研究室で単離した菌株 *Enterococcus mundtii* QU 25 株（QU 25 株）は、①GX 存在下で不完全な CCR を示す[1)]、②CX を同時に資化するという[2)]、優れた発酵特性を持つ。本研究では、これらの発酵特性を転写解析と酵素活性試験により解明し、より優れた乳酸発酵菌株を育種することを目的とした。

【方法・結果】先の研究によって明らかとなったQU 25株の全ゲノム配列には様々な糖代謝関連遺伝子が見出された[3)]。まず、キシロース代謝関連遺伝子の転写解析を行った。ノーザン解析およびRNA-seq解析を行ったところ、高濃度GとX共存条件下で、キシロースイソメラーゼ・キシルロキナーゼ等のキシロース代謝初期の酵素の遺伝子について転写レベルでの抑制が起きていた。次に、セロビオース関連代謝遺伝子として、10種の推定β-グルコシダーゼ（β-GL）遺伝子の転写量を半定量的RT-PCRで解析した。その結果、β-GL遺伝子は、糖源にかかわらず常に転写されるものと、C存在下でのみ転写されるものに分けられた。現在、G/C/X存在下と混合糖条件下で対数増殖期・定常期における関連酵素の転写量及び酵素活性の経時的な比較を試みている。

一方、明らかとなった代謝機構をもとに、分子育種を行うためには、QU 25株の効率的な遺伝子組換え法の確立が求められる。先の研究からQU 25株は5つの内在性プラスミドを保持しており、形質転換効率が低いことが明らかとなっている。そこで、より形質転換効率の高い菌株の作成を目指し、エチジウムブロマイド・アクリジンオレンジ等の存在下でQU 25株を培養し、これら内在性プラスミドの除去を試みた。結果プラスミド欠損株が3株得られ、今後はこれらの菌株を用いて分子育種を行う予定である。

1) Abdel-Rahman et al., 2014, J. Biosci. Bioeng., 2) Wang et al., 2014, RSC Adv., 3) Shiwa et al., 2014, DNA Res.

Lactic acid fermentation, Carbon catabolite repression, Metabolic enzymes

講演番号：2A21a10
講演日時、会場：3 月 27 日 10:49～ A 校舎 21 会場

硫黄成分が 5-アミノレブリン酸の生産に及ぼす影響

Effect of sulfur component on 5-aminolevulinic acid production

○齊藤 優、山本 泰嗣、藤本 尚則（コスモ石油　中央研）
○Masaru SAITO, Taishi YAMAMOTO, Takanori FUJIMOTO (COSMO OIL CO., LTD.)

【背景および目的】

５－アミノレブリン酸（5-aminolevulinic acid、ALA）はヘムやクロロフィルの前駆体となるアミノ酸（一次代謝産物）であり、これまでに食品や肥料、医薬品、化粧品といった様々な用途に応用されている。当社では、これまでに光合成細菌（紅色非硫黄細菌）である *Rhodobacter sphaeroides* を変異育種し、高収率を達成する CR-720FC 株を取得している。当菌株は培地溶液中にて、グリシンとグルコースを原料として ALA の生産を行うが、その培地には天然物である酵母エキスを使用する。そのため、その性状の微細な変化により、ALA 生産に大きな影響を及ぼす可能性がある。

そこで、本研究では ALA の安定生産を目的として、培地中含有成分、特に硫黄分に着目し、その生産性に対する影響の評価を実施した。

【試験方法】

培地成分の影響評価は、試験管を用いた ALA 生産試験にて実施した。

種々の培地を試験管に調製し、そこで *Rhodobacter sphaeroides* CR-720FC 株を培養した。約 24 時間後に原料であるグリシンを添加し、ALA の生産を開始した。培養は往復振盪により行い、生産開始から 18 時間後に培養を終了させた。培養終了後、その培養液中の ALA 濃度をエーリッヒ比色法により定量した。

【結果】

培地中の硫黄成分濃度（含硫アミノ酸、硫酸イオン）を変化させ、ALA 生産試験を実施した。その結果、特に硫酸イオンでは、およそ 1.0mM～1.9mM の濃度にて最大生産性となる一方、この範囲よりも低濃度、または高濃度になった場合、その ALA 生産性は急激に低下することが明らかとなった。

この結果より、硫酸イオンないし硫黄成分の濃度は、安定的な ALA 生産に必要不可欠であることが判明した。

5-aminolevulinic acid, sulfur, *Rhodobacter sphaeroides*

講演番号：2A21a12
講演日時、会場：3 月 27 日 11:21～ A 校舎 21 会場

代謝改変大腸菌を用いたイタコン酸高発酵生産法の開発

Genome design for development of engineered *E. coli* for production itaconic acid

○永田 圭介、麻生 祐司、小原 仁実 (京都工繊大院)
○Keisuke Nagata, Yuji Aso, Hitomi Ohara (KIT)

【目的】

糸状菌 *Aspergillus terreus*が発酵生産するイタコン酸はラジカル反応性を有しており環境調和型ビニルモノマーとして注目されている。これまでに発表者らはイソクエン酸デヒドロゲナーゼ *icd* を破壊しアコニターゼ遺伝子 *acnB* を大量発現させた大腸菌に *A. terreus* 由来 cis-アコニット酸脱炭酸酵素遺伝子 cad を発現させることで大腸菌を用いてグルコースからのイタコン酸生産に成功している。しかし、そのイタコン酸生産性は 4.9 g/L(対グルコース収率 16.3 %)と未だ改善の余地がある。そこで本研究では、更なるイタコン酸生産性の向上を目的として、イタコン酸生産に不要な代謝経路に関わる遺伝子を多重破壊して大腸菌株の作製を試みた。

【方法】

λ-Red recombination および P1 transduction を用いて、大腸菌ゲノム上の酢酸生産関連遺伝子（*ackA*, *poxB*)、エタノール生産関連遺伝子（*adhE*)、コハク酸生産関連遺伝子（*frdA*）を順次破壊した。遺伝子破壊の確認は PCR により行った。

【結果と考察】

ackA, *poxB*, *adhE*, *frdA*, を全て破壊した大腸菌株を得た。現在、乳酸生産関連遺伝子（*mgsA*、*ldhA*)の破壊を進めている。今後は、作製した多重遺伝子破壊株ゲノム上の *acnB* プロモーターを T7 プロモーターに置換する。さらに、T7 プロモーターとともに *cad* を破壊株ゲノム上に導入することで、プラスミドフリーなイタコン酸高生産株の作製を試みる。

Itaconic acid, *Escherichia coli*, Metabolic engineering

講演番号：2A21a13
講演日時、会場：3 月 27 日 11:32～ A 校舎 21 会場

大腸菌を用いたアクリル酸発酵生産法の開発

Development of method for acrylic acid production by fermentation

○橋本 彩加、麻生 祐司、小原 仁実（京都工芸繊維大学）
○Ayaka HASHIMOTO, Yuji ASOU, Hitomi OHARA (KIT)

【目的】近年、バイオマスからの微生物によるモノマー発酵生産法の開発が盛んである。一方、有用なビニルモノマーであるアクリル酸を発酵生産する微生物として *Megasphaera elsdenii* が知られている。しかし、その生産性は極めて低く、アクリル酸を生産するための技術基盤は今のところ存在しない。そこで本研究では、ゲノムシーケンスの明らかな *M. elsdenii* JCM 1772 のコードするアクリル酸生産関連遺伝子 *pct*（プロピオン酸 CoA 転移酵素遺伝子）および *lcdCAB*（ラクチル-CoA 脱水酵素遺伝子）を乳酸生産大腸菌 *Escherichia coli* JW0885 に導入し発現させることで、グルコースからのアクリル酸の直接発酵生産法の開発を試みた。

【方法】*M. elsdenii* JCM 1772 のゲノムを鋳型として PCR により *pct* および *lcdCAB* を増幅後、発現ベクター pETDuet-1 にクローニングし pETDuet-1-pct-lcdCAB を得た。これを用いて *E. coli* JW0885(DE3)(pLysSRare2)を形質転換した。得られた形質転換体を LB 培地を用いて 37℃で 18 h 好気培養した。このとき、0.1 mM IPTG を添加し遺伝子の発現を誘導した。培養後、菌体を 0.1 mM IPTG と 10 mM パントテン酸ナトリウムを添加した M9 培地に懸濁し 30℃で 48 h 嫌気培養した。HPLC を用いて、培養液上清中のアクリル酸濃度を経時的に測定した。

【結果と考察】M9 培地で嫌気培養したところ、アクリル酸生産を確認した。培養終了時の培養液中のアクリル酸濃度は 14.4 mg/L であった。現在、更なるアクリル酸生産性の向上を目指し、*pct* および *acrCBA*（アクリリル-CoA 還元酵素）を発現させた大腸菌にて、プロピオン酸からのアクリル酸生産を試みている。

Escherichia coli, Acrylic acid

講演番号：2A21a14
講演日時、会場：3 月 27 日 11:43～ A 校舎 21 会場

代謝工学的な手法を用いた、大腸菌によるプトレッシンの発酵生産

Metabolic engineering of *Escherichia coli* for fermentative production of putrescine

○入江 加奈子、鈴木 秀之（京都工繊大院応生）
○Kanako IRIE, Hideyuki SUZUKI (Kyoto Institute of Technology Univ.)

4 つの炭素をもつ直鎖ジアミンであるプトレッシン（1,4-ジアミノブタン）は、主要な産業用プラスチックであるナイロン 4,6 の原料である。プトレッシンの合成法として多数の化学経路が知られているが、そのほとんどが再生不可能だと考えられている資源を出発物質とするため、再生可能な炭素源を出発物質とする生物工学的生産が望まれている。グラム陰性菌である大腸菌ではプトレッシンは細胞増殖や正常な細胞生育に重要な役割を担っていて、細胞内に数十 mM というオーダーで存在すると報告されている。また、大腸菌は少なくとも 0.5 M のプトレッシンに耐性がある。そこで、大腸菌を用いてプトレッシンを生産するための代謝工学的手法の開発を目的として、大腸菌によるアルギニンからのプトレッシンの合成を試みた。

大腸菌において、プトレッシンは二種類の経路を通して合成される。1 つめの経路では、オルニチン脱炭酸酵素(SpeC・SpeF)によりアミノ酸の一種であるオルニチンから合成される。2 つめの経路ではオルニチンからアルギニンを経てアルギニン脱炭酸酵素（SpeA）・アグマチン分解酵素（SpeB）によって合成される。オルニチンは *N*-アセチルグルタミン酸合成酵素（ArgA）によってグルタミン酸から *N*-アセチルグルタミン酸へと変換される。ArgA はアルギニンによってフィードバック阻害を受けるため、フィードバック阻害を脱感作できるとされるアミノ酸置換 Y19C を導入した。また、*argA* のイニシエーションコドンは翻訳効率が低いとされる GTG だったため、ATG に変えた。

先行研究では、プトレッシンがコハク酸やスペルミジンへ代謝されないように、各代謝経路の遺伝子（*patA*, *potE*, *puuA*, *speD*, *speG*）をゲノム上で欠損させた。この株に多コピープラスミドを用いて強力な *tac* プロモーターからオルニチン脱炭酸酵素 SpeC と変異 ArgA を過剰発現させた。その結果、M9-0.2%ガラクトース培地において、SpeC と変異 ArgA を導入した株はコントロール株の 10 倍以上のプトレッシンを合成した。

本研究では SpeC ではなく SpeA と SpeB を用いてプトレッシンの合成を試みた。また、プトレッシントランスポーターのうち特に親和性の高い *puuP, potFGHI* も欠損させた。M9−0.2%グルコース培地、M9−0.2%ガラクトース培地、M9−1%トリプトン培地において、細胞外プトレッシン濃度は経時的に増加した。

さらに、SpeA・SpeB と SpeC を同時に発現させ、プトレッシンの合成量を増加させることを試みた。

Escherichia coli, polyamine, putrescine

講演番号：2A21a15
講演日時、会場：3 月 27 日 11:54～ A 校舎 21 会場

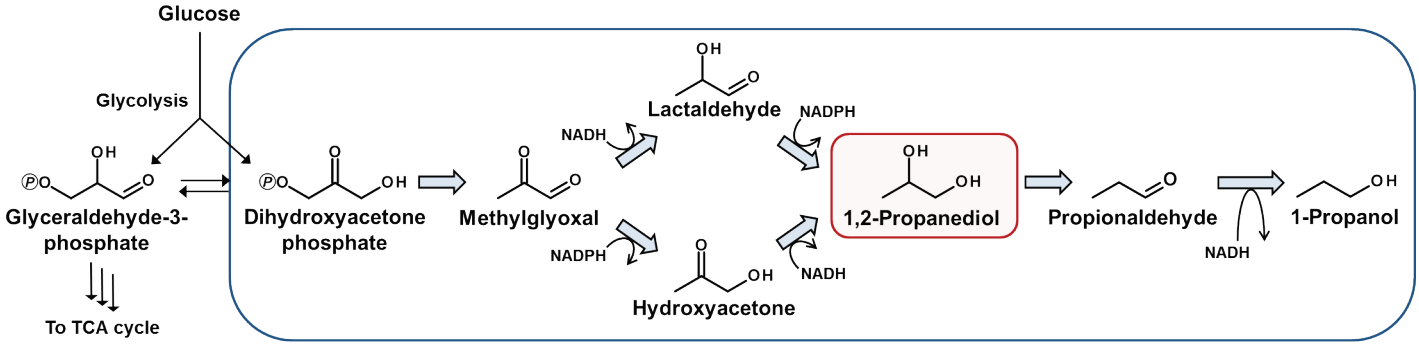
組換え大腸菌を用いた 1-プロパノール発酵生産における通気条件の検討

Effects of aeration conditions in fermentative production of 1-propanol by recombinant *Escherichia coli*

○松原 充、浦野 信行、山田 尚平、藤居 実咲、片岡 道彦（阪府大院・生環科・応生科）
○ Mitsuru MATSUBARA, Nobuyuki URANO, Shohei YAMADA, Misaki FUJII, Michihiko KATAOKA (Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Life and Environ. Sci., Osaka Pref. Univ.)

【目的】1-プロパノールは多目的な溶媒として様々な分野で使用されている化合物である。さらに 1-プロパノールは代表的な汎用ポリマーであるポリプロピレンの単量体であるプロピレンに容易に変換できるため，バイオポリマー原料としての価値が注目されている。従来のような燃料生産のためのバイオマス利用だけでなく，ポリマー原料としての利用が可能となれば，より長期間の CO_2 固定という面において大きな効果が期待できる。これまでの研究により，人工的に設計した生合成経路（下図）を導入した組換え *Escherichia coli* を用いることで，グルコースから 1-プロパノール発酵生産が可能となった。そこで本研究では，1-プロパノール生成量を増加させることを目的とし，培養条件，特に酸素供給条件の検討を行った。

【方法と結果】本生合成経路を使用する場合，経路の中間体である 1,2-プロパンジオール（1,2-PD）の生成量が 1-プロパノールの生成量に大きな影響を与えることが予想される。そのため，解糖系中のジヒドロキシアセトンリン酸から 1,2-PD へ至る経路を導入した組換え *E. coli* を用いて，様々な酸素供給条件による 1,2-PD 生成量の比較を行った。小型のジャーファーメンターを使用し，培養液中へ通気する空気と窒素の混合比を調整することで酸素供給条件を検討した。その結果，菌体の生育速度や糖の消費速度の点では空気のみを通気する好気的条件での培養が効率的であった。一方で，糖の消費量に対する 1,2-PD の生成量（対グルコース変換率）の点では，窒素のみを通気する嫌気的条件での培養が適していた。さらに，空気および窒素を 50%ずつ混合して通気したところ，嫌気的条件での培養に比べて菌体の生育速度や糖の消費速度が改善され，1,2-PD 生成量は同程度に維持されるなど，酸素供給条件が細胞内酸化還元バランスに大きな影響を与えることが分かった。



metabolic engineering, 1-propanol, *Escherichia coli*

講演番号：2A21p01
講演日時、会場：3 月 27 日 14:00～ A 校舎 21 会場

リファンピシン耐性株による至適発酵温度の高温化

Improvement of optimum fermentation temperature by rifampicin resistant Clostridium saccharoperbutylacetonicum

○川嶋 草平、清 啓自、門倉 利守、中里 厚実、中山 俊一 (東京農業大学)
○Souhei KAWASHIMA, Keiji KIYOSHI, Toshimori KADOKURA, Atumi NAKAZATO, Shunichi NAKAYAMA (Tokyo Agriculture Univ.)

【目的】

当研究室では高温性セルロース分解菌 *Clostridium thermocellum* NBRC103400 および中温性ブタノール生産菌 *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4(以下 N1-4) を混合培養することで、セルロースからのブタノール生産系の構築に成功した。しかし、高温性セルロース分解菌由来のセルラーゼ活性の至適温度は高温であるのに対し、本培養系は培養のほとんどを 30℃で行うためセルロース分解速度の遅さがブタノール生産性の低下要因の１つであると推測される。セルラーゼ活性を上昇させる方法の１つにより高温域での発酵が求められるが、N1-4 の至適発酵温度は 30℃であり培養温度を 37℃に上昇させるとブタノール生産は著しく低下する。そこで本研究では転写阻害剤であるリファンピシン耐性株を取得することでより高温域でもブタノール生産能を有する変異株の取得を試みた。

【方法・結果】

紫外線照射による遺伝子変異導入により、リファンピシンに耐性を示す変異株を取得した。30℃で 6 時間培養した N1-4 をリファンピシン添加 TYA 培地に塗抹接種し、UV クロスリンカーを用いた紫外線照射により変異処理を行った。変異処理の条件は、リファンピシン濃度を N1-4 の生育を完全に阻害する最小濃度 0.5 μg/ml とし、紫外線強度を菌体の死滅率が 99.99%となる 5×10^3 μJ/cm^2 とした。変異処理後、37℃で 5 日間培養し形成されたコロニーをリファンピシン耐性変異株（以下、RIFR 株）として単離した。取得した全 94 株の RIFR 株を 37℃で培養し、培養 24 時間と 48 時間での菌体増殖（OD_{600nm}）を測定した。親株である N1-4 は 30℃で培養した時と比較して菌体数が OD_{600}=6.3 から OD_{600}=2.4 と著しく低下したが、変異株の中でも RIFR91 は 37℃培養において OD_{600}=5.4 と高い増殖能を示した。RIFR91 を 30℃～40℃で 2℃ずつ培養温度を変更して初発グルコースを 40g/L とし発酵産物量を測定した。その結果、30℃より高温では温度上昇に伴いブタノール生産量が低下する N1-4 と比較し、RIFR91 は 34℃で 9.8 g/L、36℃で 7.0 g/L のブタノールを生産し、より高温域でもブタノール生産可能な変異株が取得された。現在、RIFR91 を用いてセルロースを基質とした混合培養系を検討している。

Butanol production, Rifampicin resistant mutants, Improvement of optimum fermentation temperature

講演番号：2A21p02
講演日時、会場：3 月 27 日 14:11～ A 校舎 21 会場

複合微生物系による有価物発酵生産（メタ発酵）における発酵諸条件の影響

Effect of parameters on fermentative production (meta-fermentation) for valuable substances by controlled mixed culture systems

○田代 幸寛[1]、井ノ口 翔太[1]、石橋 侑子[1]、宮本 浩邦[2]、奥川 友紀[1]、酒井 謙二[1] ([1]九大院・農、[2]日環科学)

○Yukihiro Yukihiro[1], Shota Inokuchi[1], Yuko Ishibashi[1], Hirokuni Miyamoto[2], Yuki Okugawa[1], Kenji Sakai[1] ([1]Fac. Agr., Kyushu Univ., [2]Japan Eco-science)

【背景・目的】

我々は、複合微生物を活用した発酵（メタ発酵）によるバイオマスを原料とする有価物生産法を提唱している [1)]。先行研究により、生ゴミおよびコンポストをそれぞれ原料および種菌とするメタ発酵における温度制御により、50°C で高光学純度の L-乳酸を生産し、*Bacillus coagulans* が優占菌であることを初めて報告した [2)]。ところが、本メタ発酵系における温度以外の発酵条件は検討されていない。そこで本研究では、メタ発酵系における培地の殺菌、通気口開放の有無および pH 制御が乳酸生産におよぼす影響を検討した。

【方法・結果】

本研究では、標準生ゴミ培地に MAR-compost[3)]を種菌とし、50°C で発酵試験を行った。静置条件下で pH を 24 h 毎に 7.0 に間欠制御し、培地の殺菌の有無を小スケール（30 mL）で検討した結果、生産濃度（26.4 g/L、23.3, g/L）、選択性（87.2%、83.0%）に差がなかったが、殺菌を行わなかった場合に、高い光学純度が得られ、以降の実験には培地殺菌を行わなかった。次に、pH を 24 h 毎に 7.0 に間欠制御し、ミニ発酵槽で攪拌しながら通気口開放の有無を検討した結果、生産濃度（51.7 g/L、46.8 g/L）および選択性（95.2%、95.4%）に大きな差はなかった。また、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動（DGGE）解析の結果、いずれの場合も *B. coagulans* が優占菌であった。さらに、ミニ発酵槽で攪拌しながら pH を 7.0 に一定制御して発酵を行った結果、生産濃度（17.8 g/L）および選択性（67.9%）は減少したが、168 h 要した発酵時間を 60 h に短縮することができ、最大生産速度は高い値を示した。また、DGGE 解析の結果、*B. coagulans* の最適 pH が 7 付近であるにも関わらず、優占菌が *Bacillus thermoamylovorans* へ変化することから、発酵初期の間欠 pH 制御が *B. coagulans* を優占化する要因であることが示唆された。そこで、ミニ発酵槽で攪拌しながら pH を 24 h まで 7.0 に間欠制御後、一定制御して発酵を行った結果、発酵時間を 36 h に短縮でき、高い生産濃度、選択性、生産性、光学純度を得た。

1) 田代、酒井, バイオインダストリー, 72, 486-487, 2014. (2) Tashiro et al., Bioresou. Technol., 146, 672-681, 2013. (3) Niisawa et al., J. Gen. Appl. Microbiol., 54, 149-158, 2008.

Mixed culture system, Optically pure lactic acid, Kitchen garbage

講演番号：2A21p03
講演日時、会場：3 月 27 日 14:22～ A 校舎 21 会場

ミュータンス菌型のレドックス代謝をもつ還元力高産生コリネ菌の開発

Development of *Streptococcus mutans*-type redox metabolism in *Corynebacterium glutamicum*

○竹野 誠記[1]、見村 晃紀[1]、三橋 敏[2]、池田 正人[1]([1]信州大農・応生科、[2]協和発酵バイオ)
○Seiki TAKENO[1], Akinori MIMURA[1], Satoshi MITSUHASHI[2], Masato IKEDA[1] ([1]Shinshu Univ., [2]Kyowa Hakko Bio)

【背景と目的】 アミノ酸や脂肪酸など、多くの有用物質の生合成には、還元力として NADPH が必要とされるため、宿主の NADPH 産生能をいかに高めるかは物質生産の重要な課題である。我々は、ペントースリン酸経路で NADPH を生成できないミュータンス菌 *Streptococcus mutans* がもつ特異な解糖系をモデルとしてコリネ菌 *Corynebacterium glutamicum* のレドックス代謝の再設計を試みている。これまでに、自前の NAD 型グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ（GapA）に代えてミュータンス菌の NADP 型グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ（GapN）で解糖を行う菌株（RE2 株）を造成し、同株が確かにアミノ酸の高生産宿主になりうることを、リジン発酵を例に検証してきた。しかし、この RE2 株は生育が悪く、実用に堪えるレベルには至っていない。ミュータンス菌が GapN と GapA の両用型であることをヒントに、GapN と GapA を併せ持つコリネ菌の育種を試みた。

【方法と結果】 *gapN*を発現する RE2 株において、発酵初期の生育フェーズだけ *gapA*を限定的に発現させるプロセスを考えた。このシステムを構築するため、RE2 株のゲノムにイノシトール誘導型 *gapA* を組み込み、GapA と GapN の両用型宿主 RE2A^{iol} 株を育種した。この株では、イノシトールの初発添加量に応じて *gapA* の発現期間を制御できると考えられる。まず、RE2A^{iol} 株をイノシトール無添加の通常条件（シード：グルコース 2%、本培養：グルコース 5%）で培養したところ、陰性対照株 RE2 と同等の生育遅延が認められたことから、イノシトール無添加条件では RE2A^{iol} 株の生育は予想通り、*gapN*にのみ依存しており、*gapA*は寄与していないと考えられた。次いで、グルコースとイノシトールの炭素源としての総和が一定になるようにして、イノシトールの添加条件を検討したところ、最終的に、シードの糖源をイノシトールのみにすることで、本培養にイノシトールを添加しなくても生育が改善し、期待通りの生育曲線が得られた。以上、イノシトール誘導型プロモーターを用いて発酵初期の生育フェーズだけ *gapA* を限定的に発現させるシステムが、狙い通り、成立しているものと判断された。

Corynebacterium glutamicum, *Streptococcus mutans*, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

講演番号：2A21p04
講演日時、会場：3 月 27 日 14:33～ A 校舎 21 会場

還元力高産生コリネ菌によるペントース-リン酸経路非依存リジン発酵

Lysine production by *Corynebacterium glutamicum* with *Streptococcus mutans*-type redox metabolism

○堀 一将[1]、大谷 幸子[1]、三橋 敏[2]、竹野 誠記[1]、池田 正人[1] ([1]信州大農・応生科、[2]協和発酵バイオ)

○Kazumasa HORI[1], Sachiko OHTANI[1], Satoshi MITSUHASHI[2], Seiki TAKENO[1], Masato IKEDA[1] ([1]Shinshu Univ., [2]Kyowa Hakko Bio)

【背景と目的】 我々は、ミュータンス菌の NADP 完全依存型 GapN 酵素を用いてコリネ菌の解糖系を再構築し、NADPH の産生を、脱炭酸を伴うペントース-リン酸経路でなく解糖系で行うことができる還元力高産生宿主の開発を試みてきた。そのような宿主として造成した GapA と GapN の両用型宿主 RE2A^{iol} 株の性能を、リジン発酵を例に検証した。

【方法と結果】 RE2A^{iol} 株の評価に先立ち、まず、対照株である 2 株、すなわち GapA 株（GapA のみ保有）と RE2 株（GapN のみ保有）のリジン発酵特性を把握するための検討を行った。リジン生産評価（シード：グルコース 2%、本培養：グルコース 5%）は、各々の宿主にリジン生産用プラスミドを導入して、そのリジン力価と発酵時間を菌株間で比較することにより行った。その結果、GapA 株は最適条件で、24 時間以内に発酵を終了でき、リジンを 10%程度の対糖収率で生産できること、一方、RE2 株はその 2 倍強の収率でリジンを生産できる実力を有するも、発酵が 10 時間以上遅延し、この欠点は培養条件では解決できないことを確認した。次いで、GapA と GapN の両用型宿主 RE2A^{iol} 株のリジン発酵特性を解析した。先に検討した至適条件、すなわち、シード培養に少量のイノシトールを添加するだけで、本培養では RE2 株並みの高いリジン収率を維持したまま、発酵時間を GapA 株並に大幅に短縮できることがわかった。

GapA 株、RE2 株、および RE2A^{iol} 株の各々から、ペントース-リン酸経路の初段酵素グルコース 6-リン酸デヒドロゲナーゼの遺伝子 *zwf* の破壊株を造成した。それらのリジン生産試験を行った結果、GapAΔzwf 株のリジン収率が親株（GapA 株）の半分以下に低下したのに対し、RE2Δzwf 株と RE2A^{iol}Δzwf 株のリジン収率は高いまま維持されていた。すなわち、本研究で育種した菌株の高いリジン生産能にペントース-リン酸経路の代謝は不要であることが確かめられた。ペントース-リン酸経路に依存しないリジン発酵はこれが初めてである。

Corynebacterium glutamicum, Lysine production, Pentose phosphate pathway

講演番号：2A21p05
講演日時、会場：3 月 27 日 14:44～ A 校舎 21 会場

Corynebacterium glutamicum におけるストレス応答性遺伝子の解析
Studies on the stress-responsive genes in *Corynebacterium glutamicum*
○竹内 孝志、山内 健太郎、加藤 朋久、児山 雄太郎、佐藤 美咲、橋本 賢一、中松 亘、川崎 寿、夏目 亮（東電大・院・工）
○Takashi TAKEUCHI, Kentaro YAMAUCHI, Tomohisa KATOU, Yutaro KOYAMA, Misaki SATOU, Ken-ichi HASHIMOTO, Tsuyoshi NAKAMATSU, Hisashi KAWASAKI, Ryo NATSUME (Grad. Sch. Eng., Tokyo Denki Univ.)

コリネ型細菌 *Corynebacterium glutamicum* は、Biotin 制限、Penicillin G 添加、Tween 40 添加のストレス条件下において、L-グルタミン酸を過剰に生成するという特性を持つ。本菌はグルタミン酸の工業生産菌として広く知られているが、グルタミン酸過剰生成の詳細な機構については不明な点が多い。我々はコリネ型細菌がグルタミン酸過剰生成誘導条件下でどのような転写レベルでの応答が起きているのか解析するため、DNA マイクロアレイを使いグルタミン酸生産非誘導時と誘導時における遺伝子発現量の変化を測定した。その結果、グルタミン酸生産誘導時に発現量が上昇する 7 つの遺伝子(uk1～7)が見出された。今回我々は、この 7 つの遺伝子のうち特に遺伝子発現量の変化が大きかった 5 つの遺伝子に着目し、破壊株のグルタミン酸生産能と野生株のグルタミン酸生産能を比較した。また、遺伝子破壊によって表現型が現れた uk2 について、破壊株に加えて相補株と増幅株を構築し、グルタミン酸生産性への影響を解析した。

【結果】uk1 遺伝子破壊株では、Penicillin G 添加条件下において野生株に比べグルタミン酸生産能が低下していた。uk2 遺伝子破壊株では、Penicillin G 添加条件下におけるグルタミン酸生産能が uk1 遺伝子破壊株よりも低下していた。これらのことは、Penicillin G 添加条件下におけるグルタミン酸生成に対して uk1、uk2 がポジティブに関与していることを示唆している。このことに着目して、uk2 遺伝子の破壊と増幅の効果について、Penicillin G 添加条件下におけるグルタミン酸生産能を指標として解析した。empty vector を野生株に導入した野生型株を WT+V、uk2 遺伝子とその上流域を vector にクローニングしたプラスミドを野生株に導入して構築した uk2 遺伝子増幅型株を WT+uk2、empty vector を uk2 遺伝子破壊株に導入した uk2 遺伝子破壊型株をΔuk2+V、uk2 遺伝子とその上流域を vector にクローニングしたプラスミドを uk2 遺伝子破壊株に導入して構築した uk2 遺伝子相補型株をΔuk2+uk2 とした。Penicillin G 添加条件下におけるグルタミン酸生産性について、野生型株 WT+V を基準に比較した結果、破壊型株Δuk2+V では低下し、増幅型株 WT+uk2 では向上していた。相補株では糖消費量が低下していた。破壊型株と増幅型株の結果から考えると、uk2 遺伝子はグルタミン酸生産性に対して促進的に働く因子をコードしていると考えられる。

Corynebacterium glutamicum, L-glutamate, stress-responsive gene

講演番号：2A21p06
講演日時、会場：3 月 27 日 15:05～ A 校舎 21 会場

分子動力学シミュレーションに支援された Tween 40 による Corynebacterium glutamicum のグルタミン酸過剰生成誘導機構の解析

Analysis of the induction mechanism of glutamate production using Tween 40 in Corynebacterium glutamicum aided by molecular dynamics simulations

○澤田 康之[1]、橋本 賢一[2]、中松 亘[2]、曽我部 正博[3]、川崎 寿[2] ([1]名大院医、[2]東京電機大工、[3]名大医メカノバイオロジー)
○Yasuyuki SAWADA[1], Ken-ichi HASHIMOTO[2], Tsuyoshi NAKAMATSU[2], Masahiro SOKABE[3], Hisashi KAWASAKI[2] ([1]Nagoya Univ., [2]Tokyo Denki Univ., [3]Mechano Biol. Nagoya Univ.)

【背景および目的】
工業的なグルタミン酸の生産に用いられているCorynebacterium glutamicumは通常の生育条件では細胞外にグルタミン酸を蓄積することはないが、界面活性剤Tween 40を添加することで生育が抑制され、細胞外にグルタミン酸を蓄積する。Tween 40添加によるグルタミン酸過剰生成条件では菌体の脂肪酸含量が低下していることなどが既に報告されているが、その作用点は未だ明確ではない。近年、この微生物のNCgl1221遺伝子がグルタミン酸の過剰生成に深く関与していることが示された。我々はこれまでの研究で、このNCgl1221遺伝子産物が膜張力に依存して開口するメカノセンシティブチャネルであること、ATPなどのエネルギーを使わず、濃度勾配のみによりグルタミン酸を通過させることを明らかにしてきた。本研究はこれまで明確に示されてこなかったTween 40の作用点を解析し、グルタミン酸過剰生成誘導との関係について検討することを目的とした。
【方法及び結果】
通常の生育条件下でのC. glutamicumの脂肪酸（残基）の90%以上はパルミチン酸（約52%）とオレイン酸（約40%）である。Tween 40添加によるグルタミン酸生産条件では非グルタミン酸生産条件と比較し、オレイン酸含量が約41%低下していた。また、この条件でオレイン酸を添加して培養するとグルタミン酸生産が90 %以上抑制された。アセチルCoAカルボキシラーゼの補酵素であるビオチンが欠乏することによって誘導されるグルタミン酸生産条件では、マロン酸を添加して培養することによりグルタミン酸生産量が48 %に抑制されたが、Tween 40添加によるグルタミン酸生産条件ではマロン酸添加によるグルタミン酸生産抑制は見られなかった。この結果はTween 40が脂肪酸合成酵素を阻害することを示唆している。さらに我々は、Tween 40添加が引き起こす脂肪酸組成変化がグルタミン酸過剰生成に及ぼす影響を検討するため、パルミチン酸とオレイン酸の組成比を変えた細胞質膜のモデルを作成し、細胞質膜の脂肪酸組成が変化することでグルタミン酸排出担体であるメカノセンシティブチャネルの開口にどのような影響があるか分子動力学シミュレーションを行った。その結果、エネルギー緩和計算時でMscLの骨格炭素原子に対する平均二乗変位が異なっており、張力発生前から脂質膜混合比の違いによるMscLの熱揺らぎの状態に差が見られた。この結果から、メカノセンシティブチャネルはパルミチン酸とオレイン酸での混合比の違いで開口前からの挙動の違いが見られ、それがその後の開口挙動の差に反映する可能性が示唆される。

mechanosensitive channels, glutamate production, molecular dynamics simulations

講演番号：2A21p07
講演日時、会場：3 月 27 日 15:16～ A 校舎 21 会場

RNA-seq 法による酢酸菌 3 種の酢酸発酵時における代謝戦略の比較解析
Comparative study on metabolic strategy of three kinds of acetic acid bacteria during acetic acid fermentation using RNA-seq analysis.

○松原 拓哉[1]、石川 森夫[1]、兼崎 友[2]、Cristina Andres Barrao[1]、吉川 博文[2,3]、小泉 幸道[1]、貝沼（岡本） 章子[1] ([1]東農大応生科・醸造、[2]東農大・ゲノムセンター、[3]東農大応生科・バイオ)
○ Takuya Matsubara[1], Morio Isikawa[1], Yu Kanesaki[2], Andres Barrao Cristina[1], Hirofumi Yoshikawa[2,3], Yukimichi Koizumi[1], Akiko Okamoto-Kainuma[1] ([1]Dept. Ferment. Sci., Tokyo Univ. Agric., [2]Genome Research Center, Tokyo Univ. Agric., [3]Dept. Biosci., Tokyo Univ. Agric.)

【目的】国内における食酢醸造は、発酵液の表面で酢酸発酵を行う表面発酵法と、発酵液中に通気を行い発酵液全体で酢酸発酵を行う深部発酵法で行われている。前者の発酵菌としては *Acetobacter* 属、後者には *Gluconacetobacter* 属が用いられ、中でも *Acetobacter pasteurianus*、*Acetobacter aceti*、*Gluconacetobacter xylinus* が代表的な発酵菌として用いられている。細胞膜上での酸化発酵及び、細胞内の基幹代謝経路によるエネルギー代謝能を有するこれら 3 種は、エタノールを基質とした場合、酸化発酵による酢酸生成（酢酸発酵）の後、生じた酢酸を細胞内で完全酸化（酢酸過酸化）し増殖する特徴的な二段階生育を共通して示す。しかし、これら 3 種のゲノムスケールでの系統的位置は大きく異なるため、各種の発酵生理も相互に異なる可能性が考えられる。そこで、本研究ではこれら 3 種の酢酸発酵時、酢酸過酸化時におけるトランスクリプトーム解析を、次世代シーケンサーを用いた RNA-seq により行い、種間の共通性や特徴について比較解析を行った。

【方法および結果】食酢醸造用酢酸菌 2 属、3 種、*A. pasteurianus* NBRC 3283、*A. aceti* NRIC 0242^{T}、*G. xylinus* NBRC 3288 について、エタノールを炭素源とした培養における、酢酸発酵期、移行期、過酸化期の 3 点で集菌・RNA 抽出を行い、調製した cDNA ライブラリーを次世代シーケンサーによる RNA-seq に供した。RNA-seq 後のデータはマッピング・正規化し、各種各フェーズでの発現データを得た。これらについて種内で恒常的に発現する遺伝子群を抽出した後、各生育時期で発現変動する遺伝子群について階層的クラスター分析を行った。得られた結果について、酢酸発酵期または過酸化期で特徴的に発現する 2 つのクラスターに着目し、恒常的発現遺伝子群と共に BLAST KOALA を用い、アノテーションを行った。その後、酢酸発酵期および過酸化期における各種の発現挙動の特徴付けを、代謝関連因子に着目して行った。その結果、3 種で共通した特徴として、酢酸発酵期でアミノ酸合成系、過酸化期で TCA サイクルを構成する遺伝子群の顕著な発現の誘導が見られた。このことより、これら酢酸菌の細胞内代謝戦略は、酢酸発酵期においては物質代謝系が亢進し、過酸化期においてはエネルギー代謝系が亢進することが示唆された。またペントースリン酸経路関連酵素については、*Acetobacter* 属 2 種において恒常的な発現が見られた一方、*G. xylinus* では過酸化期において特徴的な発現の誘導が見られた。以上より、これら酢酸菌 3 種は酢酸発酵および過酸化期において、共通した発現挙動を示す遺伝子群を有する一方、それぞれの生育時期において各種に特徴的な代謝戦略を有することが示唆された。

Transcriptome, Acetic acid bacteria, Vinegar production

講演番号：2A21p09
講演日時、会場：3 月 27 日 15:38～ A 校舎 21 会場

酢酸菌 *Acetobacter pasteurianus* NBRC3283 株の酢酸発酵生理における RpoE の機能解析
Function of RpoE in acetic acid fermentation in *Acetobacter pasteurianus* NBRC3283
○原田 佳子[1]、石川 森夫[2]、勝間田 憲子[2]、佐藤 契太[2]、岸 幹也[3]、小泉 幸道[2]、貝沼（岡本） 章子[2] ([1]bits、[2]東農大応生科・醸造、[3]ミツカン・中研)
○Keiko Harada[1], Morio Ishikawa[2], Noriko Katsumata[2], Keita Sato[2], Mikiya Kishi[3], Yukimichi Koizumi[2], Akiko Okamoto-Kainuma[2] ([1]Biomaterial in Tokyo Co., Ltd., [2]Dept. Ferment. Sci., Tokyo Univ. Agric., [3]Central Research Institute, Mizkan Holdings Co., Ltd.)

【目的】食酢醸造に用いられる酢酸菌は細胞表層の酸化酵素によりエタノールを酸化し、細胞外に著量の酢酸を蓄積する（酢酸発酵）。さらに、蓄積した酢酸は細胞内の基幹代謝系で資化され（酢酸過酸化）、酢酸菌は 2 つの代謝様式の連動による特徴的な二段階生育を行う。このように酢酸菌の細胞外環境はエタノール／酢酸の消費や蓄積によって、絶えず変化するため、恒常性維持や細胞表層ストレスへの応答が酢酸菌の生存戦略上重要であることが予測される。一般に、これらの応答に対してはシグマ因子 RpoE が転写調節因子として機能することが知られており、酢酸菌のゲノム上にも本因子がコードされている。しかし、酢酸菌における本因子と酢酸発酵生理との関連は全く明らかにされていない。そこで本研究では、*Acetobacter* 属酢酸菌を用いて本菌 RpoE の機能について検証を行うことを目的とした。
【方法および結果】*Acetobacter pasteurianus* NBRC3283 株を供試菌株として使用した。本菌の *rpoE* および関連因子は（推定アンチアンチシグマ-*rpoE2*-*rpoE1*-推定アンチシグマ-ヒスチジンキナーゼ）の形でゲノム上に配座しており、他種酢酸菌と共通して 2 つの *rpoE* 遺伝子がタンデムに配座する特徴を有していた。これら遺伝子の転写様式を明らかにするため、エタノール培養時、各生育時期におけるこれら因子の転写挙動解析を半定量 RT-PCR 法により行った。その結果、細胞外に酢酸が蓄積した移行期から酢酸過酸化期において、*rpoE1* および推定アンチシグマがポリシストロニックに高発現し、これら生育時期における *rpoE1* の菌体生理への関与が推察された。*rpoE1* の転写開始点について 5’RACE 法による解析を行った結果、本因子は開始コドンの 27 塩基上流に転写開始点を有していた。さらに、本転写開始点上流に推定 RpoE プロモーター認識配列を確認したことから、本因子は自己依存的に転写制御されることが示唆された。酢酸発酵生理における本因子の関与について検討するため、本菌 *rpoE1* 破壊株を構築し、親株との間で生育挙動の比較を行ったところ、過酸化期後期以降、*rpoE1* 破壊株における生菌数の顕著な減少を観察した。以上のことから、本菌における RpoE は酢酸過酸化期以降におけるストレス応答シグマ因子として機能し、同生育時期における生育能または生存能に大きく関与する可能性が示唆された。

Acetobacter pasteurianus, *rpoE*, acetic acid fermentation

講演番号：2A21p10
講演日時、会場：3 月 27 日 15:49～ A 校舎 21 会場

2-ケト-D-グルコン酸脱水素酵素の異種発現による *Gluconobacter japonicus* での効率的 2,5-ジケト-D-グルコン酸生産

Efficient production of 2,5-diketo-D-gluconate by heterologous expression of 2-keto-D-gluconate dehydrogenase in *Gluconobacter japonicus*

○片岡 尚也、松谷 峰之介、藥師 寿治、松下 一信（山口大農）
○Naoya KATAOKA, Minenosuke MATSUTANI, Toshiharu YAKUSHI, Kazunobu MATSUSHITA (Yamaguchi Univ.)

【背景・目的】酢酸菌は, ペリプラズム領域に多種多様な膜結合型酵素を保有しており, その働きにより様々な糖類やアルコール類を不完全に酸化するユニークな酸化反応を行う。本反応は酸化発酵と呼ばれ, ビタミン C の工業生産や食酢製造といった産業の場で広く利用されている。代表的な酢酸菌 *Gluconobacter* 属の行う酸化発酵に, D-グルコースを初発基質として複数の膜結合型酵素が連続的に機能して成立するケトグルコン酸発酵がある。本発酵系は, *Gluconobacter* 属に普遍的に保存されている能力であるが, 株間で最終代謝産物が異なるという特徴を持つ。特に, 限られた菌株が最終代謝産物とする 2,5-ジケト-D-グルコン酸は, ビタミン C 合成の重要中間体としての価値を持つことが知られている。そこで本研究では, *Gluconobacter* 属を宿主とした効率的な 2,5-ジケト-D-グルコン酸生産を試みたので報告する。

【方法・結果】*Gluconobacter oxydans* NBRC 3293 は, D-グルコースから D-グルコン酸, さらに 2-ケト-D-グルコン酸を経由して 2,5-ジケト-D-グルコン酸を生産することが知られている。そこで, *G. oxydans* NBRC 3293 の 2,5-ジケト-D-グルコン酸生産能を評価するため, *G. oxydans* NBRC 3293 を D-グルコース及び D-グルコン酸を基質とした発酵培地で培養した。その結果, 2,5-ジケト-D-グルコン酸の生産は確認されたが, 基質の一つである D-グルコン酸が残存し, それが生産効率を低下させていることが明らかになった。つまり, D-グルコン酸の速やかな 2-ケト-D-グルコン酸への酸化が, 2,5-ジケト-D-グルコン酸生産の効率化につながると考えられた。本研究室では *Gluconobacter japonicus* NBRC 3271 Δ*sldA* が, D-グルコース及び D-グルコン酸から化学量論的に 2-ケト-D-グルコン酸を生産し得ることを過去に報告した (1)。そこで, *G. japonicus* NBRC 3271 Δ*sldA* で *G. oxydans* NBRC 3293 由来の 2-ケト-D-グルコン酸脱水素酵素をコードする遺伝子 *kgdSLC* を高発現する株を作製し, *G. oxydans* NBRC 3293 と同様の方法で 2,5-ジケト-D-グルコン酸生産を評価した。その結果, D-グルコン酸の残存はなく, 化学量論的に 2,5-ジケト-D-グルコン酸を生産することに成功した。

1. Toyama, H., *et al*., 2007. Membrane-bound, 2-keto-D-gluconate-yielding D-gluconate dehydrogenase from "*Gluconobacter dioxyacetonicus*" IFO 3271: Molecular properties and gene disruption. *Appl. Environ. Microbiol.* 73 (20), 6551-6556.

Gluconobacter, 2,5-diketo-D-gluconate, 2-keto-D-gluconate dehydrogenase

講演番号：2A21p11
講演日時、会場：3 月 27 日 16:10～ A 校舎 21 会場

酢酸菌 *Gluconobacter oxydans* の膜結合型キナ酸脱水素酵素の高発現

Functional overexpression of membrane-bound quinate dehydrogenase from *Gluconobacter oxydans*

○小松 和貴[1]、吉原 望[1]、今村 志穂実[2]、片岡 尚也[1]、薬師 寿治[1]、足立 収生[1]、松下 一信[1]([1]山口大農、[2]協和発酵バイオ)

○Kazutaka KOMATSU[1], NOZOMI YOSHIHARA[1], SHIHOMI IMAMURA[2], NAOYA KATAOKA[1], TOSHIHARU YAKUSHI[1], OSAO ADACHI[1], KAZUNOBU MATSUSHITA[1] ([1]Yamaguchi Univ., [2]KYOWA HAKKO BIO)

シキミ酸は芳香族アミノ酸生合成経路の共通中間体である。分子内に炭素六員環構造と、3 つの不斉炭素を有し、特に抗インフルエンザ薬であるタミフルの合成原料として産業上重要な化合物である。現行のシキミ酸の生産方法としては植物のトウシキミからの抽出、大腸菌を用いた発酵法が知られている。インフルエンザ流行に備えるタミフルの需要の増大を考えると、シキミ酸の安定的かつ安価な供給が求められる。

酢酸菌 *Gluconobacter oxydans* は絶対好気性菌であり、高濃度の糖やアルコールを様々な糖酸、有機酸に酸化的に変換して高濃度で蓄積する。*G. oxydans* NBRC 3244 と NBRC 3293 株はキナ酸からのシキミ酸発酵を行う可能性を有している。第一段階として、本菌の細胞質膜のペリプラズム側に構成されるキナ酸酸化系呼吸鎖によって、キナ酸が 3-デヒドロキナ酸へ酸化される。次に 3-デヒドロキナ酸がデヒドロキナ酸脱水酵素により 3-デヒドロシキミ酸へ変換される。最後に NADPH の酸化と共役して、シキミ酸脱水素酵素により、3-デヒドロシキミ酸が還元されシキミ酸が生成される。この経路の第一段階を担うキナ酸脱水素酵素(QDH)はピロロキノリンキノン (PQQ)を補欠分子族として持つ膜結合型タンパク質である。本シキミ酸合成法にはいくつかの課題があるが、特に QDH が本法の最終産物であるシキミ酸を基質とし、3-デヒドロシキミ酸へ再酸化してしまうことが問題となっている。この問題を克服するために、QDH の生化学的特性を理解する必要がある。本研究は QDH の生化学的解析を目的として、QDH 高発現株の構築を行った。

NBRC 3244 株と NBRC 3293 株の QDH のアミノ酸配列が 7 アミノ酸異なっていた。これら 2 菌株由来の QDH の発現系構築をそれぞれ行った。その際、QDH の翻訳開始部位として二ヶ所の TTG が予想されたので、二つとも含む発現プラスミドと一つしか含まないものを構築した。これらはいずれも QDH を発現したが、翻訳開始部位を二つとも含む発現プラスミドの方が高発現であった。次に、予想される二つの翻訳開始部位 TTG に、それぞれ ATG または CTC の塩基置換実験を開始した。本来の翻訳開始部位である ATG に変換することで、QDH がさらに高発現されることが予想され、CTC に変換することで翻訳開始部位がなくなり、QDH が発現しなくなることが予想される。これらの予想の下、塩基置換を行い、翻訳開始部位の同定とさらなる高発現化を試みている。また、高発現株の細胞膜を用いて、キナ酸とシキミ酸に対する K_M 値を求めた。*G. oxydans* NBRC 3293 株の QDH はキナ酸、シキミ酸ともに NBRC 3244 のものよりも高い K_M 値を示した。

Gluconobacter oxydans, Quinate dehydrogenase, Shikimate fermatation

講演番号：2A21p12
講演日時、会場：3 月 27 日 16:21～ A 校舎 21 会場

酢酸菌 *Acetobacter pasteurianus* SKU1108 の持つ 2 種類の膜結合型アルデヒド脱水素酵素の機能解析

Function of two membrane-bound aldehyde dehydrogenases in *Acetobacter pasteurianus* SKU1108

○新納 俊[1]、福成 聖也[1]、児玉 知大[1]、松谷 峰之介[1]、片岡 尚也[1]、薬師 寿治[1]、Gunjana Theeragool[2]、松下 一信[1] ([1]山口大農、[2]カセサート大理)

○Shun Niina[1], Seiya Fukunari[1], Tomohiro Kodama[1], Minenosuke Matsutani[1], Naoya Kataoka[1], Toshiharu Yakushi[1], Gunjana Theeragool[2], Kazunobu Matsushita[1] ([1]Yamaguchi Univ., [2]Kasetsart Univ.)

【背景・目的】酢酸発酵は酢酸菌によるアルコールの酸化により行われる。この経路は膜結合型酵素であるアルコール脱水素酵素 (ADH)とアルデヒド脱水素酵素 (ALDH)の触媒する連続的な酸化反応により進行する。遺伝子情報から、ALDH は 3 つのサブユニットから成り、molybden-molybdopterin cytosine dinucleotide (Mo-MCD)を含む脱水素酵素サブユニット、3 つのヘム C を含みユビキノンと反応するシトクロムサブユニット、[Fe-S] cluster を含む電子伝達サブユニットであると考えられる。タイで単離された *Acetobactor pasteurianus* SKU1108 のゲノム情報から、本菌には 2 つの ALDH 遺伝子が見出された。両酵素の機能比較、および酢酸発酵における役割を明らかにすることを目的に本研究を行った。

【結果】*A. pasteurianus* SKU1108 が持つ２つの ALDH の系統関係を明らかにするため、多くの酢酸菌に存在する ALDH 遺伝子を用いて系統解析を行った。結果、これら２つの ALDH は分子系統学的に異なることが示唆された。そこで、既報の ALDH に近縁な方を AldFGH, 新規 ALDH を AldSLC と名付けた。

AldSLC と AldFGH の解析を行うために、AldSLC または AldFGH のみを過剰に発現する株 (⊿*adhAB* ⊿*aldSLC*/pTK10 (*aldFGH*)株ならびに⊿*adhAB* ⊿*aldFGH*/pNS2 (*aldSLC*)株) を構築し、それらの細胞膜を用いて解析を行った。AldFGH の至適 pH は 4.0、AldSLC は pH 5.0 であった。また、AldSLC は AldFGH と比較してアセトアルデヒドに対し高い Km 値を示した。各 ALDH の基質特異性を検討した。両者の基質特異性は互いに似ていたが、isobutyraldehyde と glycolaldehyde dimer に対しては AldFGH の方が AldSLC よりも大幅に高い活性を示した。

次に、AldSLC と AldFGH の酢酸発酵における機能を解析するため、⊿*aldH*株と⊿*aldSLC*株を構築し、酢酸発酵試験を行った。野生株は良好な酢酸生産を行い、アセトアルデヒドをほとんど蓄積しなかった。⊿*aldH* 株と⊿*aldSLC* 株は著しい生育の悪化がみられた。この時、多量のアセトアルデヒドが培地中へ蓄積していた。次にこれらの菌株に対し、それぞれの ALDH を供給し、AldSLC のみ、ならびに AldFGH のみを過剰発現する菌株を作製した。AldSLC のみを過剰発現すると、生育がわずかに回復し、アセトアルデヒドの蓄積量も減少したが、野生株には及ばなかった。AldFGH を過剰発現すると野生株並みの酢酸発酵能を示した。このことから、AldSLC と AldFGH の両方が酢酸発酵において重要な役割を担っているが、AldFGH の方がより貢献度が大きいことが示唆された。

aldehyde dehydrogenase, acetic acid fermentation, *Acetobacter pasteurianus*

講演番号：2A21p13
講演日時、会場：3 月 27 日 16:32～ A 校舎 21 会場

高温適応育種された酢酸菌 *Acetobacter pasteurianus* の遺伝子工学的変異解析

Validation of the genetic valiations in the thermally adapted *Acetobacter pasteurianus* strains by genetic engineering

○谷本 陽子[1]、西倉 慎顕[1]、松谷 峰之介[1]、片岡 尚也[1]、Gunjana Theeragool[2]、薬師 寿治[1]、松下 一信[1] ([1]山口大農、[2]Kasetsart 大理)
○Yoko TANIMOTO[1], Mitsuteru NISHIKURA[1], Minenosuke MATSUTANI[1], Naoya KATAOKA[1], Theeragool Gunjana[2], Toshiharu YAKUSHI[1], Kazunobu MATSUSHITA[1] ([1]Yamaguchi Univ., [2]Kasetsart Univ.)

【背景・目的】
酢酸菌はエタノールからの酢酸発酵を行う。耐熱性の酢酸菌は、発酵時の温度制御の管理や冷却コストの削減、汚染菌の減少が見込まれ、発酵産業への貢献が期待される。本研究で用いている *Acetobacter pasteurianus* SKU1108 は 37℃でも酢酸を生産し、蓄積された酢酸に対して耐性を持つ。私たちは、酢酸発酵条件下において、SKU1108 を用いた高温適応育種を二通りの方法で行い、独立に高温適応育種株を取得した。39℃で継代培養を行うことで、より高温で酢酸発酵可能な耐熱性株 TI を得た。また、38.5℃から 0.5℃ずつ段階的に温度を上げて適応育種し、39.5℃で単離したものを TH-1 とし、それをさらに高温適応育種して、40℃で単離したものを TH-3 とした（Matsutani et al (2013). J. Biotech. 165: 109)。3 つの耐熱性株の変異を解析したところ、TI には 6 ヶ所の、TH-1 には 4 か所の、TH-3 には 11 ヶ所の変異が起こっていることを見出した。本研究は、これらの変異の中から本菌の耐熱性に関与している有効変異を特定することを目的とした。
【方法・結果】
耐熱性株において変異がみられた遺伝子群のうち、破壊的な変異であった 3 つの遺伝子に着目し、SKU1108 野生株から、それぞれインフレーム破壊株を作製した。三種類の破壊株のうち、2 つの破壊株は、野生株と比較して耐熱性を獲得していた。その一方で、それら破壊株のいずれも、適応育種で得られた TH-3、TH-1、TI と同じレベルの耐熱性には至らなかった。適応育種変異株は育種の過程で生じた複数の変異の複合的な作用によって、高い耐熱性を獲得したものと考えられる。そこで、耐熱性への有効変異であることが明らかになった 2 つの遺伝子を同時に破壊した、二重破壊株の作製を行った。二重破壊株は、それぞれの遺伝子単独破壊株と比較してより高い耐熱性を示したが、やはり TH-3、TH-1、TI と同じレベルの耐熱性には至らなかった。さらなる有効変異を特定するために、TH-3 に 6 塩基欠失の変異が起こっていた 2 つの遺伝子に着目した。野生型あるいは TH-3 由来で 6 塩基欠失を含む変異型遺伝子をクローニングしたプラスミドを SKU1108 野生株にそれぞれ導入し、耐熱性の比較を行った。2 つのうち、一つの変異遺伝子が耐熱性の向上に関与していることを見出した。現在、二重破壊株に 6 塩基欠失遺伝子を持つプラスミドを導入した菌株を作製し、耐熱性の検証をしているので、その結果も含めて報告したい。
本研究は、JST-ALCA プロジェクトの一環として行われた。

Acetobacter, thermotolerance

講演番号：2A21p14
講演日時、会場：3 月 27 日 16:43～ A 校舎 21 会場

非温度制御グルタミン酸発酵に向けた耐熱性コリネ型細菌の開発

Development of thermo-tolerant *Corynebacterium glutamicum* for temperature-independent glutamic acid fermentation

○野中 大輝[1]、鶴岡 史也[1]、ナンタポーン ナワラート[2]、松谷 峰之介[1]、片岡 尚也[1]、薬師 寿治[1]、松下 一信[1] ([1]山口大農、[2]スラナリー工科大学)
○Daiki NONAKA[1], Fumiya TSURUOKA[1], Nawarat NANTAPONG[2], Minenosuke MATSUTANI[1], Naoya KATAOKA[1], Toshiharu YAKUSHI[1], Kazunobu MATSUSHITA[1] ([1]Yamaguchi Univ., [2]Suranaree Univ Tech.)

【背景・目的】*Corynebacterium glutamicum* はグラム陽性の好気性菌であり、グルタミン酸生産能を有することから産業的なアミノ酸生産に用いられている。一般に、産業的なグルタミン酸生産は冷却しながら 30°C 付近で行われている。しかし、発酵生産の際に生じる発酵熱や外気温の上昇による影響で発酵槽内の温度上昇が生じその制御が不十分であると、菌の生育およびグルタミン酸発酵の劇的低下を招く。本研究では冷却システムを必要とせず、しかも常温から高温にわたる広い温度域でのグルタミン酸生産が可能な菌株の創成を目的としている。この目的を達成するために、耐熱性を有する菌株を育種するとともに、温度非依存的にグルタミン酸排出を行う能力を有する菌株を造成することを目指している。
【方法・結果】タイで単離された耐熱性株の中から 40°C で良好に生育できる高い耐熱性を有する *C. glutamicum* N24 株を分離した。この N24 株よりさらに高い耐熱性を有する株を取得するため、その生育限界温度である 41°C で N24 の高温適応育種を行った。得られた耐熱化株 FT-1 は、N24 との比較培養の結果、より高温下で生育可能で、この高温条件下でグルタミン酸の高い生産能を示した。しかし、N24 および FT-1 両株のグルタミン酸生産は、ともに生育に影響を及ぼすような限界温度域のみで観察され、低温度域では確認されなかった。一方、ビオチン制限処理（30 μg/L から 0.5 μg/L）を行うことによって、より低温下でグルタミン酸生産がみられるようになったが、同時に、菌株の生育も著しく低下した。
次に、本菌において、グルタミン酸排出に関わると予想される Mechanosensitive channel (MSC) ホモログ遺伝子を探索し、その欠損株を作製すると、グルタミン酸生産が著しく低下したため、この MSC 遺伝子が本菌においてもグルタミン酸排出を担っていることが示唆された。現在、この MSC の遺伝的改変を進めており、ビオチン制限などの誘導処理に依存することなく、広温度域でグルタミン酸の排出が可能な菌株の育種を進めている。

本研究は、JST-ALCA プロジェクトの一環として行われた。

Corynebacterium glutamicum, thermo-tolerance, Mechanosensitive channel

講演番号：2A21p15
講演日時、会場：3 月 27 日 16:54～ A 校舎 21 会場

酢酸菌に見いだされた初めての溶原性ファージ

The first lysogenic bacteriophage identified in acetic acid bacteria

○小俣 行輝[1]、日比 徳浩[2]、中野 繁[2]、天野 昭一[1]、高野 英晃[1]、上田 賢志[1]([1]日大生資科・生命セ、[2]株式会社 Mizkan Holdings 中央研究所)
○Koki OMATA[1], Naruhiro HIBI[2], Shigeru NAKANO[2], Shoichi AMANO[1], Hideaki TAKANO[1], Kenji UEDA[1] ([1]Nihon Univ., [2]Central Research Institute, Mizkan Holdings Corporation)

【経緯と目的】

食酢は酢酸菌が行う酢酸発酵によって醸造される。その過程で突発的に醗酵不良が発生し、食酢の生産に深刻な影響を及ぼすことがある。このときの醗酵不良液を電子顕微鏡により観察すると、バクテリオファージと思われる粒子が認められた。このことから醗酵不良の一つの原因は、醗酵槽内のファージ汚染によるものと考えられた。しかしながら、酢酸菌のファージに関する報告例は極めて乏しい。そこで本研究では、公的機関に保存されている酢酸菌について、特に溶原性ファージに着目してその実態を明らかにすることを目的とした。

【方法と結果】

公的機関に保存されている計 208 株の酢酸菌を対象として溶原性ファージを探索した。1 次スクリーニングとして、溶原性ファージの誘発剤であるマイトマイシン C（以下 MMC）を低濃度（1.0～4.0 γ）で含む固体培地に酢酸菌を植菌し、感受性を示した菌株を選別した。2 次スクリーニングでは、液体培養における MMC 感受性株を選別した。選別菌株に由来するファージの存在を確認するために、MMC 処理菌株の培養上清をポリエチレングリコールにより濃縮し、透過型電子顕微鏡で観察した。その結果、25 株の酢酸菌の培養液中に様々な形態のファージを観察することに成功した。取得した溶原株のうち、食酢生産に関与する *Acetobacter pasteurianus* の染色体およびファージゲノム DNA についてその全塩基配列を解読した。その結果、溶原株の染色体にファージゲノム DNA と同一の配列が見いだされ、それがプロファージ領域であることが推察された。プロファージ末端をプライマーに用いた PCR 法によって、誘発されたファージゲノムが環状であることを確認した。次に、ファージの宿主への感染系を確立するために *A. pasteurianus* からプロファージ領域のキュアリングを試みた。キュアリング株を取得するために、MMC 処理した本菌株の菌液を培地に塗抹して MMC 耐性を示すコロニーを単離した。単離コロニー1,200 株より、PCR 法によりプロファージ領域が欠失したキュアリング株を 1 株取得した。本キュアリング株を用いてファージの感染試験を行ったが、現在のところ再感染株の取得には至っていない。一方、MMC 処理したキュアリング株の培養液にはファージ粒子が認められないことから、同定したプロファージがその本体であることが明確になった。本研究は、酢酸菌に由来する溶原性ファージの実態を具体的に明らかにした初めての例である。

lysogenic phage, acetic acid bacteria, prophage

講演番号：2A21p16
講演日時、会場：3 月 27 日 17:15～ A 校舎 21 会場

Characterization of unique cryptic plasmids in *Gluconacetobacter europaeus*

○Wiwik Astuti[1], Naoki Akasaka[2], Yuri Ishii[1], Hisao Sakoda[2], Shinsuke Fujiwara[1] ([1]Kwansei Gakuin Univ., [2]Marukan Vinegar.Co.Ltd.)

Gluconacetobacter europaeus is one of acetic acid bacteria (AAB) that is widely used for the industrial production of vinegar. Recently, a targeted gene disruption system using an endogenous *pyrE* gene as a selectable marker has been established[1)]. However, despite its significance in vinegar production, various genetic aspects of *G. europaeus*, such as native cryptic plasmids, still remain unclear. Genome analyses of other AAB have revealed the presence of numerous native cryptic plasmids[2)], and several recombinant plasmids have been constructed from them and used as shuttle vectors with *Escherichia coli*[3)]. Native plasmids from *G. europaeus* and their derivatives are hence expected useful for genetic engineering of the AAB.

Three kinds of native cryptic plasmids designated as pGE1 (2.5 kb), pGE2 (7.2 kb), and pGE3 (5.5 kb) have been isolated from *G. europaeus* KGMA0119[2)]. Nucleotide analyses predicted that some of genes on the plasmids encode for a protein with specific functions, such as replication and stabilization of plasmids. Plasmid copy numbers (PCNs) of the three plasmids at the different stages of growth were monitored by real-time quantitative PCR. When KGMA0119 was cultured in the presence of 0.5% acetic acid, PCN of pGE1 increased from 7 copies/genome in the logarithmic phase of growth to a maximum of 12 copies/genome at the beginning of the stationary phase, before decreasing to 4 copies/genome in the late stationary phase. PCNs for pGE2 and pGE3 were maintained at 1−3 copies/genome during all the phases of growth. PCN for pGE1 at the logarithmic phase increased to 10 copies/genome in response to higher concentration (1.0%) of acetic acid, suggesting that some genes encoded by pGE1 are involved in the resistance and catabolism of acetic acid. Then, recombinant plasmids pBE2 and pBE3 were constructed by ligating linearized pGE2 and pGE3 into pBR322. Both plasmids replicated in *E. coli*, *Acetobacter pasteurianus*, *Gluconacetobacter obediens*, and *G. europaeus*, and conferred ampicillin resistance on them, highlighting their suitability as genetic tools for AAB. Curing was then attempted by sub-culturing of KGMA0119 harboring pBE3 in the absence of ampicillin, and the pGE3/pBE3-free strain (KGMA0119C3) was successfully isolated. Combined with pBE3, the strain KGMA0119C3 is a potent platform for the genetic engineering of *G. europaeus*[4)].

【References】1. Akasaka et al, Appl. Environ. Microbiol., 79, 7334 (2013). 2. Azuma et al, Nucleic Acids Res., 37, 5768 (2009). 3. Okumura et al, Agric. Biol. Chem., 49, 1011 (1985). 4. Akasaka et al, J. Biosci. Bioeng., in press.

Gluconacetobacter europaeus, plasmid curing, plasmid copy number

講演番号：2A21p17
講演日時、会場：3 月 27 日 17:26～ A 校舎 21 会場

代謝改変酢酸菌によるショウジョウバエ誘引性素材の開発

Development of fruit fly attractant using metabolically engineered acetic acid bacteria

○合田 慈子[1]、赤坂 直紀[2]、石井 友理[1]、佐古田 久雄[2]、藤原 伸介[1]([1]関西学院大理工、[2]マルカン酢)

○Itsuko GODA[1], Naoki AKASAKA[2], Yuri ISHII[1], Hisao SAKODA[2], Shinsuke FUJIWARA[1] ([1]Kwansei Univ., [2]Marukan Vinegar Co. Ltd.)

Drosophila melanogaster に代表されるショウジョウバエは、腐敗果実・食品に寄生して繁殖するため、都市部における不衛生指標の一つとして認知されている。近年の消費者動向に応じ、化学薬品より安全な天然素材や発酵食品を原料としたショウジョウバエ捕虫装置が販売される様になった。それら素材の中でも、食酢は特に強いショウジョウバエ誘引作用を有しているため、捕虫器誘引剤として広く利用されている。食酢に含まれる揮発性成分のうち、 バター様の重い臭気を有するアセトインは、主成分である酢酸と相乗的に機能し、強力な誘引効果を発揮する事が知られている[1)]。従って、著量のアセトインを含有する食酢を用いる事で、より効率的な捕虫器開発が期待される。我々は先行研究において、食酢工業生産に広く用いられている酢酸菌 *Gluconacetobacter europaeus* における遺伝子破壊技術を確立すると同時に、同酢酸菌のアセトイン合成経路を同定した[2)]。食酢のショウジョウバエ誘引効果を増強するため、*G. europaeus* の代謝改変を行う事で複数のアセトイン高生産株を作出した。先の報告において、それら代謝改変酢酸菌の培養液が、野生株の培養液よりも強い誘引作用を有する事を述べた[3)]。それらのうち、アミノ酸代謝に関与する遺伝子群の発現を包括的に制御する転写因子 leucine responsive regulatory protein (*Ge*Lrp)の、C 末端側に位置するリガンド結合部位を特異的に欠損させた KGMA7203 株(Δ*pyrE Gelrp*Δ(397-511)::*pyrE*)[4)]の培養液は、野生株 KGMA0119 株を含めた他株の培養液と比較し、極めて強いショウジョウバエ誘引作用を示した。ガスクロマトグラフィー及び液体クロマトグラフィーによる成分分析の結果、同株培養液の強力な誘引効果は、酢酸、アセトインに加え、同株のみが産生する微量のイソ酪酸の相乗効果に起因する事が推測された。これを検証するため、野生株培養液にアセトイン及びイソ酪酸を添加する事で KGMA7203 株培養液を模したものを調製し、そのショウジョウバエ誘引効果を *D. melanogaster* を用いた捕虫実験により解析した。その結果、両揮発性成分を添加した野生株培養液は、非添加のものよりも多くのショウジョウバエを捕捉したが、その誘引効果は、KGMA7203 株培養液よりも依然低かった。この結果は、KGMA7203 株培養液の誘引効果が、酢酸、アセトイン、イソ酪酸に加え、誘引作用を有する未知の代謝産物に起因する事を示唆するものであり、現在それらを同定するための解析を行っている。

【引用文献】1. Cha et al., Pest Manag. Sci., 70, 324 (2014). 2. Akasaka et al., Appl. Environ. Microbiol., 79, 7334 (2013). 3. 赤坂ら, 日本農芸化学会 2014 年度大会. 4. Akasaka et al., J. Biosci. Bioeng., 118, 607 (2014).

acetic acid bacteria, fruit fly, fly trapping

講演番号：2A21p18
講演日時、会場：3 月 27 日 17:37～ A 校舎 21 会場

東京都産パッションフルーツ果汁を用いた醸造酢の開発

Vinegar brewing from passion fruits cultivated in Tokyo Prefecture

○保坂 三仁、細井 知弘、宮森 清勝、西木 秀人、三枝 弘育（東京都立食技セ）
○Mitsuhito HOSAKA, Tomohiro HOSOI, Kiyokatsu MIYAMORI, Hideto NISHIKI, Hiroyasu SAEGUSA (Tokyo Metro. Food Tech. Res. Ctr.)

【目的】　パッションフルーツは，東京都内において，主に小笠原父島・母島などの島しょ地域で栽培が行われ，生果だけでなく，加工品の需要も高まっている。今回，パッションフルーツ果汁の風味を生かした醸造酢の製造について検討を進めたところ，発酵開始前の果汁の濃度と pH 値の調整が発酵の進行および生成するパッションフルーツ酢の品質に影響を及ぼすことが明らかとなったので報告する。

【方法と結果】　パッションフルーツ台農 1 号（2011 年 小笠原島産）の冷凍果実（－20℃）を解凍し，果皮と種子を除去して得られた果汁を（pH 2.9, Brix 17, 野生酵母 約 10^6 cfu/mL），72℃，20 分間加熱殺菌して，以下の試験に供した。

試験① エタノール（EtOH）添加果汁の酢酸発酵　果汁に 9%重量の Glucose を添加後（Brix 24%, この果汁の濃度を 1×と示す），計 12 試験区の果汁を調製した（果汁濃度 1×, 1/2×（2 倍希釈）; 初発 pH 3.0, 4.5, 6.0（重曹添加）; 遠心分離処理による繊維分除去の有無）。各果汁に EtOH（最終濃度 5.0%）および酢酸菌 *Acetobacter pasteurianus* NBRC 3283（初発 10^7 cfu/mL）を添加して，30℃にて振とう培養を行った。それらを経時的に採取し，pH 値，滴定酸度，有機酸濃度，酢酸菌数を測定した。その結果，初発 pH 値と果汁濃度に依存して，酢酸発酵の進行の程度が異なり，初発果汁濃度 1/2×，pH 4.5 の試験区において最も酢酸酸度と酢酸菌の菌数が上昇した。繊維分の有無は，発酵の進行に影響を与えなかった。

試験② 果汁のアルコール・酢酸 二段発酵　計 10 試験区の果汁を調製し（果汁濃度 100%, 50%; 初発 pH 3.0～5.0, 5 段階（重曹添加）; Glucose 無添加），*Saccharomyces cerevisiae* EC1118（Lallemand）を添加して（初発 10^6 cfu/mL），20℃にて静置した。果汁濃度 100%の各試験区から，発酵時間を変化させて EtOH 濃度 約 5.0%, 7.0% 計 10 種（一部 EtOH 添加により調整）のパッションフルーツ酒を得た。果汁濃度 50%の各試験区からは，EtOH 濃度 約 3.5%の計 5 種のパッションフルーツ酒を得た。それぞれを濾過後に，*A. pasteurianus* NBRC 3283 を添加し，30℃にて静置した。それらを経時的に採取し，試験①と同様に各種測定を行った。その結果，1）果汁濃度 100%・初発 pH 4.0～4.5・アルコール発酵後の EtOH 濃度 5.0 および 7.0%の各試験区，2）果汁濃度 50%・初発 pH 3.5～5.0・同 EtOH 濃度 3.5%の各試験区においてのみ，酢酸酸度 3.5%以上の酢が得られた。また風味については，果汁濃度 100%・初発 pH 4.0・同 EtOH 濃度 5.0%試験区のパッションフルーツ酢が最も優れていると官能的に判断した。

Passion fruit vinegar, *Acetobacter pasteurianus*, *Saccharomyces cerevisiae* EC1118

講演番号：2A21p19
講演日時、会場：3 月 27 日 17:48～ A 校舎 21 会場

キムチの微生物群集構造に与える発酵温度と発酵期間の影響

Effects of fermentation temperature and period on microbial community structures in Kimchi

○鈴木 彩香[1]、天知 誠吾[1]、吉永 朱里[1]、大宮 亜沙美[1]、李 営克[1]、本間 崇[2]、中村 茉莉子[2]、柳澤 康平[2]、安藤 昭一[1] ([1]千葉大院、[2]美山)
○Ayaka Suzuki[1], Seigo Amachi[1], Akari Yoshinaga[1], Asami Omiya[1], Yingliang Li[1], Takashi Homma[2], Mariko Nakamura[2], yasuhira Yanagisawa[2], Akikazu Ando[1] ([1]Grad. Sch. Horticul., Chiba Univ., [2]MIYAMA CO., LTD.)

【背景と目的】
キムチは白菜などの野菜を塩、唐辛子、ニンニク、魚介塩辛などと共に乳酸発酵させた食品である。キムチ中の乳酸菌は主に原材料の野菜や塩辛に由来し、原材料の種類や発酵温度、発酵期間など種々の因子が乳酸菌群集構造を変化させ、製品の味や品質に影響を与えるものと考えられる。一方、キムチ中には酵母も存在し、風味や香気成分の生成に働くが、ガス発生による容器の膨張など望ましくない現象の原因ともなっている。本研究では、キムチのより安定的な製造プロセスの確立を目的として、まず発酵温度と発酵時間が微生物群集構造に与える影響を解析した。また、キムチ中で優占して存在する微生物の優占メカニズムの解明も試みた。

【方法】
3 種類のキムチ（A、B、C）を 4°C および 15°C で 56 日間発酵させた。7 日ごとにサンプリングを行い、乳酸菌は GYP 培地、酵母は YPD 培地を用いてそれぞれ優占種を分離した。単離した乳酸菌と酵母は、16S rRNA 遺伝子および 26/28S rRNA 遺伝子に基づき簡易同定を行った。また培養に依存しない方法として、PCR-DGGE による群集構造解析も行った。

【結果】
発酵期間の長期化に伴い、いずれのキムチにおいても pH の低下が進行し、15°C で発酵した場合には pH3.5 以下に達した。一方、4°C で発酵した場合は pH4.0 以下には低下しなかった。キムチ A および B において、発酵温度は乳酸菌の存在量（10^6～10^7 CFU g^{-1}）に影響を与えなかったが、キムチ C では 4°C 発酵時の乳酸菌存在量（10^4～10^5 CFU g^{-1}）が顕著に低い結果となった。培養法により確認された優占種は、4°C では *Lactobacillus sakei* および *Leuconostoc mesenteroides* であったが、15°C では *Lb. plantarum* と *Lb. brevis* であった。一方、PCR-DGGE で確認された優占種は *Lb. sakei* および好冷性乳酸菌として知られる *Lc. gelidum* で、培養法とは異なる結果となった。全てのキムチにおいて、発酵の長期化に伴い酵母が最大で 10^5 CFU g^{-1} 出現したが、その存在量は 4°C 発酵でより低い傾向があった。また、分離された酵母は全て *Kazachstania exigua* に近縁であった。現在、PCR-DGGE による酵母の群集構造解析を進めている。分離した微生物を用いた生育試験より、キムチ中で優占する菌種の優占メカニズムとして、低温耐性、耐酸性、果糖利用能などの因子が考えられた。

Kimchi, lactic acid bacteria, yeast

講演番号：2A21p20
講演日時、会場：3 月 27 日 17:59～ A 校舎 21 会場

豆乳凝固酵母 *Saccharomyces bayanus* SCY003 株によって生成された豆乳凝固物の物性と特徴

The physical properties of soybean milk curd producing *Saccharomyces bayanus* SCY003.

○菅井 竹彦[1]、浦和 遥[1]、金内 誠[1]、畑中 咲子[2]、石田 光晴[1] ([1]宮城大食産、[2]宮城県産技センター)
○Takehiko SUGAI[1], Haruka URAWA[1], Makoto KANAUCHI[1], Sakiko HATANAKA[2], Mitsuharu ISHIDA[1] ([1]Miyagi Univ., [2]Industrial Technology Institute,Miyagi Prefectural Government)

【目的】近年の健康志向の高まりから、動物性タンパク質の代替として大豆タンパク質が注目されている。大豆は、味噌や醤油の調味料だけでなく、大豆タンパク質をにがりや酸で凝固させた豆腐などにも利用されている。しかし、大豆タンパク質の物性は、牛乳タンパク質から造られるチーズとは異なり、食品工業への応用は限定的である。これまでに、大豆タンパク質の物性改良のため、植物由来プロテアーゼを用いて豆乳を凝固物とする方法が報告されている。しかし、これらの酵素による凝固物は、苦味の生成といった呈味の問題や過反応によって軟化するなどの問題があり、乳タンパク質より食感が劣っていた。大豆タンパク質は機能性に優れ、アミノ酸スコアも高いことから、乳タンパク質のように広く摂取するために、新たな酵素による豆乳凝固法の開発が望まれる。そこで本研究は、豆乳凝固酵素を有する新規性酵母により、嗜好性に優れた豆乳凝固物を生成する方法を開発し、その物性特性や凝固メカニズムを明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】研究室保存株 *Saccharomyces bayanus* SCY003 株は、GYP 培地(1% glucose, 0.5% yeast extract, 0.5% peptone)にて前培養した後、GY-casein(1% glucose, 0.5% yeast extract, 1% casein)培地にて 30℃、1 日間培養した。回収菌体をガラスビーズで破砕後、乾燥菌体重量比 10 倍の 50 mM phosphate-citrate buffer,pH7.0(0.5% NaCl, 2mM 2-mercaptoethanol)で粗酵素液を抽出した。粗酵素液(1.5ml)を定法通り調製した豆乳(10ml)に添加し、40℃、4 時間反応させた。得られた豆乳凝固物は、クリープメーターやテクスチュロメーター等を用いて物性測定した。また、豆乳に他の動植物由来のタンパク質や豆乳の凝固剤などを添加し、物性の変化などを検討した。

【結果及び考察】SCY003 株によって凝固した豆乳は、豆腐の凝固剤である GDL を作用させた凝固物とは異なる物性であり、破断点が明確でなかった。これら酵素凝固物は、GDL 凝固物(豆腐)より粘弾性のある凝固物を産生した。酵素凝固物を物性的測定した結果、「コシ」や「硬さ」、「付着性」が GDL 凝固物に比べ 1.5~2 倍程度高く、これを脱水させると、粘弾性に富み圧延することができた。これら酵素凝固物は SDS 溶液に溶解したことから、凝固機構にはグリシニンの疎水結合が関与しているものと考えられた。また、豆乳にグルテンや卵白、あるいは金属イオンを加えて凝固させたものは物性的に硬くなり、それぞれ単独のものとは異なる物性だった。特に凝固酵素にカルシウムイオンを添加したものは、粘弾性に富む凝固物で、カルシウムイオンのみで凝固したもの(豆腐)とは異なることを明らかにした。さらにこれら酵素をクローニングし、分子生物学的特性を明らかにした。

soymilk, protease, fermented food

講演番号：2A32a04
講演日時、会場：3 月 27 日 09:33～ A 校舎 32 会場

Porphyrins as required growth promoting compound(s) for uncultured bacteria ASN212 strain.

○Mohammad Nazrul Islam Bhuiyan, Shinya Mitsuhashi, Kengo Shigetomi, Yoichi Kamagata, Makoto Ubukata (Graduate School of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo-city, Japan.)

Most of life on earth is a mystery to us. The bulk of biomass on the planet is made up of microbes. By some estimates, there may be 150 million species of bacteria, but researchers have only known about 1% of bacteria species of them. One of the big causes of this ignorance is that scientists don't know how to raise bacterial colonies in laboratories conditions. So now we are trying to rear those bacteria in a lab. Why do most bacteria refuse to grow on perfectly nutritious media in the lab? This is a profound paradox that we are trying to solve. Our current finding is focused on growing previously uncultured gram positive aerobic bacteria ASN212 strain, and identifying the growth promoting compounds responsible for vigorous growth it in artificial conditions. There are undoubtedly many more growth factors and uncultured bacteria to be discovered. Therefore, we focused on the relationship between the "uncultured bacteria" and "other cultured bacteria". In the natural environment, the "other bacteria" may provide growth factors for "uncultured bacteria". ASN212 bacterium strain didn't show significant growth on nutrient broth (NPB), but growth was clearly enhanced by the addition of supernatant from its neighbor bacteria *Sphingomonas* sp (GF9). Using 210.0 lit. of GF9 supernatant through some chromatographic separations and identifications including UV, HPLC, LC-ESI-MS, the isolated growth factor is a porphyrin. This compound is solid in pinkish color and molecular mass is 715.18. The purified active compound showed growth activity at 1.0 ng/ml. This result may contribute the exploitation of the new functions of the previously inaccessible bacteria ASN212 strain. We also tested some commercial porphyrins like hemin, hematin and hematoporphyrin against bacteria ASN212 strain at different concentrations (minimum conc. at 0.5µl/ml) and found to be an additional growth factors allowing good growth of this organism. So, the bacteria ASN212 strain growth rate was affected by the concentration of porphyrins in the medium and in the case of GF9 supernatant, the production rates of porphyrin depends on the length of time of the culture broth. This growth ability or stimulate the growth of bacteria ASN212 strain in laboratory condition was specific for porphyrins. Next, we are trying to elucidate the structure of this isolated porphyrin by NMR.

Growth promoting compound(s), Uncultured bacteria, Porphyrin

講演番号：2A32a05
講演日時、会場：3 月 27 日 09:44～ A 校舎 32 会場

昆虫病原性糸状菌ゲノムへのランダム遺伝子挿入による新規二次代謝物質の取得

Identification of novel secondary metabolites hyperproduced by random DNA insertion into the genome of entomopathogenic fungus.

○佐藤 功規[1]、木下 浩[1]、五十嵐 康弘[2]、井原 史雄[3]、仁平 卓也[1]([1]阪大・生物工学国際交流セ、[2]富山県大・生工セ、[3]農研機構・果樹研)
○Koki SATO[1], Hiroshi KINOSHITA[1], Yasuhiro IGARASHI[2], Fumio IHARA[3], Takuya NIHIRA[1] ([1]ICBiotech, Osaka Univ., [2]Biotechnology Research Center Toyama Pref. Univ., [3]Nat. Inst. Fruit Tree Sci.)

【背景と目的】

ゲノム研究の結果、糸状菌は多いもので７０もの生合成遺伝子を有していることが明らかとなったが、その発現は培養条件に強く依存するため、通常行われているような実験条件下では、多くは未発現のままである。そのため、現在までに同定された化合物は遺伝子数と比較すると著しく少なく、糸状菌は新規化合物獲得のための有用な未開拓探索源と捉えられている。

本研究では、糸状菌では高効率で非特異的組換が生じるという性質を利用して、ゲノムへのランダム DNA 挿入により、二次代謝プロファイルの改変を行い、新規化合物の取得を試みた。その際、挿入 DNA 断片として恒常的発現プロモーターを用いることにより、挿入部位近傍の ORF の破壊だけでなく発現量増加により、遺伝子発現パターンの異なる多様な形質転換体の獲得を期待した。

【方法と結果】

本研究では、当研究室でドラフトゲノムを解析した昆虫病原性糸状菌 *Lecanicillium* sp.　MAFF635047 を被験菌とした。昆虫病原性糸状菌は、昆虫に感染、増殖する過程で、様々な二次代謝物質を生産すると考えられている。挿入 DNA としては *Metarhizium anisopliae* 由来の恒常的発現 *gpd* プロモーターに、選択マーカー *pyrG* 遺伝子を結合したものを用いた。プロトプラスト-PEG 形質転換法によりランダム DNA 挿入を行い、約 500 株の形質転換体を獲得した。これらの形質転換体を 4 mL の YES 液体培地で 25℃、10 日間静置培養し、その *n*-BuOH 抽出物を HPLC で解析した。宿主株の二次代謝プロファイルと比較したところ、同一の骨格を有すると考えられる化合物群の生産量が大きく向上した形質転換体が得られた。この形質転換体の大量培養を行い、生産量が増加した化合物を MS 解析、NMR 解析によって構造決定した。その結果、1 つの新規類縁体を含む Lamellicolic anhydride 系化合物群であることが明らかとなった。

filamentous fungi, *Lecanicillium*, secondary metabolite

講演番号：2A32a06
講演日時、会場：3 月 27 日 10:05～ A 校舎 32 会場

複合培養における放線菌二次代謝の誘導要因の探索

Exploration of inducing factors in combined-culture

○浅水 俊平[1]、尾崎 太郎[1]、佐藤 勝也[2]、尾仲 宏康[1]（[1]東大院農、[2]原子力機構・量子ビーム）
○Shumpei ASAMIZU[1], Taro OZAKI[1], Katsuya SATOH[2], Hiroyasu ONAKA[1] ([1]Univ. Tokyo, [2]QuBS, JAEA)

【背景・目的】我々は、放線菌に眠っている新しい天然物取得への試みとして、放線菌二次代謝生合成遺伝子の活性化を起こす共培養法に注目している。その中で、特殊な脂肪酸であるミコール酸を細胞壁成分に含む細菌群が *Streptomyces lividans* TK23 の色素抗生物質などを効果的に誘導することを明らかにした。（Onaka H. *et al.*, AEM, 77(2):400-406, 2011）この組み合わせによる共培養法を複合培養と名付け、現在その詳細な誘導メカニズムの解明を試みている。複合培養を用いることにより純粋培養では得られなかった新規生物活性物質、アルキベマイシン A (Igarashi Y. *et al*., *Org Lett*, 12(15):3402-5. 2010)、5-アルキル-THQ、アルシリアフラビン E (Hoshino S. *et al*., *J Antibiot*, 2014) などの発見につながっている。複合培養での二次代謝活性化は、自然生育環境の一部分を実験室に模倣することで、放線菌が有している環境変化への応答機構、またはこれまでに全く知られていない他者認識機構、が発揮されたがためと考えられるが、その機構は全くわかっていない。前年度に引き続き、本発表では誘導細菌であるミコール酸含有細菌の何が放線菌の二次代謝を引き起こすのか検討し、複合培養時の誘導機構についてさらに解析を行ったので報告する。

【方法・結果】これまでに、*Corynebacterieae* 亜目に属する多くのミコール酸含有細菌が *Streptomyces lividans* TK23 の二次代謝産物の生産を誘導することを明らかにしている。この活性化機構は良く知られる浸透性の低分子化合物が介するものではなく、ミコール酸含有細菌と放線菌の細胞同士が直接接触する状態が必要であることが二層式フラスコを用いた実験などから示唆されていた。前年度の発表ではミコール酸含有細菌のミコール酸などを含む外膜の構造を放線菌が認識すると予想し、ミコール酸含有細菌（*Tsukamurella pulmonis* TP-B0596 など）をホルマリン固定し、見かけの細胞形態が保たれているが死んでいる細胞を用いて添加培養を行った。しかし、死んだ固定細胞には *S. lividans* TK23 に対する色素生産誘導能が失われていることがわかった。一方、ホルマリン固定による表層面の分子レベルで化学構造の変化に関しては不確かであったため、予想が十分に検証されているとは言えなかった。そこで放線菌が何を認識するのかをより詳しく検証するために、更にガンマ線滅菌したミコール酸含有細菌を用いた生物活性評価や電子顕微鏡観察を行った。それらの結果から、複合培養における放線菌の二次代謝活性化反応では、ミコール酸含有細菌と放線菌の細胞間の接着が重要な役割を果たしていると推定している。

coculture, Streptomyces, mycolic acid

講演番号：2A32a07
講演日時、会場：3 月 27 日 10:16～ A 校舎 32 会場

Streptomyces sp. TP-A0584 由来ランチペプチド系化合物のゲノムマイニングによる同定
Genome mining of lanthipeptide-like compound biosynthetic gene cluster from *Streptomyces* sp. TP-A0584

○小野 拓人、江畑 一真、浅水 俊平、尾崎 太郎、尾仲 宏康（東大院農）
○Takuto ONO, Kazuma EBATA, Shumpei ASAMIZU, Taro OZAKI, Hiroyasu ONAKA (Univ. Tokyo)

【目的】リボゾーム翻訳型ペプチド系天然物（RiPPs）は構造遺伝子の塩基配列を組換えることによってアナログを作り出すことが可能であるため、生物活性の向上を目指した類縁体の生産が容易である。これまでにゴードスポリン生産菌である *Streptomyces* sp. TP-A0584 株のドラフトゲノムを解析し、クラス III ランチペプチド合成酵素(*las*)ホモログを見出していた。ランチペプチドはコア構造中の Ser, Thr が脱水し、Cys の共役付加による環化に由来するランチオニン(分子内チオエーテル環)構造を有する化合物で、RiPPs の一種である。これまでに組換え Las 蛋白と合成ペプチドを用いた *in vitro* 反応実験により *las* がランチオニン合成酵素であることを見出している（江畑ら、2013 年度農化大会一般講演）。しかしながら、*Streptomyces* sp. TP-A0584 の培養液には概当するランチペプチドを見出すことができなかった。さらに、染色体 DNA 上の *las* 周辺にはプロテアーゼ、トランスポーター等、ランチペプチド生合成遺伝子クラスター内に普遍的に存在する遺伝子が見出せなかった。そこで、周辺領域を再解析した結果、周辺に存在するポリケタイド生合成遺伝子クラスターに *las* が包含されている可能性が示唆された。本研究では、本クラスターに由来すると考えられる代謝産物の同定について報告する。

【方法と結果】*Streptomyces* sp. TP-A0584 株のドラフトゲノムから *las* 周辺の遺伝子を解析した結果、二つの異なる配列をコードする構造遺伝子の他に、I 型ポリケタイド合成酵素(PKS)遺伝子などが見出された。18 個の遺伝子からなると予想したクラスターは BLAST 検索の結果、*Streptomyces bicolor* NRRL B-5348 にも高い一致で保存されていたことから、これら PKS 遺伝子の関連が強く示唆された。そこで、*Streptomyces* sp. TP-A0584 ゲノムより pTOYAMAcos を用いてコスミドライブラリーを作製し、*las* をプローブとして PKS 遺伝子を含むようなコスミドクローンをクローニングした。本コスミドクローンを *Streptomyces lividans* TK23 の染色体上に導入し、培養生産物を抽出して LC-MS/MS 解析を行った。その結果、*m/z* が 654.9 $[M+2H]^{2+}$, 655.9 $[M+2H]^{2+}$, 668.9 $[M+2H]^{2+}$, 669.9 $[M+2H]^{2+}$の 4 つの特異なピークを同定した。2 つの構造遺伝子のアミノ酸配列から予測される分子量差（28 Da）のセットが存在することから、これらの化合物が *las* を含む遺伝子クラスターに由来することが強く示唆された。また、同時に生産菌やコスミド上で *las* や PKS 遺伝子の破壊を行い、破壊株での産物ピークの消失から 2 つの遺伝子が化合物生合成に必須であることを明らかにした。現在、本化合物の大量培養、精製を行い、構造決定を行っている。

lanthipeptide, actinomycetes, polyketide

講演番号：2A32a08
講演日時、会場：3 月 27 日 10:27～ A 校舎 32 会場

goadsporin 生合成機構を利用した goadsporin 倍加ペプチドの生産
The production of tandem analogue using the goadsporin biosynthetic machinery
○岡本 悠志、尾崎 太郎、浅水 俊平、尾仲 宏康（東大院農）
○Hisashi OKAMOTO, Taro OZAKI, Syumpei ASAMIZU, Hiroyasu ONAKA (Tokyo Univ.)

[目的]放線菌 *Streptomyces* sp. TP-A0584 が生産する goadsporin は、放線菌の二次代謝および形態分化を誘導する活性を持つ。我々はこれまでに goadsporin の生合成遺伝子を同定し、その生合成機構について研究を行ってきた。goadsporin の前駆体はタンパク質として構造遺伝子にコードされており、転写とリボゾームによる翻訳によって合成される。合成された前駆体ペプチドがアゾール環の形成をはじめとする翻訳後修飾を受けることで最終産物である goadsporin が生合成される。このような生合成機構の特徴から、構造遺伝子を置換することで類縁体を生成することが可能である。これまでに、goadsporin の構造遺伝子である *godA* のコアペプチド領域の塩基を置換し、コアペプチドのアミノ酸を置換した類縁体を 50 種以上作製したことを報告しているが、コアペプチド領域の残基数を増やした場合に翻訳後修飾が可能であるかどうかの知見がなかった。今回、*godA* の 19 残基からなるコアペプチドの塩基配列を倍加させた変異 *godA* 遺伝子を作製し、その形質転換株の生成物の構造を調べた。
[方法と結果]*Streptomyces* sp. TP-A0584 において、goadsporin 構造遺伝子である *godA* を欠失させた株（*ΔgodA* 株）を宿主として実験を行った。*godA* におけるコアペプチド配列部分を倍加させた変異遺伝子（*godA-double*）を人工遺伝子によって作製し、放線菌-大腸菌シャトルベクターである pTYM1gk にクローニングし、*ΔgodA* 株に導入した。得られた形質転換体をゴードスポリン生産条件で培養したところ、m/z が 1056 $[M+3H]^{3+}$を示す化合物が新たに生産されることが明らかになった。MS/MS 解析の結果から、goadsporin のコアペプチド領域が倍加した構造を有することが示唆された。そのことから、goadsporin 生合成における翻訳後修飾酵素は基質を寛容に認識し、最終産物を生成していることが示唆された。現在、化合物の精製、構造解析、生物活性試験等を行っている。

streptomyces, peptide, biosynthesis

講演番号：2A32a09
講演日時、会場：3 月 27 日 10:38～ A 校舎 32 会場

Streptomyces sp. TP-A0584 株由来ゴードスポリン生合成の *in vitro* 再構成
In vitro reconstitution of goadsporin biosynthesis from *Streptomyces* sp. TP-A0584
○山下 湖奈[1]、尾崎 太郎[1]、浅水 俊平[1]、後藤 佑樹[2]、菅 裕明[2]、尾仲 宏康[1] ([1]東大院農、[2]東大院理)
○ Kona YAMASHITA[1], Taro OZAKI[1], Shunpei ASAMIZU[1], Yuki GOTO[2], Hiroaki SUGA[2], Hiroyasu ONAKA[1] ([1]Univ. Tokyo, [2]Tokyo Univ)

【目的】放線菌のゲノム上には数十もの二次代謝産物生合成遺伝子が存在するが、それらの潜在的生合成遺伝子を生物資源として有効活用するために遺伝子の覚醒技術が必要とされている。我々が単離したゴードスポリンは様々な放線菌に対して形態分化や二次代謝物生産の誘導活性を示すため、休眠遺伝子の覚醒において有用な化合物であると期待される[1]。また、ゴードスポリンは前駆体ペプチドをコードする *godA* が転写・翻訳によって合成されたのち、アゾール環やデヒドロアラニンの形成、リーダー配列の除去や N 末端のアセチル化など翻訳後修飾を受けることで生産される。そのため、前駆遺伝子配列の書き換えにより類縁体の創製が可能である。これまでにゴードスポリンの DNA 配列を改変した類縁体は放線菌内で生産可能であることを報告しており、寛容な基質特異性を有するゴードスポリン生合成マシナリーを利用した構造多様な物質生産が可能であることを示唆していた[2]。しかし、各生合成酵素の基質認識について酵素レベルでの知見は得られていないため、*in vitro* での機能解析によってこれを明らかにし、新たな有用物質の創製へつなげる。
【方法と結果】ゴードスポリンの前駆体ペプチドである GodA は遺伝子としてコードされており、遺伝子が転写された後、リボソームで翻訳されることで合成される。そこで、大腸菌のリボソーム再構成系を利用し、*godA* を *in vitro* で転写・翻訳することで基質を調製することとした。MALDI-TOF MS で目的のペプチドの合成を確認することが出来たので、以降の実験に用いた。ゴードスポリンの生合成酵素は *godA, godB, godC, godD, godE, godF, godG, godH, godI* 遺伝子産物からなる。前駆遺伝子は *godA*、セリン及びスレオニンのオキサゾール環化、システインのチアゾール環化に 関わる遺伝子は *godD, godE*、セリンのデヒドロアラニン化には *godF, godG* であることが同定されていたため、これら遺伝子産物の機能解析を行うために、GodD, GodE の大腸菌での異種発現を試みた。得られたタンパク質を Ni アフィニティカラムにて精製し、無細胞翻訳によって調製した GodA を基質として酵素反応を行った。GodD の反応においてはオキサゾール環、チアゾール環の中間体であるオキサゾリン環、チアゾリン環の形成に対応する 6 つの脱水を確認したが、GodE 単独では酵素反応が起こらなかった。GodD, E の反応ではオキサゾール環、チアゾール環の形成に対応する 6 つの脱水と 6 つの脱水素を確認した。GodD, E 反応産物の MS/MS 構造解析により、ゴードスポリンにおいてオキサゾール環、チアゾール環が形成されている Thr2, Thr5, Cys8, Thr12, Ser15, Cys18 において修飾が起きていることが明らかとなり、GodD, E はオキサゾール環、チアゾール環の形成を触媒することが確かめられた。また、GodD によって形成されたオキサゾリン環、チアゾリン環を GodE が認識し、オキサゾール環、チアゾール環へと変換することも明らかとなった。
1) Onaka, H. *et al.*, *J Antibiot* 2001, 54, 1036-44.　2) Onaka, H. *et al*, *Microbiology* 2005, 151, 3923-33.

secondary metabolism, actinomyces, peptide

講演番号：2A32a10
講演日時、会場：3 月 27 日 10:49～ A 校舎 32 会場

二次代謝誘導物質ゴードスポリンの作用機構の解析

Identification of the molecular target of goadsporin.

○尾崎 太郎、浅水 俊平、尾仲 宏康（東大院農）
○Taro OZAKI, shumpei Asamizu, Hiroyasu Onaka (Univ. Tokyo)

【目的】放線菌 *Streptomyces* sp. TP-A0584 の二次代謝産物であるゴードスポリンは、チアゾールやオキサゾールなどの複素芳香環や脱水アミノ酸を含む特徴的な構造を有する直鎖構造のペプチドである。我々は、本化合物が様々な放線菌に対して形態分化や二次代謝生産を誘導することをこれまでに報告してきた。抗生物質をはじめとする様々な活性物質の単離源として重要な微生物である放線菌には、近年のゲノム解読の進展によって一株当たり少なくとも 30 個以上の二次代謝産物生合成遺伝子群が存在することが明らかとなった。しかし、その一方で実験室における培養条件で実際に生産が確認されているのはその一部にすぎないことも明らかになった。通常は休眠状態にあると考えられるそれらの遺伝子群には未知の活性物質が多く存在すると期待され、効率的な活性化手法の開発が求められている。我々が研究対象とするゴードスポリンは、広範な範囲の放線菌に対して二次代謝産物の誘導活性を示すため、放線菌において休眠状態にある代謝経路の活性化法への応用も期待される化合物ではあるが、その作用機構の詳細は明らかではなかった。そこで、本研究ではゴードスポリン作用機構の解明を目指し、その作用標的の同定を行った。

【方法と結果】我々は、これまでにゴードスポリンの生合成遺伝子をクローニングし、その機能解析を行ってきた。また、ゴードスポリン生合成遺伝子群の近傍に、TP-A0584 株におけるゴードスポリン自己耐性遺伝子として *godI* を見出していた。*godI* は signal recognition particle (SRP)の構成要素である Ffh と 78%の相同性を示す蛋白質をコードしており、Ffh として機能すると考えられている。これまでにゲノム解読が完了した *Streptomyces coelicolor* A3(2)をはじめとする放線菌ゲノム上には、通常 *ffh* 遺伝子は 1 コピーしか存在しない。しかしながら、TP-A0584 株のドラフトゲノム解析より、本菌株は *godI* の他にさらにもう一つ *ffh* 遺伝子を有することが明らかになった。このことより、ゴードスポリンが Ffh を分子標的として活性を発揮すること、および生産菌に存在する GodI がゴードスポリン耐性型の Ffh であり、ゴードスポリン存在下において従来の Ffh の機能を代替することで耐性化に寄与していることが推測された。この仮説を検証するため、Ffh と GodI の組換え蛋白質を調製し、プルダウンアッセイや表面プラズモン共鳴を用いて *in vitro* でゴードスポリンとの相互作用を検証した。その結果、Ffh とゴードスポリンが K_D 11 nM という極低濃度で相互作用すること、および GodI とゴードスポリンが相互作用しないことが明らかとなり、ゴードスポリンが Ffh を標的として作用するという仮説が支持された。

actinomycetes, secondary metabolism, peptide

講演番号：2A32a11
講演日時、会場：3 月 27 日 11:10～ A 校舎 32 会場

放線菌の潜在的二次代謝能活性化における集団培養法の有効性

Efficacy of a new method, Grouped-Mixed Culture approach, in activating genetic potential of actinomycetes to produce secondary metabolites

○高野 未来[1]、保坂 毅[2] ([1]信州大院・農、[2]信州大・先鋭領域融合研究群)
○Mirai TAKANO[1], Takeshi HOSAKA[2] ([1]Grad. Sch. Agric. Shinshu Univ., [2]IBS-ICCER. Shinshu Univ.)

【背景および目的】代表的な抗生物質生産菌である放線菌は, 実験室レベルの培養条件においてほとんど発現していない遺伝子を有している. これらの中には抗生物質等の有用二次代謝産物の生合成に関与する遺伝子が数多く含まれている. この事実は, 放線菌の潜在的二次代謝能を引き出せれば, 新奇有用化合物の発見に繋がることを示している. 我々は, 放線菌のそのような能力を効率的かつ効果的に引き出し活用するための手法の確立を目指している. その過程で, 複数の放線菌を同一固体培地上で同時培養する「集団培養法」の着想を得た. この培養法が放線菌の培養性状や二次代謝産物生産性にどのような影響を及ぼすか検証したところ, 以下に示す興味深い知見を得たので報告する.
【方法】 本研究では, 当研究室保有の土壌由来放線菌 ［*Streptomyces* 属（4 菌株）, *Kitasatospora* 属（1 菌株）, *Nocardia* 属（2 菌株)］および放線菌基準株 *Streptomyces coelicolor* A3(2) を使用した. 集団培養は, これらのうち 7 菌株を MR4 あるいは MR5 ゲランガム培地上に, 正六角形の各頂点とその中心に等間隔（28 mm 間隔）で接種し, 30°C で 10～30 日間の条件で行った. 一方, ゲランガム培地上に同一菌株のみを接種して同様の操作を行ったものを単独培養（コントロール）とした.
【結果】 上記の方法に従い, 7 菌株の土壌由来放線菌を単独培養あるいは集団培養し, それぞれの条件における各菌株の培養性状（生育, 胞子形成, 色素生産など）を観察した. その結果, 7 菌株中 5 菌株が単独培養時と集団培養時とでは異なる培養性状を示すことが確認できた. なかでも *Streptomyces* sp. THSU-1, *Nocardia* sp. THSU-8 および *Nocardia* sp. THSU-15 の 3 菌株においては, 単独では生産できない色素を集団培養時に生産することも判明した. そこで, 培養性状に顕著な差が認められた条件において, 培養抽出物を調製し, 単独培養と集団培養で生産される代謝産物のプロファイルを HPLC により比較分析した. その結果, 集団培養時にのみ生産が認められる成分が複数存在することが明らかになった. 一方, *S. coelicolor* A3(2) を 6 菌株の土壌由来放線菌と集団培養したところ, 同菌株のコロニー形態が単独培養時とは大きく異なること, さらには青色色素抗生物質（アクチノロージン）の生産量が増加することを見出した.
以上のように, 「集団培養法」により放線菌の培養性状と二次代謝産物生産性を大きく変えられることを実験的に証明できた. 現在, 集団培養時にのみ生産された二次代謝産物の単離・精製および構造解析を進めると共に, 本手法による活性化効果を遺伝子発現レベルで明らかにするために, *S. coelicolor* A3(2) の二次代謝産物生合成遺伝子の発現変化の解析にも取り組んでいる.

actinomycetes, secondary metabolites production, secondary metabolism

講演番号：2A32a12
講演日時、会場：3 月 27 日 11:21～ A 校舎 32 会場

抗生物質リンコマイシンが *Streptomyces* 属放線菌における二次代謝のエリシターとして働く仕組みの分子生物学的解析

Molecular biological analysis of the mechanism by which lincomycin can act as an elicitor in secondary metabolism of streptomycetes

○今井 優[1]、佐藤 誠造[2]、田中 幸徳[3]、下野 和真[4]、越智 幸三[3]、保坂 毅[5] ([1]信州大院・総合工、[2]日本水産・中研、[3]広工大・生命、[4]信州大・農、[5]信州大・先鋭領域融合研究群)
○Yu IMAI[1], Seizo SATO[2], Yukinori TANAKA[3], Kazuma SHIMONO[4], Kozo OCHI[3], Takeshi HOSAKA[5] ([1]Interdisc. Grad. Sch. Sci. and Technol. Shinshu Univ., [2]Nippon Suisan Kaisha, Ltd., [3]Fac. Life Sci. Hiroshima Inst. Technol., [4]Fac. Agri. Shinshu univ., [5]IBS-ICCER, Shinshu Univ.)

【背景・目的】 ごく最近我々は，亜致死濃度のリンコマイシン（翻訳阻害剤）存在下で *Streptomyces* 属放線菌を培養すると，二次代謝産物の生産量が劇的に増加する現象を見出した。このことは，抗生物質リンコマイシンが *Streptomyces* 属放線菌における二次代謝のエリシターとして働き得ることを示唆している。本研究はその仕組みを分子レベルで解明することを目的としている。
【方法】 本検討では放線菌基準株 *Streptomyces coelicolor* A3(2) を使用した。MR5 液体培養時に *S. coelicolor* A3(2) は，100 μg/ml のリンコマイシンが存在すると全く生育しないが，その 1/10 濃度（10 μg/ml）では生育遅延が認められるものの，青色抗生物質アクチノロージン（ACT）の生産量が劇的に増加する。そのような ACT 高生産条件で同菌株を様々な生育時期（対数期，遷移期，および定常期）まで培養し，得られた菌体から全 RNA・タンパク質を調製するとともに，細胞内ヌクレオチドを抽出した。これらを用いて，リンコマイシン非存在下で得られた試料とともに以下の解析を進めた。
【結果・考察】 本研究では先ず，リンコマイシンが *S. coelicolor* A3(2) の遺伝子発現に及ぼす影響を調べるために，リンコマイシン存在，非存在下におけるタンパク質の発現プロファイルを SDS-PAGE により比較解析した。その結果，リンコマイシン存在下における *S. coelicolor* A3(2) では，F_0F_1 ATP 合成酵素の α-と β-サブユニットの発現量がリンコマイシン非存在下に比べて低下していることが判った。この発現低下は mRNA レベルで起きていることも確認できた。F_0F_1 ATP 合成酵素は，膜内在型の F_0 ユニットと膜表在型の F_1 ユニットから構成されている。これらのうち α-，β-サブユニットを含む F_1 ユニットは ATP の合成と加水分解反応を担っている。このことを踏まえ，リンコマイシン存在，非存在下における細胞内 ATP 量に違いがあるか否かを調べたところ，予想に反して，リンコマイシン存在下（F_0F_1 ATP 合成酵素 α-，β-サブユニットの発現低下条件）では，非存在下に比べて細胞内 ATP 量が明らかに高いことが判明した。この原因を突き止めるために，F_0F_1 ATP 合成酵素のネイティブ状態を電気泳動的に調べた。その結果，リンコマイシン存在下では，同酵素のネイティブ状態が対数期，遷移期，および定常期でほとんど変わらず維持されており，これに起因して細胞内 ATP 量が高いことが明らかになった。
以上の結果から，リンコマイシンが F_0F_1 ATP 合成酵素の発現・機能に変化をもたらすことを突き止めた。今後は，この変化が *S. coelicolor* A3(2) の ACT 高生産にどのように寄与しているかを解析し，リンコマイシンにより放線菌の二次代謝が活性化する仕組みの全容を明らかにする。

Lincomycin, Secondary metabolism of strepyomycetes, F_0F_1 ATP synthase

講演番号：2A32a13
講演日時、会場：3 月 27 日 11:32～ A 校舎 32 会場

*Streptomyces*属放線菌における伝達性線状プラスミドベクターを利用した 二次代謝産物生合成遺伝子の導入

Transfer of the entire biosynthetic gene cluster for streptomycin by interspecific mating between *Streptomyces* using a linear plasmid vector SAP1.

○小松 護、池田 治生（北里大・北里生命研）
○Mamoru KOMATSU, Haruo IKEDA (Kitasato Inst. for Life Sciences, Kitasato Univ.)

【目的】我々はこれまで、avermectin の工業生産菌である *Streptomyces avermitilis* の大規模欠失体 (SUKA) を汎用宿主とした異種微生物由来の二次代謝産物生産について報告してきた[1-3]。本菌への I 型ポリケタイドや非リボソーム型ペプチド化合物の完全長生合成遺伝子群を含む BAC クローンの導入は効率が悪い。そこで前年度大会において、形質転換能力の高い *S. lividans* を供与菌に用いた接合により、*S. avermitilis* 由来の伝達性線状プラスミド(SAP1: 94,287 bp)をベクターとして、二次代謝産物生合成遺伝子群を *S. avermitilis* SUKA 株に導入できることを報告した。この系の開発によって、100 kb を越す巨大な生合成遺伝子群を含む断片を *S. lividans* を経由して SUKA 株へ効率よく導入することが可能となった。我々はさらに、この SAP1 ベクターを用いた遺伝子導入法が他の *Streptomyces* 属に対しても適用可能であるかを検討した。

【方法と結果】 我々はこれまで、*S. avermitilis* 染色体上の溶原化ファージ(ϕC31, R4, TG1, ϕK38-1, ϕBT1)に対応する *attB* 配列を保持する SAP1 ベクターを開発した。*S. griseus* IFO 13350 由来の streptomycin 生合成遺伝子群 (*str*-cluster; 41.2 kb)を、neomycin 耐性遺伝子(*aph*)を保持するϕC31 系統の組込型ベクターを用いて SAP1 ベクターに導入した(SAP1::*str*-cluster)。*S. lividans* TK24 (*ΔattB*$_{\phi C31}$ *ΔattB*$_{\phi BT1}$*::aadA*)あるいは *S. avermitilis* SUKA22 (*ΔattB*$_{\phi C31}$ *ΔattB*$_{R4}$ *ΔattB*$_{TG1}$ *ΔattB*$_{\phi BT1}$ *ΔattB*$_{\phi K38-1}$)の SAP1::*str*-cluster 保持株を供与菌として、hygromycin B 耐性遺伝子(*hph*)を導入した *S. albus* J1074, *S. ambofaciens* ISP 5053, *S. cyaneogriseus* subsp. *noncyanogenus* NRRL 15773, *S, parvulus* ATCC 12434 および *S. venezuelae* ATCC 10712 への接合伝達を試みた。種々の培地条件ならびに接合時の供与菌と受容菌の混合比率を検討することによって接合を行った。接合体は SAP1 ベクターおよび受容菌の選択マーカーである neomycin および hygromycin B を含む寒天培地で選択した。その結果、*S. lividans* TK24 (SAP1::*str*-cluster)を供与菌とした場合、*S. ambofiaciens* ならびに *S. parvulus* において、～10^2 程度の効率で接合体を得ることができた。一方で、*S. avermitilis* SUKA22 を供与菌とした場合、*S. parvulus* でのみ接合体を得ることができたが、その効率は～10^5 程度であり、*S. lividans* TK24 と比較して高い効率で接合体を得ることができた。さらに得られた接合体からは SAP1::*str*-cluster を CHEF 電気泳動によって確認することができた。

【文献】1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**:2646-2651 (2010), 2. *ACS Synth. Biol*. **2**:384-396 (2013), 3. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol*. **41**:233-250 (2014)

Streptomyces, linear plasmid, secondary metabolism

講演番号：2A32a14
講演日時、会場：3 月 27 日 11:43～ A 校舎 32 会場

アラレマイシン生産菌 *Streptomyces* sp. A012304 の 2 種類の 5-アミノレブリン酸合成遺伝子ホモログの解析

Analysis of two kinds of 5-aminolevulinic acid synthase homologue possessed by Alaremycin producing *Streptmyces* sp. A012304

○岩井 伯隆、森 ひかる、和地 正明（東工大院・生命理工・生物プロセス）
○Noritaka IWAI, Hikaru Mori, Masaaki Wachi (Dept. Bioeng., Grad. Sch. Biosci. Biotechnol., Tokyo Tech)

アラレマイシンはポルフィリン生合成の基質である 5-アミノレブリン酸と類似した構造を持つ抗生物質である。その作用標的は、5-アミノレブリン酸を基質としてポルホビリノーゲンを合成する酵素ポルホビリノーゲンシンターゼ（ PBGS ）であることが、緑膿菌 PBGS とアラレマイシンの複合体結晶構造解析から明らかとなった。近年、新しい薬剤標的として PBGS を作用標的とした薬剤開発が精力的に進められてきているが、天然物由来の阻害剤はアラレマイシンが唯一の報告例である。本研究では、このアラレマイシンの生合成経路を明らかにすることを目的とした。これは、アラレマイシンの高生産プロセスの開発に応用できるのみならず、新しい類縁化合物の生合成手法の開発や半合成用基質の生合成への応用にも期待できる。まずアラレマイシンを生産する放線菌 *Streptomyces* sp. A012304 株のゲノム配列についてドラフトシークエンスを行った。次世代シークエンサー Illumina HiSeq によるシークエンスの結果、総リード数約 3800 万リード、総塩基数約 3.9G の情報を獲得し、アッセンブルの結果、コンティグ数 281 の約 9.7M 塩基の塩基配列情報を得た。約 1 万の BLAST ヒットする ORF を獲得し、これらの ORF についてポルフィリン合成関連遺伝子について検索した。

その結果、反応経路が異なる 2 種類の 5-アミノレブリン酸合成酵素ホモログを保有していることを見出した。一つは近縁の放線菌を含むほとんどの細菌や植物が保有している C5 経路で、グルタミン酸を基質として 5-アミノレブリン酸を合成する酵素である。この遺伝子は *hemA* と一般的に呼ばれている。もう一方は光合成細菌や動物、カビなど真核生物で保有されている C4 経路で、スクシニル CoA とグリシンを縮合して 5-アミノレブリン酸を合成する酵素である。この遺伝子は一般的に *ALAS* と呼ばれている。両者を保有している生物は非常にまれである。我々は、この二種類の 5-アミノレブリン酸合成遺伝子ホモログ（ *hemA* と *ALAS* ）について、大腸菌による異種発現系を用いて 5-アミノレブリン酸合成活性を調べたので、その結果を報告する。

Alaremycin, 5-aminolevulinic acid synthase

講演番号：2A32p01
講演日時、会場：3 月 27 日 14:00～ A 校舎 32 会場

Cordycepin production by medicinal fungus Cordyceps militaris in static culture

○Sari Nurmila[1], Tatsuya Kato[1,2], Enoch Y. Park[1,2] ([1]Shizuoka Univ., [2]Research Institute of Green Science and Technology)

Cordycepin (3`-deoxyadenosine, $C_{10}H_{13}N_5O_3$) is one of the main secondary metabolite from *Cordyceps militaris* that considered as a nucleic acid anti-cancer drug inhibiting canceration of cells. However, due to the requirements of specific hosts and strict growth environments of *C. militaris* in natural, it is necessary to produce a large amount of cordycepin. The growth of fungus is usually slow, but this limitation must be overcome by the optimization of culture conditions. In this study, in order to improve cordycepin production in static culture the effect of specific surface area (SSA) on the cordyceptin production was investigated with optimized production medium.

Method: *Cordyceps militaris* NBRC 9878, NBRC 100741 and NBRC 103752 were cultivated in medium that consists of yeast extract , glucose and Vogel`s medium (pH 5.6). The medium then inoculated by punching out 3 disks of PDA plates (5 days) with 1 cm diameter into 100 ml of liquid medium in 500 mL flask. SSA experiment were performed by cultivated *C. militaris* NBRC 103752 with different medium volumes ranging from 50–200 mL in static culture at 25℃ for 24 days. The specific surface area was measured by dividing surface area (cm^2) by volume (mL) of medium. The cordycepin concentration (g/L) was measured at 260 nm by High performance liquid chromatography on a reverse phase column C-18.

Results: The cordycepin production by *Cordyceps militaris* NBRC 9878, NBRC 100741 and NBRC 103752 were 1.01, 1.14 and 4.52 g/L for 24 days, respectively. Among three strains that have been screened for cordycepin production, *C. militaris* NBRC 103752 produced the highest amount of cordycepin. Effect of SSA on cordycepin relationship was observed using *C. militaris* NBRC 103752 where the cordycepin amount reached 6.67, 6.03, 4.84, 3.85 and 3.28 g/L for the values SSA of 1.57, 1.11, 0.77, 0.48, and 0.34 cm^{-1}, respectively. These data support that the values of specific surface area affected significantly the cordycepin production by *C. militaris* NBRC 103752. This results would provide a framework for comprehensive analysis in optimization of culture conditions for cordycepin production by *C. militaris* in the future.

Cordycepin, Cordyceps militaris, Spesific surface area

講演番号：2A32p02
講演日時、会場：3 月 27 日 14:11～ A 校舎 32 会場

麹菌の 2 次代謝遺伝子発現を制御する Aospt3 と AohstD との関係

Genetic relationship of Aospt3 and AohstD on the regulation of secondary metabolite biosynthesis in Aspergillus oryzae

廣瀬 雅人[1,2]、河内 護之[1,2]、織田 健[1]、○岩下 和裕[1,2]（[1]酒類研、[2]広大・先端研）
Masato HIROSE[1,2], Moriyuki KAWAUCHI[1,2], Ken ODA[1], ○Kazuhiro IWASHITA[1,2] ([1]NRIB, [2]Hiroshima Univ.)

【目的】糸状菌の 2 次代謝物質は、有用な物質から有害な物質まで多岐にわたり、その制御機構を解明することは、物質生産や安全性の観点から重要である。当研究室ではこれまで、ヒストンアセチル化修飾関連因子に着目して研究を行っており、ヒストンアセチル化酵素複合体の構成因子である AoSpt3 が麹菌の 2 次代謝生産を負に制御することを報告している。また、これまでにヒストン脱アセチル化酵素である麹菌 AoHstD も同様に麹菌の 2 次代謝生産を負に制御することを明らかにしている。そこで本研究では、*Aospt3* と *AohstD* との関連に着目し、麹菌における新規な 2 次代謝制御因子としてその制御機構の解明を目的として研究を行った。
【方法と結果】まず、*Aospt3* と *hstD* の関係について検討するために、両遺伝子の 2 重破壊株を作成した。それぞれの遺伝子破壊株は、親株と比べてコウジ酸生産性、ペニシリン生産性ともに上昇するが、2 重破壊株はコウジ酸プレートアッセイでは、各遺伝子の単独遺伝子破壊株と明瞭な違いは見られず、コウジ酸の定量を行ったところ、それぞれの破壊株の中間の表現型となった。また、ペニシリン生産性については、すべての破壊株で明確な差が見られなかった。以上の結果から、両遺伝子は非依存的に 2 次代謝生産制御に関連している可能性が示唆されたことから、エピスタティックな解析を行った。まず、*Aospt3* 遺伝子を高発現させたところ、親株より若干生育が良くなったが、コウジ酸生産については違いが見られなかった。また、*AohstD* 遺伝子を高発現させた株では、親株との違いは見られなかった。つづいて *Aospt3* 遺伝子破壊環境下で、*AohstD* 遺伝子の高発現を行ったところ、*Aospt3* 遺伝子破壊の表現型を相補することが出来なかった。以上のことから、*hstD* 遺伝子は *Aospt3* 遺伝子の下流ではないことが明らかとなった。次に、*hstD* 遺伝子破壊環境下で、*Aospt3* 遺伝子の高発現を行ったところ、*Aospt3* 遺伝子破壊株の時と同様、*hstD* 遺伝子破壊株の表現型を相補出来なかった。コウジ酸の定量試験、およびペニシリン生産性の試験でも同様の結果となった。先の研究で、*Aospt3*、*AohstD* ともに *Aspergillus* 属の 2 次代謝遺伝子発現制御のキーファクターである *laeA* の遺伝子発現を介して 2 次代謝遺伝子発現を制御していることを明らかにしている。以上の結果により *Aostp3* と *AohstD* はそれぞれ非依存的に *laeA* の遺伝子発現を負に制御することにより、コウジ酸やペニシリンの生産などの 2 次代謝物質生産を制御していることが明らかとなった。
1）廣瀬雅人ら、2014 年度日本農芸化学会大会講演要旨 3A14a03

Aspergillus oryzae, Secondary metabolite, Histone acetylase

講演番号：2A32p03
講演日時、会場：3 月 27 日 14:22～ A 校舎 32 会場

麹菌における *ustR* 遺伝子高発現による Ustiloxin B 生産と Ustiloxin B 生合成における KexB プロテアーゼの関与

Production of ustiloxin B by overexpression of *ustR* and the involvement of KexB protease for biosynthesis of ustiloxin B in *Aspergillus oryzae*

○吉見 啓[1]、梅村 舞子[2]、長野 希美[3]、小池 英明[2]、町田 雅之[2]、阿部 敬悦[1,4]([1]東北大・未来研、[2]産総研・生物プロセス、[3]産総研・CBRC、[4]東北大院農)
○Akira YOSHIMI[1], Myco Umemura[2], Nozomi Nagano[3], Hideaki Koike[2], Masayuki Machida[2], Keietsu Abe[1,4] ([1]NICHe, Tohoku Univ., [2]BRI, AIST, [3]CBRC, AIST, [4]Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ.)

［背景・目的］

Ustiloxin B は、*Ustilaginoidea virens* によって生合成されることが知られている二次代謝産物である。最近、*Aspergillus flavus* においても本化合物の産生が確認され、その生合成に関与する遺伝子クラスターが同定された[1)]。本化合物は、子嚢菌では報告例のない ribosomal peptide synthetic（RiPS）経路により生合成されると推定される環状ペプチド化合物である。さらに、麹菌 *A. oryzae* においても相同な遺伝子クラスターが存在することも明らかになっている[1)]。一方、*A. oryzae* の野生株において、Ustiloxin B の産生は確認されておらず、クラスター内転写因子遺伝子（*ustR*）の周辺領域の欠失が、Ustiloxin B を生産しない要因であると考えられている。本研究では、*A. oryzae* において Ustiloxin B 生合成遺伝子クラスターの機能を解析するため、*ustR* の高発現株を造成し、Ustiloxin B の生産性を評価することを目的とした。また、Ustiloxin B のコア配列を繰返し持つ前駆体タンパク質（UstA）にゴルジ体に局在する KexB プロテアーゼの認識配列が見出されたことから、Ustiloxin B の生合成と KexB との関係についても考察することを目的とした。

［方法・結果］

まず、麹菌用高発現プロモーター（PglaA142、PenoA142）に *ustR* を連結し、UstR の高発現株を造成した。本株において、*ustR* およびクラスター内遺伝子の発現応答を解析したところ、CD 最小培地、V8 培地いずれにおいても、*ustR* の高発現に伴うクラスター内遺伝子の発現上昇が確認できた。次に、液体培養での Ustiloxin B 生産性を評価したところ、CD 培地では産生しないが、V8 培地おいて本化合物の産生が確認された。これらのことから、クラスター内遺伝子の発現と培地栄養条件が Ustiloxin B の生合成に関与すること、麹菌野生株における Ustiloxin B の非生産性は *ustR* の機能不全が原因であることが示唆された。また、KexB プロテアーゼ遺伝子破壊株（Δ*kexB* 株）において、*ustR* を高発現させたところ、Ustiloxin B の産生量は著しく低下していた。このことから、Ustiloxin B の生合成には KexB が関与しており、ゴルジ体内における前駆体タンパク質 UstA の KexB によるプロセッシングが Ustiloxin B 生合成のファーストステップであることが強く示唆された。

（本研究は、経済産業省委託事業「革新的バイオマテリアル実現のための高機能化ゲノムデザイン技術開発」の一部として実施された。）

[1)] Umemura et al., Fung. Genet. Biol., 68 (2014) 23-30.

Aspergillus oryzae, Ustiloxin B, ribosomal peptide synthetic pathway

講演番号：2A32p04
講演日時、会場：3 月 27 日 14:33～ A 校舎 32 会場

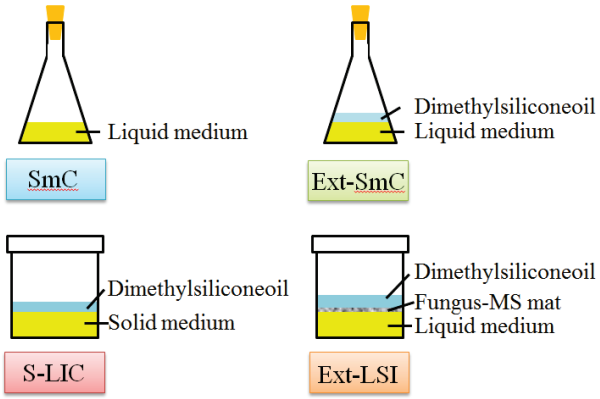
抽出液面固定化システムにおける lovastatin 合成関連遺伝子の高発現

Superior gene expression for the production of lovastatin in Ext-LSI system

○野村 聖也、佐野 元昭、小田 忍、大箸 信一（金沢工大ゲノム研）
○Seiya NOMURA, Motoaki SANO, Shinobu ODA, Shinichi OHASHI (Kanazawa Inst. Technol.)

【目的】 培養方法を変えることにより、カビの二次代謝物生産が大きく変化することが知られている。例えば、*Penicillium multicolor* IAM 7153 を抽出液面固定化(Ext-LSI)システムに適用した場合、液体培養法(SmC)とは大きく異なる二次代謝物を得られることが報告されている [1)]。このことは新規物質を探索するうえで極めて重要な事実であるが、培養法間での遺伝子発現の差異については、あまり解析が行われていない。そこで本研究では、lovastatin 生産株である *Aspergillus terreus* ATCC 20542 を対象として、SmC、抽出発酵法(Ext-SmC)、固-液界面培養法(S-L IC)、及び Ext-LSI の 4 種の培養系での lovastatin 合成関連遺伝子の発現量の比較、並びに lovastatin を含む二次代謝産物の比較を行った。

【方法】 基本培地に修正サブロー培地 20 ml を用い、菌株には *A. terreus* ATCC 20542 を使用した。SmC と Ext-SmC ではこれに種菌 300 μl を植菌し、25℃、200 rpm で 10 日間振盪培養した。Ext-SmC については、培養 4 日目にジメチルシリコンオイル(KF-96L-1CS、信越化学)を 10 ml 添加した。S-L IC では、1.5%寒天培地を用いて静置培養を行った(培養 4 日目にシリコンオイルを添加)。Ext-LSI では、培地 20 ml に種菌 300 μl と中空マイクロスフェアー (HB2051、積水化学)を 1.3 g 混合し、3 日間の前培養で培地液面にカビマットを形成後、シリコンオイルを 10 ml 重層して、7 日間静置培養を継続した。SmC、Ext-SmC、Ext-LSI の水層及び Ext-SmC、Ext-LSI、S-L IC の有機層から定法通り二次代謝物を抽出し、HPLC-PDA を用いて二次代謝物のプロファイルの比較を行った。さらに、各培養系から回収した菌体を凍結・破砕し、total RNA を抽出してリアルタイム PCR を行い、*lovB*, *lovC, lovD, lovE, lovF* の発現量を比較した。



【結果】 Ext-LSI では他の培養法に比べ、lovastatin 合成関連遺伝子である *lovB*, *lovC, lovD, lovE, lovF* が大量に発現していることが確認された。また、lovastatin 生産量は Ext-LSI で最大となり、他の培養法よりも 1 ケタ高い値となった(4.13mg/L)。さらに、Ext-LSI の水層及び有機層に lovastatin 誘導体であると思われる二次代謝物が検出された。

1)小田忍ら、第 63 回日本生物工学回大会 (於東京農工大，2011).

lovastatin, gene expression, secondary metabolism

講演番号：2A32p05
講演日時、会場：3 月 27 日 14:44～ A 校舎 32 会場

呼吸阻害剤のアフラトキシン生産に与える影響と作用機構の解析

Analysis of targets and functional mechanism of respiration inhibitors on aflatoxin production

○山本 利義、飯村 九林、作田 庄平（東大農応生化）
○Toshiyoshi YAMAMOTO, Kurin IIMURA, Shohei SAKUDA (Univ. Tokyo)

［目的］

二次代謝産物アフラトキシン群は *Aspergillus parasiticus* や *Aspergillus flavus* により生産される急性毒性だけでなく強い発癌性も有するマイコトキシンである。アフラトキシンは微量でも有害で安定であるため、食の安全性に深刻な影響を与えている。汚染作物の処分に伴う経済的損失は甚大であり、現在、5 億人以上が健康被害にさらされていると推定されている。しかし、アフラトキシン被害を防除するための決定的な対策法は未だ開発されていない。

防カビ剤といった菌体自体の生育に影響を与える薬剤の施用は耐性菌の発生を促し、耐性菌を駆除する薬剤を開発し続けなければならないというジレンマを抱えている。我々は、アフラトキシン自体は菌体の生育に必ずしも必要とされないことに着目し、菌体成長には影響を与えずアフラトキシンの生産のみを抑制する薬剤を開発するという着想に基づいてスクリーニングをおこなった。その結果、呼吸阻害剤がアフラトキシン生産を抑制することを見出した。天然、合成を問わず呼吸阻害活性を有する化合物がすでに虫害、カビ害に対する農薬として使用されていることから、我々はこれらの化合物をパイロットとしてアフラトキシン生産抑制に指向性を持つ農薬となる化合物の開発を目指している。本研究では、呼吸阻害剤のアフラトキシン生産阻害活性を詳細に調べ、その作用機構を明らかにすることを目的とする。

［方法および結果］

A. parasiticus に対して呼吸阻害剤ボスカリド、トルフェンピラドはアフラトキシン生産を抑制した。トルフェンピラドがアフラトキシン生産に関与する転写調節因子、生産酵素の遺伝子発現には影響を与えない一方で、ボスカリドは生産酵素の遺伝子発現を遅延させる効果を有していた。この事は呼吸阻害剤の作用点が主として生産に関与する酵素活性に影響を及ぼすものであり、かつ、遺伝子発現調節機構にも関与点がある事、薬剤により作用点に相違がある事を示唆していた。どの生産酵素が作用点であるかを解析するとともに、遺伝子発現が遅延するボスカリド処理においても転写因子の発現は影響を受けていないことから転写因子の活性化機構にも作用点がある可能性について現在検討を行っている。

謝辞：本研究は、農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業「ケミカルバイオロジーを基盤とした革新的な農薬等の探索研究」として行われているものである。

Aflatoxin, respiration inhibitor

講演番号：2A32p06
講演日時、会場：3 月 27 日 15:05～ A 校舎 32 会場

大腸菌の代謝工学による β-フェランドレン大量生産系の構築

Metabolic pathway engineering of *Escherichia coli* for ß-phellandrene production

○末永 美樹[1]、萬年 一斗[1]、沓川 諒[1]、茂木 大介[1]、古谷 昌弘[2]、下山 武文[1]、高橋 征司[1]、中山 亨[1] ([1]東北大院工、[2]積水化学　開発推進センター)
○ Miki SUENAGA[1], Kazuto MANNEN[1], Ryo KUTSUKAWA[1], Daisuke MOGI[1], Masahiro FURUTANI[2], Takefumi SHIMOYAMA[1], Seiji TAKAHASHI[1], Toru NAKAYAMA[1] ([1]Tohoku Univ., [2]SEKISUI CHEMICAL CO.,LTD.)

炭素数 10 のイソプレノイドであるモノテルペンは, 植物が生合成する二次代謝産物の一種であり, 感染防御や動物に対する摂食阻害など，多様な生物的ストレスに対する応答機構に関与している．一方，食品添加物，香料，溶剤などとして広範に利用されており，産業的にも重要な物質である．しかし，植物内における生成量は微量であることや，有機合成が困難な構造も含まれることから，代謝工学による高生産型生物の構築が進められている．本研究では，大腸菌を用いて，有用モノテルペンである β-フェランドレン大量生合成系の構築を試みた.

高等植物において，モノテルペンは色素体内のモノテルペン合成酵素（mTPS）により生合成される．一般的にその基質は，色素体内の非メバロン酸経路により生合成されるイソペンテニル二リン酸（IPP）とジメチルアリル二リン酸が *trans* 型に縮合したゲラニル二リン酸（GPP）であるが，近年，*cis* 型に縮合したネリル二リン酸（NPP）を基質とする酵素も報告されている．大腸菌内生産系構築において，大腸菌は mTPS の基質となる GPP や NPP の合成酵素を有していないため，これらの合成酵素と mTPS を組み合わせて発現させる必要がある．大腸菌を宿主としたモノテルペン大量生合成系として，リモネン，β-フェランドレンなどの報告例があるが，これらは GPP 合成酵素を利用したものである．しかし，GPP は大腸菌内在のファルネシル二リン酸（C_{15}）合成酵素の基質になり得るため，モノテルペン大量生産において，NPP を前駆体として用いることで高効率な代謝工学を達成出来ると考えた．そこで，GPP 合成酵素または NPP 合成酵素と β-フェランドレン合成酵素がそれぞれ T7 プロモーターの制御下で発現する大腸菌発現系を設計し，比較した．密閉容器内で培養後，容器内の気相をヘッドスペース GC 分析に供した結果，GPP 合成酵素，NPP 合成酵素どちらと共発現させた場合でも β-フェランドレンが生成され，*Solanum lycopersicum* 由来 NPP 合成酵素と *Lavandula angustifolia* 由来 β-フェランドレン合成酵素を共発現させた場合の生成量は，62 μg/L culture であった．さらに，他の植物由来の β-フェランドレン合成酵素の比較や宿主となる大腸菌の検討を行った．また，初発物質である IPP の供給量を増強するため，放線菌由来の IPP 生合成経路であるメバロン酸経路遺伝子クラスターを T7 プロモーターの制御下で発現させるコンストラクトを設計し，β-フェランドレン合成株に導入した．しかし，結果として逆に生成量は減少した．T7 プロモーターにより強く転写されることが不利に働く可能性が推測されたため，*tac* プロモーターに変更したところ，最大で 10 mg/L culture まで β-フェランドレン生成量を増大させることに成功した.

monoterpene, *Escherichia coli*, isoprenoid

講演番号：2A32p07
講演日時、会場：3 月 27 日 15:16～ A 校舎 32 会場

イソプレノイド生産に向けたシアノバクテリアの GGPP sytnhase の酵素学的解析
Enzymatic analysis of cyanobacterial GGPP synthase for isoprenoid production

○清田 浩史[1,3]、奥田 裕紀子[2]、平井 優美[3]、池内 昌彦[1,2,4]([1]東京大理、[2]東京大教養、[3]理研 CSRS、[4]CREST)
○Hiroshi KIYOTA[1,3], Yukiko OKUDA[2], Masami HIRAI Y.[3], Masahiko IKEUCHI[1,2,4] ([1]Grad. Sch. of Sci., Univ. Tokyo, [2]Grad. Sch. of Arts and Sci., Univ. Tokyo, [3]CSRS, RIKEN, [4]CREST)

イソプレノイドは二次代謝産物の主要なグループの 1 つであり、炭素数 5 のイソプレンが複数連なった構造を持つ。多様な物性、用途を持ち、香料・医薬品原料・色素・燃料・材料として工業的に幅広く使われている。私たちは生育の速いシアノバクテリアを用いて、光合成による二酸化炭素からの直接的イソプレノイド生産について研究している。外来モノテルペンであるリモネンをシアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 に生産させることに成功し、*Journal of Biotechnology* 誌に発表した(Kiyota *et al.*, 2014)。しかし、現在のところ *Synechocystis* におけるリモネンの生産量はカロテノイドやクロロフィル a といった内在のイソプレノイドの生産量に比べて数%のオーダーに留まっている。また、細胞の生育速度とリモネン生産速度、カロテノイド・クロロフィル a の含有量の間に未知の相関が示唆されることについて前回の日本農芸化学会 2014 年度大会にて発表を行った。これらのことから、シアノバクテリアを用いたイソプレノイド生産には内在のイソプレノイド生合成系についての解析が不可欠であると考えた。

多くの原核生物や植物・藻類の色素体は、解糖系のグリセルアルデヒド-3-リン酸とピルビン酸を出発物質として MEP 経路を通して C5 のイソペンテニルピロリン酸(IPP)とジメチルアリルピロリン酸(DMAPP)を合成する。プレニルトランスフェラーゼの一種ゲラニルゲラニルピロリン酸(GGPP) synthase はプライマーとなる DMAPP に IPP を縮合させることで、ゲラニルピロリン酸(GPP)、ファルネシルピロリン酸(FPP)、GGPP を順次合成する酵素で、イソプレノイド生合成における branching enzyme である。

今回私たちは、*Synechocystis* における GGPP synthase ホモログと推測された Slr0739 について解析を行った。まずプレニルピロリン酸の定量法として、プレニルピロリン酸の酸加水分解法とその加水分解産物の GC-MS 分析法を確立した。次に Slr0739 をクローニングし、大腸菌中で発現させてリコンビナントタンパク質を得た。得られたタンパク質を DMAPP と IPP と共に反応させたところ GPP、FPP、GGPP の産生が確認され、Slr0739 が GPP、FPP、GGPP の合成活性を持つことが確かめられた。中間生成物(GPP、FPP)の蓄積プロファイルについて、既知の GGPP synthase とシミュレーションによる解析を用いて比較を行うと、既知の GGPP synthase に比べ FPP に対して高い活性を持つことが示唆された。その後 DMAPP、GPP、FPP を基質とした短時間の酵素反応の結果を解析し、酵素学的パラメータ k_{cat} や K_m の値を得られたので *Synechocystis* におけるイソプレノイド生産について考察する。

isoprenoid, prenyltransferase, cyanobacteria

講演番号：2A32p08
講演日時、会場：3 月 27 日 15:27～ A 校舎 32 会場

ラビリンチュラ類 *Aurantiochytrium limacinum* のペルオキシソームにおける脂肪酸代謝
Fatty acid metabolism in peroxisomes in *Aurantiochytrium limacinum*

○合田 初美[1]、持永 聖也[1]、市村 陽香[1]、石橋 洋平[1]、林 雅弘[2]、沖野 望[1]、伊東 信[1,3] ([1]九大院農、[2]宮大院農、[3]九大バイオアーク)
○Hatsumi GODA[1], Seiya MOCHINAGA[1], Haruka ICHIMURA[1], Yohei ISHIBASHI[1], Masahiro HAYASHI[2], Nozomu OKINO[1], Makoto ITO[1,3] ([1]Fac. of Agri., Kyushu Univ., [2]Fac. of Agri., Univ. of Miyazaki, [3]Bio-Arch., Kyushu Univ.)

海洋性真核単細胞生物ラビリンチュラ類は、DHA 等の n-3 高度不飽和脂肪酸(n-3PUFA)の高い合成能と細胞内油滴への優れた蓄積能が評価され、魚油を補完する新たな n-3PUFA 生産源として近年注目を集めている。n-3PUFA を効率的に生産するためには、n-3PUFA 合成系の強化とともに、分解系の抑制が重要である。哺乳動物の脂肪酸β酸化系はミトコンドリアとペルオキシソームの両方に存在し、極長鎖脂肪酸のβ酸化はペルオキシソームで行われている。一方、植物や大部分の真菌においては、脂肪酸のβ酸化系はミトコンドリアには存在せず、ペルオキシソームにのみ存在すると考えられている。私達は、ラビリンチュラ類の脂肪酸β酸化系がミトコンドリア存在することを報告している(市村ら、2013 年日本生化学会)。しかし、ラビリンチュラ類のペルオキシソームにおける脂肪酸代謝に関する知見は殆どない。そこで本研究では、ラビリンチュラ類のペルオキシソームの機能を明らかにするために、*Aurantiochytrium limacinum* を対象としてペルオキシソーム関連タンパク質遺伝子のノックアウト(KO)株の作製と解析を行った。

KO の標的遺伝子として、ペルオキシソーム膜タンパク質の一種である peroxin 10 (PEX10)およびペルオキシソームプロセッシングプロテアーゼである trypsin domain containing 1 (Tysnd1)を選択した。PEX10 と Tysnd1 の相同配列を *A. limacinum* のドラフトゲノムデータベースで検索した結果、それぞれの遺伝子と相同性のある配列を 1 つずつ見いだした。ネオマイシン耐性遺伝子をマーカーとした相同組換え法によって、*A. limacinum* の PEX10 KO 株および Tysnd1 KO 株を取得した。野生株と両 KO 株の脂肪酸含量を比較したところ、野生株においてはグルコース枯渇後に脂肪酸含量が顕著に減少したのに対して、両 KO 株では脂肪酸の消費が抑制されていた。

ラビリンチュラ類は、生合成した脂肪酸を主としてトリアシルグリセロールのアシル基として油滴に蓄積するが、培地中の炭素源が枯渇すると脂肪酸をエネルギー源として利用していると推測される。本研究で得られた PEX10 KO 株と Tysnd1 KO 株の解析結果は、グルコース枯渇後の脂肪酸β酸化にペルオキシソームが関与していることを強く示唆する。また、先行研究と合わせると、ラビリンチュラ類の脂肪酸代謝はミトコンドリアとペルオキシソームの両方で行われていることが明らかになった。さらに、ペルオキシソーム関連タンパク質を標的とすることで、脂肪酸をより効率的に蓄積するラビリンチュラ類の変異株を分子育種することが可能であることが示された。

Fatty acid metabolism, peroxisomes, n-3PUFA

講演番号：2A32p09
講演日時、会場：3 月 27 日 15:38～ A 校舎 32 会場

赤色海洋酵母が産生する希少カロテノイドの生理機能解析

Analysis of biological activity of rare carotenoids derived from a red marine yeast

○佐藤 光[1]、津端 翔二郎[1]、能木 裕一[2]、浜本 牧子[1] ([1]明治大院・農、[2]独立行政法人海洋研究開発機構)

○Hikaru SATO[1], Shojiro TSUBATA[1], Yuichi NOGI[2], Makiko HAMAMOTO[1] ([1]Meiji Univ. Grad. Sch., [2]JAMSTEC)

【目的】

超高齢化社会になり、健康への関心が高まっている現代の日本において、薬に頼らない健康維持・増進、疾病の予防・改善に対する社会的な要請は益々強くなっている。一方、海洋酵母は新たな遺伝資源として注目されている。我々は新規機能性カロテノイドの探索を行う過程で、赤色海洋酵母 *Sporobolomyces symmetricus* が 2 種類の希少カロテノイド 2-Hydroxyplectaniaxanthin および Plectaniaxanthin を産生することを見出した。本研究ではこれらのカロテノイドがヒト培養細胞に及ぼす影響を調べた。

【方法と結果】

カロテノイドの抽出・精製は、酵母湿菌体を機械的に破砕し、アセトン抽出、ケン化、HPLC による分画により行った。まず始めに、希少カロテノイドがヒト培養がん細胞にアポトーシスを誘導するか否かについて、Annexin V-FITC および propidium iodide でヒト子宮頸がん細胞 Hela 細胞およびヒト肺胞基底上皮腺がん細胞 A549 細胞を染色し、フローサイトメーターに供することで、早期および後期アポトーシスを検出することにより解析した。その結果、2-Hydroxyplectaniaxanthin は Hela 細胞および A549 細胞のアポトーシス誘導に関与し、Plectaniaxanthin は Hela 細胞のアポトーシス誘導に関与している可能性が示唆された。

次に、細胞膜内に取り込まれた希少カロテノイドが細胞増殖におよぼす影響について、カロテノイド内封リポソームを取り込ませたヒト培養がん細胞を用いて WST-1 アッセイ法により調べた。その結果、いずれのカロテノイドも Hela 細胞および A549 細胞の増殖阻害作用を有することが示唆された。

現在、ヒト培養正常細胞（ヒト胎児肺線維芽細胞；TIG-1 細胞）を用いて、希少カロテノイドが DNA 酸化損傷におよぼす影響について解析を行っている。

carotenoid, red marine yeast, *Sporobolomyces symmetricus*

講演番号：2A32p10
講演日時、会場：3 月 27 日 15:49～ A 校舎 32 会場

アドニキサンチン光学異性体における抗アトピー効果への影響

Influence of the Anti-Atopic effect in the optical isomers of Adonixanthin

○高橋 季之、永井 秀忠 (JX 日鉱日石エネルギー株式会社)
○Toshiyuki Takahashi, Hidetada Nagai (JX Nippon Oil & Energy Corporation)

【緒言】*Paracoccus carotinifaciens* は、アスタキサンチン、カンタキサンチン、ゼアキサンチン、アドニキサンチンなど様々なカロテノイドを生合成する微生物である(図 1)。

Paracoccus 菌が産生するカロテノイドの有効利用を検討したところ、アドニキサンチン(以下「ADX」)(図 2)に抗アトピー効果が確認された。ADX は、光学異性体が 4 種存在している。その中で *Paracoccus* 菌が産生するのは 3S,3'R-ADX のみである。そこで残りの 3 種の ADX 光学異性体を作成し、それらについての抗アトピー効果について比較した結果について報告する。



図 1 *Paracoccus* 菌の電子顕微鏡写真

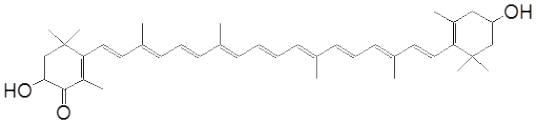


図 2 アドニキサンチン構造式

【方法】

Paracoccus 菌を培養し、培養液を乾燥させ乾燥菌体を得た。乾燥菌体中のカロテノイドをアセトン抽出し、晶析後、精製を繰り返して ADX を得た。

得られた 3S-3'R-ADX の 3'R 側水酸基を光延反応で反転させ、3S,3'S-ADX を得た。さらに 3S 側水酸基を反転させ、3R,3'S-ADX を得た。3S,3'R-ADX の 3'R 側水酸基を反転させずマスキングし、3S 側水酸基のみを反転させ、3R,3'R-ADX を得た。これら 4 種の ADX を用いて、抗アトピー効果を確認する実験として、アトピー性皮膚炎を起こさせるモデルである NC マウス(ダニ抗原を接種してアトピー様皮膚炎を人為的に発生させられる)系での実験を行った。4 種の光学異性体 ADX をコーン油に 0.06%濃度となるように溶解させた後、NC マウスに対しアドニキサンチン溶液を 28 日間(1 日 1 回 50μL)マウスの背部に経皮投与し、その効果について皮膚病変を観察・スコア化して評価した。

【結果】3S,3'R-ADX、3S,3'S-ADX、3R,3'S-ADX においてはアトピー性皮膚炎に効果が認められたが、3R,3'R-ADX においては、効果が認められなかった。

【考察】カロテノイドの光学異性体において、効能が異なる事があることが明らかになった。

Anti-Atopy, Adonixanthin, Optical Isomers

講演番号：2A32p11
講演日時、会場：3 月 27 日 16:10～ A 校舎 32 会場

pgsE 産物がγ-ポリグルタミン酸（PGA)の生産に与える影響 -各種のポリマー分子量解析法を用いた分子量の推定-

Effect of *pgsE* product on microbial production of gamma-polyglutamic acid - estimation of molecule weight using various analyses suitable for polymer -

○冨山 敬史[1]、猪井 崇弘[1]、梅名 泰史[2,4]、荻田 亮[1,3]、田中 俊雄[1]、藤田 憲一[1]（[1]阪市大・院理、[2]阪市大・複合先端研究機構、[3]阪市大・健康研セ、[4]JST さきがけ）

○ TAKASHI TOMIYAMA[1], TAKAHIRO INOI[1], YASUFUMI UMENA[2,4], AKIRA OGITA[1,3], TOSHIO TANAKA[1], KENICHI FUJITA[1] ([1]Grad. Sch. Sci., Osaka City Univ., [2]OCU Advanced Research Institute for Natural Science and Technology, [3]Res. center Urban Health Sports, Osaka City Univ., [4]PRESTO, Japan Science and Technology Agency)

納豆のネバネバの主成分である γ-ポリグルタミン酸（PGA）は、*Bacillus* 属細菌により生産されるバイオポリマーである。PGA は、吸水性、保湿性などに優れ、唾液分泌促進効果や免疫賦活効果に加えて、凝集沈殿活性なども報告され、産業・環境分野への応用も期待されている。これらの活性は、その分子量に依存して増大すると言われている。一方で、*Bacillus* 属細菌の PGA 生産性は不安定であり、そのため、PGA 生産性の向上に関わる因子の探索が PGA の低コスト生産化のための大きな課題となっている。

PGA 合成オペロンは、*pgsB, pgsC, pgsA* に加えて *pgsE* が含まれる。*pgsB, pgsC* および *pgsA* の３つの遺伝子は、PGA の生産に必須であり、それぞれの働きについては示唆されていたが、*pgsE* の働きについては議論の余地がある。しかしながら、本遺伝子については、先行研究により、PGA の発酵生産量を増大させ、その高分子量化を促進させる働きを持つ可能性が示された。

本研究に用いた菌株は、本研究室で単離された *Bacillus sp.* F-2-01 (F-2-01 株)、*B. subtilis* の標準株であり PGA 非生産性の 168 株である。PGA 高生産能を有する F-2-01 株は、生産された PGA の分子量も相対的に高いという結果が得られている。

【目的】PGA 合成オペロンにおける *pgsE* の有無により生産される PGA の分子量を下記の様々な手法を用いて推測し、*pgsE* の役割を検証する。

【方法及び結果】F-2-01 株および 168 株由来の *pgsBCA, pgsBCAE* を用いた強制発現系を、それぞれ 168 株を用いて構築した。得られた形質転換株により発酵生産された PGA の分子量をアガロースゲル電気泳動、ゲル濾過カラムを用いる HPLC 解析および動的光散乱法などにより測定し、分子量を推定、比較した。その結果、F-2-01 株、168 株由来の *pgsBCAE* によって生産された PGA の分子量は両株由来の *pgsBCA* によって生産された PGA より大きいことが確認された。以上の結果より、*pgsE* には生産性向上以外にも PGA の分子量を増加させる機能があることが検証され、その相対分子量についてもより詳しい情報を得ることができた。

gamma-polyglutamic acid, Bacillus subtilis, biopolymer

講演番号：2A32p12
講演日時、会場：3 月 27 日 16:21～ A 校舎 32 会場

マンノシルエリスリトールリピッド量産酵母 Pseudozyma antarctica の遺伝子発現プロファイルの解析

Transcriptome analysis of the yeast Pseudozyma antarctica, producing the large number of mannosylerythritol lipids

○森田 友岳、小池 英明、羽部 浩、北本 大 (産総研)
○Tomotake Morita, Hideaki Koike, Hiroshi Habe, Dai Kitamoto (AIST)

Pseudozyma antarctica はクロボキン科に属する担子菌系酵母であり、植物油から大量のマンノシルエリスリトールリピッド（MEL）を生産する。MEL は、優れた界面物性だけでなく様々な生理機能を有する機能性バイオ素材として、幅広い産業での実用化が期待されている。本研究では、*P. antarctica* による MEL 量産メカニズムの解明を目指して、遺伝子発現プロファイルの解析を実施した。

MEL 量産（炭素源＝植物油）と MEL 低生産（炭素源＝グルコース）条件で培養した *P. antarctica* の DNA アレイ解析の結果から、MEL 量産に関与する遺伝子群を明らかにするため、MEL 生合成遺伝子クラスターと発現プロファイルが類似する 264 個の遺伝子を抽出した。264 個の中で、179 遺伝子が KOG 分類で機能が推定され、そのうち 93 遺伝子（35.2%）は代謝に関与することが示唆された。*P. antarctica* の代謝関連遺伝子は 1157 個であり、全遺伝子の 17.7%であることから、MEL 量産条件下で *P. antarctica* の代謝関連遺伝子が有意に発現していると考えられた。そこで、MEL 量産酵母である *P. antarctica* と、MEL 低生産性の糸状菌 *Ustilago maydis* の遺伝子発現プロファイルを比較した結果、*P. antarctica* では解糖系と TCA 回路の遺伝子発現誘導率が、MEL 量産条件（炭素源＝植物油）で増加しているのに対して、*U. maydis* では低下していた。TCA 回路の律速酵素であるイソクエン酸デヒドロゲナーゼ（NAD+）の酵素活性を比較したところ、MEL 量産条件（炭素源＝植物油）において、*P. antarctica* では酵素活性が顕著に増加しているのに対して、*U. maydis* ではほとんど変化が見られなかった。また、*P. antarctica* は植物油を炭素源として良好に生育するが、*U. maydis* は、植物油を炭素源とした場合に生育速度が低下した。両菌株とも、培地中の植物油を資化するために機能するβ酸化経路については発現誘導され、脂肪酸合成経路は抑制されていた。以上の結果から、植物油を炭素源とする培養条件下で、*P. antarctica* の一次代謝が効率良く機能しており、*U. maydis* とはエネルギー獲得メカニズムが異なることが考えられた。また、*P. antarctica* は、植物油から MEL の前駆体を効率良く供給できるだけでなく、油を炭素源とした代謝機能が高いことが、MEL の量産を可能にしていると考えられる。今後、より詳細な遺伝子およびタンパク質レベルでの研究によって、*P. antarctica* の産業酵母としての育種・改良が期待される。

【参考文献】

Morita et al., PLoS One, 9(2):e86490 (2014)
Morita et al., Genome Announc., 1(2):e0006413 (2013)

Yeast, Glycolipid, Transcriptome

講演番号：2A32p13
講演日時、会場：3 月 27 日 16:32～ A 校舎 32 会場

乳酸菌発酵生産物質による口内細菌叢変化の解析

Analysis of microbial flora affected by fermentation products of lactobacillus

○太田 洋一[1]、渡部 晋三[2]、岡田 勉[2]、永山 正人[3]、齋藤 道雄[4]、岩田 健一[1] ([1]芝工大院シ、[2]KS 西、[3]永山歯科、[4]齋藤歯科)
○Yoichi OTA[1], Shinzo Watanabe[2], Tsutomu Okada[2], Masato Nagayama[3], Michio Saito[4], Kenichi Iwata[1] ([1]Grad.sch. Shibaura Inst.of Tech., [2]KS West Japan Ltd., [3]Nagayama dental clinic, [4]Saito dental clinic)

［目的］歯周病とは, 歯と歯ぐきの隙間から侵入した細菌が,歯肉に炎症を引き起こし, さらには歯を支える骨を含めた支持組織を溶かしてしまう病気である. 日本人では, 45 歳以上で 3 割, 65 歳以上では 5 割を超える方が歯周病であるという報告がされている. 歯周病は歯の喪失の大きな原因であると同時に, 糖尿病, 心疾患, 脳梗塞, 肺炎などの疾患や低体重児出産, 早産などに関連があるという報告がされている. これらの報告から歯周病の予防は, 口腔と体全体の健康維持に重要であると考えられる. 歯周病には, 原因菌として *Porphyromonas gingivalis, Aggregatibacter actinomycetemcomitans, Tannerella forsythensis* などが挙げられている. しかし, これら以外にも十数種類もの細菌が歯周病との関連が疑われており, 他の感染症のように 1 種類の細菌によるものではない. これらの細菌は歯垢と呼ばれるものを形成し増殖する. そのため歯垢を除去することが歯周病を予防する上で重要である. 歯垢を除去するために最も効果的な方法は, 歯ブラシ, スケーラーなどによる物理的な除去である. 物理的な除去の補助として抗生物質による化学的な除去があるが, いわゆる善玉菌も除去してしまうことや薬剤耐性菌の発生など問題点も多い. そこで微生物を利用した歯垢の除去が注目されている. 本実験ではその中でも特に乳酸菌発酵生産物質に注目した.

乳酸菌発酵生産物質とは黒糖を乳酸菌で発酵させたもので, 歯周病の改善の効果があることが報告されており, 口腔内の細菌叢に影響を与えることが示唆されている. 細菌叢に影響を与える原因として, 菌源に含まれる菌自体やその代謝産物が考えられる. そのため, 本研究ではこの乳酸菌発酵生産物質の歯周病に対する作用メカニズムの解明を目的とする.

［方法と結果］ 発酵培養槽の上清及び沈殿物を取得し, PCR-DGGE 法により細菌叢を比較した. 複数のバンドが検出され, 両サンプルで共通のバンド, それぞれでのみ検出されるバンドが存在した. それらのバンドについてはシーケンスを行い, 属種の推定を行う予定である. 次に乳酸菌発酵生産物質及び発酵培養槽からの菌の取得、単離、16S rDNA を利用した属種の推定を行った. 37℃, 好気条件でLB寒天培地, MRS寒天培地で培養を行ったところ3種類の菌が得られ, それぞれ *Lysobacter sp., Lactobacillus mobilis, Meganema perideroedes strain Gr10* と推定された. 次に乳酸菌発酵生産物質の使用者と非使用者から歯垢を採取し PCR-DGGE 法で細菌叢の変化を調査する. 使用者の群には乳酸菌発酵生産物質を 1 週間程度使用してもらう予定である.

periodontal disease, lactobacillus, DGGE

講演番号：2A32p14
講演日時、会場：3 月 27 日 16:43～ A 校舎 32 会場

抗酵母活性を有する乳酸菌の選抜と抗酵母物質の特性解析

Screening of lactic acid bacteria with anti-yeast activity and characterization of the anti-yeast substances

○松浦 雄幸、荒川 健佑、宮本 拓（岡山大院環境生命）
○Yuko MATSUURA, Kensuke ARAKAWA, Taku MIYAMOTO (Okayama Univ.)

【背景・目的】酵母やカビといった真菌は発酵食品製造において有益な働きをする一方で、食品汚染による重大な経済的損害や公衆衛生上の問題を引き起こす。近年では、乳酸菌の生産する抗菌物質（バイオプリザバティブ）を利用した食品保存法（バイオプリザベーション）が注目され、食品汚染真菌に対する抑制効果も期待されている。乳酸菌の生産する抗真菌物質には酢酸、3-ヒドロキシ脂肪酸、3-フェニル乳酸、4-ヒドロキシフェニル乳酸、ジアセチル、ロイテリン、環状ジペプチドなどが挙げられるが、その多くが抗カビ活性に関するものであり、抗酵母活性に関する報告は少ない。そこで本研究では、食品汚染酵母に対して十分な抗酵母活性を示す乳酸菌株を選抜し、その抗酵母活性の諸性質の解析、および抗酵母物質の分離・同定を行うことを目的とした。
【方法】*Rhodotorula mucilaginosa* JCM 8115、*Candida parapsilosis* JCM 1612 および *Saccharomyces cerevisiae* 4C を指標酵母とし、寒天重層法（一次選抜）および寒天平板拡散法（二次選抜）にて抗酵母活性測定を行った。供試菌には研究室保有の乳酸菌 211 菌株を用いた。選抜乳酸菌株の抗酵母活性は、10%還元脱脂乳中での指標酵母株との共培養試験においても確認した。選抜乳酸菌株の菌種同定は糖資化性分析および 16S rRNA 遺伝子配列解析により行った。次に、選抜乳酸菌株の 10 倍濃縮培養上清を用いて、抗酵母活性に及ぼす培養温度（25、30、37℃）、熱処理（121℃、15 分）、酵素処理（カタラーゼ、各種プロテアーゼ）、および上清 pH（2.0～10.0）の影響を調べた。抗酵母物質（有機酸）の分離・同定は、酢酸エチルでの抽出後にキラルカラムを用いた逆相 HPLC にて行った。
【結果】寒天重層法では、指標酵母 3 菌株（JCM 8115 株、JCM 1612 株および 4C 株）に対してそれぞれ 120、12 および 1 菌株の乳酸菌が抗酵母活性を示した。うち抗酵母活性の強かった 4 菌株を一次選抜菌株とし、その 10 倍濃縮培養上清を寒天平板拡散法による二次選抜試験に供した。その結果、3121M0s 株（*Lactobacillus pentosus* と同定）のみが抗酵母活性を示し、その活性は還元脱脂乳中での共培養試験でも確認された。3121M0s 株の抗酵母活性は、培養温度の影響を受けず、熱処理に対して安定であった。また、一部のプロテアーゼによって活性の減少が見られたが、概ね試験した酵素処理に対しても安定であった。そして、3121M0s 株の抗酵母活性は酸性条件下でのみ検出されたことから、抗酵母物質は有機酸と想定された。抗酵母物質の分離・同定は逆相 HPLC 分析で行い、D, L-乳酸等の有機酸の存在を確認した。以上のことから、3121M0s 株の高い抗酵母活性は、D, L-乳酸を含む有機酸を主とした複数の抗酵母物質の相乗効果によって起きていることが示唆された。

lactic acid bacteria, biopreservation, anti-yeast activity

講演番号：2A32p15
講演日時、会場：3 月 27 日 16:54～ A 校舎 32 会場

Lactobacillus helveticus を用いた発酵豆乳に含まれる抗菌物質に関する研究
Research on antibacterial substances in soymilk fermented by *Lactobacillus helveticus*
○福留 香菜子、荒川 健佑、宮本 拓 (岡山大院環境生命)
○Kanako FUKUDOME, Kensuke ARAKAWA, Taku MIYAMOTO (Okayama Univ.)

【目的】近年、食生活の質的向上に伴って、できるだけ素材本来の自然に近い状態の食品を求める消費者が増加し、合成保存料の添加による食品保存が敬遠されつつある。この問題に対処するために、「人々が長年にわたり食品として、あるいは食品とともになんら害作用もなしに食べてきた植物・動物あるいは微生物起源の抗菌物質」であるバイオプリザバティブを利用した保存法（バイオプリザベーション）に注目が集まっている。中でも、安全・安心面への配慮から、乳酸菌発酵物に含まれる抗菌物質を利用した食品保存が期待されている。そこで本研究では、当研究室保有の *Lactobacillus helveticus* の中から発酵豆乳で抗菌活性を呈する菌株を選抜し、その抗菌特性を明らかにすることによって、選抜菌株を用いた発酵豆乳のバイオプリザバティブとしての有用性を検証することとした。
【方法】*Lb. helveticus* JCM 1120^{T}、130B4、1B374、1M376、2482M7、4811、940B5 および MSC003 の 8 菌株をそれぞれ豆乳に接種し、37℃で 120 時間培養後、遠心分離にて発酵豆乳上清を調製した。発酵豆乳上清の抗菌活性は *Listeria monocytogenes* VTU206 を指標菌とした寒天平板拡散法にて測定し、阻止円の大きさから乳酸菌株の選抜を行った。次に、選抜乳酸菌株の発酵豆乳上清の抗菌活性に及ぼす溶液 pH（3.0-9.5）、培養温度（25-42℃）、熱処理（65-121℃）、および酵素処理（カタラーゼ、プロテアーゼ）の影響を調べた。また、種々の食中毒原因菌および乳酸菌を用いて抗菌スペクトルの測定を行った。発酵豆乳に含まれる抗菌物質の精製は逆相 HPLC 等を用いて試みた。
【結果】発酵豆乳上清における抗菌活性は供試 8 菌株中 3 菌株で検出され、うち比較的大きな阻止円を形成した 940B5 株および MSC003 株を選抜して以降の試験に用いた。両選抜菌株ともに pH 4.5 以下の酸性領域で明確な阻止円を形成し、37℃培養時に最も高い抗菌物質産生を示した。発酵豆乳上清の抗菌活性は 65-121℃の熱処理に対して安定で、カタラーゼおよびプロテアーゼの酵素処理に対しても比較的安定であった。しかし、α-キモトリプシン等のいくつかのプロテアーゼ処理によって活性は減少した。次に、選抜菌株の抗菌スペクトル測定を行ったところ、両菌株ともに食中毒原因菌（*Lis. monocytogenes*、*Escherichia coli*）およびいくつかの乳酸球菌（*Enterococcus*、*Lactococccus*）に対して抗菌活性が見られた。現在、HPLC 等を用いて発酵豆乳上清に含まれる一部の抗菌物質の精製を試みているが、大豆タンパク質由来の新たな抗菌ペプチドの存在が示唆されている。発酵豆乳上清の抗菌物質は耐熱性を有し、食中毒細菌にも効果を発揮することから、今後のバイオプリザバティブとしての有効利用が期待される。

fermented soymilk, *Lactobacillus helveticus*, antibacterial activity

講演番号：2A32p16
講演日時、会場：3 月 27 日 17:15～ A 校舎 32 会場

モンゴル地域の伝統的発酵乳アイラグより分離した *Leuconostoc mesenteroides* 213M0 が産生するバクテリオシンの特性解析

Characterization of a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides* 213M0 isolated from Mongolian fermented milk, airag

○吉田 早紀、羽野 知紘、荒川 健佑、宮本 拓（岡山大院環境生命）
○Saki YOSHIDA, Chihiro HANO, Kensuke ARAKAWA, Taku MIYAMOTO (Okayama Univ.)

【目的】乳酸菌が産生する抗菌ペプチドであるバクテリオシンは、安全な食品保存成分（バイオプリザバティブ）としての有効利用が期待されている。本研究では、モンゴル地域の伝統的発酵乳・アイラグから分離した *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* 213M0 が産生するバクテリオシンについて、その諸性質を明らかにし、バイオプリザバティブとしての有用性を評価することを目的とした。

【方法】213M0 株を MRS 培地にて 25℃で 72 時間培養し、経時的な生菌数および培養上清中の抗菌活性を測定した。抗菌活性測定は *Listeria monocytogenes* VTU206 を指標菌とした寒天平板拡散法にて行った。次に、抗菌活性に及ぼす pH（2.0-11.0）、温度（4-121℃）および酵素（カタラーゼ、各種プロテアーゼ）処理の影響を試験した。そして、研究室保有の乳酸桿菌、乳酸球菌および食中毒原因菌に対する抗菌スペクトルの測定を行った。さらに、SDS-PAGE 後の *in situ* 抗菌活性測定による分子量推定、および抽出プラスミドをテンプレートに既知 *Leuconostoc* バクテリオシン構造遺伝子をターゲットとした PCR 解析を行った。

【結果】213M0 株の培養上清中への抗菌物質産生は対数増殖期に見られ、培養開始 24-48 時間後に最大の活性を示した。培養上清の抗菌活性は、広い pH 域（2.0-11.0）および様々な温度条件下（4-121℃）で比較的安定していた。ただし、培養上清を中和すると耐熱性は低下した。また、カタラーゼに抵抗性を示したものの、各種プロテアーゼ処理によって失活することが確認された。抗菌スペクトル試験では、一部の乳酸球菌およびリステリア菌にのみ抗菌活性を示した。この特徴的な狭い抗菌スペクトルと抗リステリア活性は、典型的なペディオシン様 ClassⅡa バクテリオシンのものと一致する。本抗菌活性本体の分子量は、SDS-PAGE 後の *in situ* 抗菌活性測定の結果から、2.6-3.0 kDa 程度と推測された。また、アガロースゲル電気泳動において複数のプラスミドバンドが確認され、プラスミドをテンプレートとした PCR 解析では、leucocin A-UAL187 と mesentericin Y105 の構造遺伝子をターゲットとしたプライマーペアにて増幅断片が検出された。以上のことから、*Leu. mesenteroides* subsp. *dextranicum* 213M0 の産生するバクテリオシンは、leucocin A タイプであることが示唆された。現在、バクテリオシン生合成関連遺伝子をコードするプラスミドの特定とその配列解析を行っている。

bacteriocin, *Leuconostoc mesenteroides*, *Listeria monocytogenes*

講演番号：2A32p17
講演日時、会場：3 月 27 日 17:26～ A 校舎 32 会場

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

Purification and identification of the bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* PJR24 isolated from pickled Japanese radish

○木村 宏和[1]、松崎 弘美[2] ([1]尚絅大生活科学、[2]熊本県大環境共生)
○Hirokazu KIMURA[1], Hiromi MATSUSAKI[2] ([1]Shokei Univ., [2]Pref. Univ. Kumamoto)

【目的】ある種の乳酸菌が生産する抗菌ペプチド（バクテリオシン）は、食中毒細菌を含むグラム陽性菌に対して抗菌作用を示すこと、乳酸菌は伝統的に食経験を持ち安全性が高いことなどの観点から、天然の食品保存料としての利用が期待されている。また、バクテリオシンは抗菌スペクトルや特性が異なるため、様々なバクテリオシンの組み合わせによる効果的な微生物制御も可能になる。そこで、様々な抗菌スペクトルや特性を示すバクテリオシンの探索は必要不可欠である。本研究では、発酵食品のたくあん漬けからナイシンとは異なるバクテリオシン生産乳酸菌を分離し、そのバクテリオシンを精製し、構造解析を行った。
【方法および結果】たくあん漬けから、ナイシン Z 生産乳酸菌 *Lactococcus lactis* とナイシンとは異なるバクテリオシン生産乳酸菌 *Lactococcus lactis* PJR24 を分離した。PJR24 株の培養液上清より粗精製したバクテリオシンの pH、熱安定性について検討したところ、比較的広い pH 領域で安定であったが、110℃、10 分のオートクレーブ処理により検討したすべての pH 領域において失活した。PJR24 株の培養液上清より、70%飽和硫酸アンモニウム分画、透析、DEAE sepharose を用いた陰イオン交換クロマトグラフィー、Octyl sepharose を用いた疎水性相互作用クロマトグラフィーに供し、本バクテリオシンの精製を行った。精製したバクテリオシンの Tricine-SDS-PAGE 分析およびゲルバイオアッセイ（重層法）を行ったところ、本バクテリオシンは単一のバンドとして検出され、その分子量は約 10 kDa と推定された。また、そのゲルを PDVF 膜に転写し本バクテリオシンのアミノ酸配列分析を行い、N 末端から 12 番目を除く 19 番目までのアミノ酸配列を決定した。そのアミノ酸配列の相同性検索を行ったところ、相同性が高いものは見られなかった。そのため、本バクテリオシンは新規性の高いバクテリオシンであると考えられた。現在、精製したバクテリオシンを逆相 HPLC で分取し、そのアミノ酸配列分析および質量分析を行っている。

bacteriocin, lactic acid bacteria, *lactococcus*

講演番号：2A32p18
講演日時、会場：3 月 27 日 17:37～ A 校舎 32 会場

Isolation of a marine *Lactobacillus* strain with bacteriocin-like activity

○Hiroshi TANAKA[1], Kota TAKESHIMA[2], Makoto MIYAGI[2], Akihiko KANAMOTO[3], Shinya IKEMATSU[1] ([1]National Institute of Technology, Okinawa College, Bioresources Engineering, [2]National Institute of Technology, Okinawa College, Advanced Course, [3]OP BIO FACTORY Co., Ltd.)

We collected a total of 150 different kinds of natural sources, such as leaves (78), flowers (38), fruits (28), seaweeds (5), and a seagrass (1), as samples for LAB isolation. Each terrestrial sample (approximately 0.5 g) was suspended with sterile saline (9 mL), and then 0.1 mL of the suspension was applied to an MRS Agar plate supplemented with 1% (w/v) $CaCO_3$. Marine samples (approximately 0.5 g) were also suspended with sterile, 1/2 concentration of artificial seawater (5 mL), and the suspension was spread out onto an MRS Agar plate with 1% (w/v) $CaCO_3$. Plates were incubated anaerobically at 37 ℃ for 48 h to grow colonies. There were colonies with a clear zone around them, which have been recognized as acid-producing colonies.

We isolated a total of 155 colonies from 150 kinds of the natural sources. Out of the 155 colonies, 68 colonies produced acids. Among them, 60 colonies were catalase-negative and 35 colonies were Gram-positive, indicating that we could isolate a total of 35 colonies as possible LAB. With respect to marine LAB, we isolated 4 colonies from 5 kinds of seaweeds and 3 colonies from a seagrass. Five out of the 7 colonies were acid-producing, among which were at least 3 colonies as possible marine LAB, being catalase-negative and Gram-positive. With respect to antimicrobial activity, we have obtained one strain, namely IT-1, out of the 35 possible LAB colonies, which could inhibit the growth of the indicator strain, *Lactobacillus delbruekii* subsp. *bulgaricus* JCM 1002. The isolation source of the IT-1 strain was a seagrass and none of the terrestrial possible LAB showed antimicrobial activity in this study. The antimicrobial activity produced by the IT-1 strain showed thermal stability and this property was identical to those of a culture supernatant of gassericin T-producing strain (JCM 11046). Gassericin T, consisted of two peptides, is a members of Class II bacteriocins, which are small, heat-stable, and non-lantibiotics. We could then infer that the antimicrobial activity produced by the IT-1 strain could have originated from a heat-stable bacteriocin. Analysis of the 16S rRNA gene sequences of IT-1 showed 97% similarity with *Lactobacillus plantarum* WCFS1 16S rRNA gene and *Lactobacillus pentosus* MP-10 16S rRNA gene.

lactic acid bacteria, marine, bacteriocin

講演番号：2A32p19
講演日時、会場：3 月 27 日 17:48～ A 校舎 32 会場

環状バクテリオシン enterocin NKR-5-3B 生合成における環状化部位のアミノ酸残基の影響
Effects of amino acid residues involved in circularization on the biosynthesis of a circular bacteriocin, enterocin NKR-5-3B
○杉野 春貴[1]、PEREZ Rodney Honrada[1]、石橋 直樹[1]、善藤 威史[1]、中山 二郎[1]、園元 謙二[1,2]（[1]九大院農、[2]九大バイオアーク）
○Haruki SUGINO[1], Rodney Honrada PEREZ[1], Naoki ISHIBASHI[1], Takeshi ZENDO[1], Jiro NAKAYAMA[1], Kenji SONOMOTO[1,2] ([1]Fac.Agric., Kyushu Univ., [2]Bio-Arch., Kyushu Univ.)

細菌によって生産される抗菌性ペプチドであるバクテリオシンは、リボソーム上で合成され、主に生産菌の近縁種に対し強い抗菌活性を示す。特に、ペプチドの N 末端と C 末端とがペプチド結合した稀有な構造を有する環状バクテリオシンは、熱、低 pH、消化酵素に一般に安定であることから、食品保存料や医薬品をはじめとする様々な分野への応用が期待される。本研究で対象としている enterocin NKR-5-3B（Ent53B）は、*Enterococcus faecium* NKR-5-3 によって生産され、様々なグラム陽性細菌に対して抗菌活性を示す、環状バクテリオシンである。環状化した成熟型の Ent53B は 64 アミノ酸残基で構成され､その前駆体は環状バクテリオシンの中でも比較的長い 23 アミノ酸残基のリーダー配列を N 末端側に有している。Ent53B をはじめとする環状バクテリオシンは、リーダー配列の切断、環状化、菌体外排出の 3 つのプロセスを経て生合成されるものと予想されるが、その生合成機構の詳細は未だ明らかにされていない｡そこで本研究は Ent53B の生合成機構の解明を目的としており、本発表では特に、Ent53B 本体の環状化部位のアミノ酸に変異を導入し、環状化に必要なアミノ酸残基の評価を行った内容について報告する。

Ent53B は N 末端側の Leu と C 末端側の Trp がペプチド結合することにより、環状化している。このうち、N 末端側の Leu を Ile、Val、Ala、Phe、Tyr、Ser、Thr、Glu、Gly、Pro にそれぞれ変異させた株の培養液上清を LC/MS で分析し、変異 Ent53B の生産能を評価した。その結果、Ile、Val、Ala、Phe に変異させた株では変異 Ent53B が検出された一方、その他の株では検出されなかった。また、元の Ent53B 生産株と比較して、Ile に変異させた株は 68.1%、Val は 2.30%、Ala は 13.2%、Phe は 48.0%に、それぞれ変異 Ent53B の生産量が低下していた。さらに、生産された変異 Ent53B の抗菌活性を、精製した変異 Ent53B の最少生育阻止濃度(MIC)によって評価したところ､各変異 Ent53B は元の Ent53B と比較して MIC が高くなり、抗菌活性が低下していた。

以上の結果から、Ent53B の環状化には、ペプチド本体の N 末端側のアミノ酸残基の種類が重要であることが示された。Ent53B の N 末端と C 末端の環状化部位は、NMR の結果からα-ヘリックスを構成していることが明らかにされており、今回、変異 Ent53B が生産されたアミノ酸変異の種類は、疎水性でかつαーヘリックスを形成させるアミノ酸であった。従って、Ent53B の環状化には N 末端と C 末端のアミノ酸の疎水性相互作用とα-ヘリックスの形成が必要である可能性が示された。現在、環状化部位の C 末端側のアミノ酸残基についても評価を進めている。

bacteriocin, circular peptide, antimicrobial peptide

講演番号：2A32p20
講演日時、会場：3 月 27 日 17:59～ A 校舎 32 会場

Production of ergothioneine by methylotrophic bacteria, *Methylobacterium* species

○Kabir Md Alamgir[1], Sachiko Masuda[1,2], Akio Tani[1] ([1]Institute of Plant Science and Resources, Okayama University, [2]JST ALCA)

Background: *Methylobacterium* species are facultative methylotrophic bacteria that are able to use methanol as well as multi-carbon substances. We isolated *M. aquaticum* strain 22A from a hydroponic culture sample of a moss, *Racomitrium japonicum*, and showed that the strain is capable of promoting the moss growth (1). We conducted metabolome analysis to get insight into metabolic change in plants inoculated with strain 22A. We fortuitously found that strain 22A accumulates a unique amino acid, ergothioneine (EGT). EGT is a sulfur-containing, non-proteinogenic amino acid derived from histidine. The compound is reported to be synthesized in few organisms. Human cells contain, but do not synthesize EGT. The clustered *egtABCDE* genes were shown to synthesize EGT in *Mycobacterium* (2). The homologous genes for *egtB* and *egtD* were also found in many eukaryotes and bacteria, including *Methylobacterium* species. The productivity, its role in methylotrophy, and ecology for *Methylobacterium* species remain uninvestigated. In this study, we investigated the feasibility of fermentative EGT production from methanol, and also the biological significance of EGT synthesis using strain 22A.

Results and discussion: In strain 22A, EGT was found to be one of the most abundantly accumulated amino acids. Almost all *Methylobacterium* species can synthesize EGT, and strain 22A was one of the most productive strains. When methanol concentration was varied, 2% methanol was the best for EGT productivity, and the production lasted for 1 months. Methanol was the best substrate for EGT production, but ethanol, glucose, and succinate could also serve as substrates. Supplementation of histidine and cysteine resulted in increased productivity. *egtBD* genes were identified in strain 22A genome, and they were subjected to mutagenesis. The mutation completely abolished EGT production. The mutant showed better growth on methanol than wild type, probably due to loss of EGT synthesis cost. At the same time, this result suggested that EGT is not involved in methylotrophy. However, the mutant showed susceptibility to heat treatment and UV irradiation, suggesting that EGT is involved in the resistance for these stresses. We consider that EGT will be important for their fitness to inhabit on plant surfaces, and this hypothesis is now under investigation.

(1) Tani et al., PLoS ONE 7, e33800(2012)
(2) Seebeck FP. J Am Chem Soc 132, 6632 (2010)

ergothioneine, methylotroph, *Methylobacterium* species

講演番号：2A34a02
講演日時、会場：3 月 27 日 09:11～ A 校舎 34 会場

Triacylglycerol を分泌する酵母変異株の解析

Characterization of the yeast mutants secreting triacylglycerol

○秦野 琢之、藤井 洋紀、岡田 桃子、松崎 浩明（福山大・生命工）
○Takushi HATANO, Hiroki FUJII, Momoko OKADA, Hiroaki MATSUZAKI (Fukuyama Univ.)

【目的】油脂生産微生物のほとんどは、産物油脂を細胞内に蓄積する。我々は、油脂を細胞外へ分泌生産する微生物の育種実験を行ってきた。産物油脂を細胞外に排出させることにより、生産能の強化と抽出コストの削減を目指している。これまで 2 種の酵母（*Trichosporon* sp.および *Saccharomyces cerevisiae*）の triacylglcerol（TG）分泌変異株を材料として、TG の細胞外排出機構の解析を行ってきた。

【方法･結果】*S. cerevisiae* の STG1 変異株は、TG を菌体外に漏出する。STG1 株の TG 分泌（$Halo^{+}$）形質は 1 遺伝子変異に由来し、野生型遺伝子により相補される。また細胞凝集性が強く、遺伝子クローニングの障壁ともなってきた。変異遺伝子を特定するため、Yeast-Knock-Out collection（YKO、約 4800 株）より TG 分泌の表現型を示す株をスクリーニングした。得られた候補株について、STG1 株との相補試験並びに菌体外 TG の検出を行った。その結果，候補遺伝子は 3 つに絞られた。親株（YP1）の候補遺伝子をそれぞれ破壊したところ，菌体外に TG が検出されるようになった。候補遺伝子の塩基配列を親株のそれとそれぞれ比較した結果，いずれの候補遺伝子も ORF の上流数百塩基から下流数百塩基までに変異点は存在しなかった。STG1 株の微小管や核を観察すると *spc72Δ*株と同様の形質を有していた。そこで *spc72* 遺伝子の RT-PCR を行い発現の有無や強弱を確認したが，どちらの株でも発現しており，有意差は認められなかった。今後，候補遺伝子の発現量を定量して親株と比較し，差がないかを確認したい。

一方、これまでの知見をもとに、*S. cerevisiae* 以外の酵母で TG 分泌が可能であるかを確認することとした。全ゲノム配列が同定されている *Kluyveromyses lactis* と *Yarrowia lipolytica* を材料に用いて、*S. cerevisiae* の TG 分泌の表現型を示す遺伝子とのオルソログ遺伝子を破壊することで、TG 分泌型酵母を取得することを検討している。

secretion, yeast, triacylglycerol

講演番号：2A34a03
講演日時、会場：3 月 27 日 09:22～ A 校舎 34 会場

深海酵母が産生するフェノール代謝関連酵素 catechol 1,2-dioxygenase の酵素化学的特徴および遺伝子発現解析

Characterization of catechol 1,2-dioxygenase and analysis of the gene expression level produced by a marine yeast isolated from deep sea

○前田 剛志[1]、柴田 光治[2]、能木 裕一[3]、浜本 牧子[1,2]（[1]明治大・農、[2]明治大院・農、[3]独立行政法人海洋研究開発機構）
○Takayuki MAEDA[1], Koji SHIBATA[2], Yuichi NOGI[3], Makiko HAMAMOTO[1,2] ([1]Meiji Univ., [2]Meiji Univ. Grad. Sch., [3]JAMSTEC)

【目的】

環境浄化技術における微生物の役割は益々重要になっている。一方、海洋酵母は新たな遺伝資源として注目されている。我々は各種化成品の原料として広く用いられているフェノールに着目し、高濃度フェノール分解能を有する海洋酵母を探索した結果、高濃度フェノールを速やかに分解する深海酵母 *Debaryomyces hansenii* を見出し、その代謝は芳香環の *ortho*-開裂経路によることを明らかにした。本研究ではこの深海酵母が産生する catechol 1,2-dioxygenase（C12O）について解析を行った。C12O の酵素化学的な特徴について、これまでに細菌由来の酵素の報告は多数あるものの酵母由来の酵素の報告はほとんどない。

【方法と結果】

深海酵母を、フェノールを単一炭素源とする液体培地で培養し、菌体を機械的に破砕して得た無細胞抽出液を硫安沈殿後、Superdex 75 pg ゲルろ過カラムクロマトグラフィーおよび HiTrap Q HP イオン交換カラムクロマトグラフィーにより電気泳動的に単一バンドとなる酵素標品を得た。その結果、本酵素は 35kDa のポリペプチドからなる二量体であると考えられ、これまでに報告されている酵母由来の C12O に類似していた。酵素活性はカテコールを基質とし、反応産物である *cis, cis*-muconic acid の生成量を吸光光度法で測定した。その結果、本酵素の至適温度は 20～25℃、10～30℃という広い温度範囲で 90%以上の活性を維持しているというこれまでに報告のない特徴的な温度の影響を有していた。また、40℃、1 時間の熱処理後の残存活性は約 30%であった。

リアルタイム RT-PCR による遺伝子発現解析は、*D. hansenii* 基準株のゲノムアノテーションにより特定されている C12O 遺伝子配列を基に設計したプライマーを用いて行った。その結果、本酵素の mRNA 発現量は培地中の基質が減少し始める直前に最大となり、以後減少を続け、基質が検出限界に達した時点ではゼロになった。

bioremediation, Debaryomyces, catechol 1,2-dioxygenase

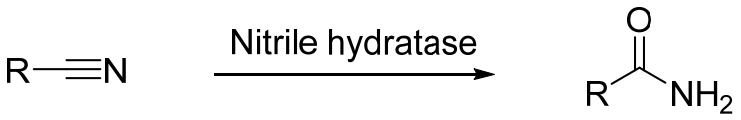
講演番号：2A34a04
講演日時、会場：3 月 27 日 09:33～ A 校舎 34 会場

耐熱性ニトリルヒドラターゼの性質検討

Characterization of thermostable nitrile hydratase

○朴木 佳那[1]、安川 和志[1,2]、浅野 泰久[1,2] ([1]富山県大工・生工研セ、[2]JST, ERATO)
○Kana Hounoki[1], Kazuyuki Yasukawa[1,2], Yasuhisa Asano[1,2] ([1]Toyama Pref. Univ., [2]ERATO, JST)

【目的】ニトリルヒドラターゼ (NHase)は、ニトリル化合物を水和しアミド化合物へ変換する酵素である。アクリルアミドはアクリロニトリルを基質として生産され、紙力増強剤、高分子凝集剤、石油回収剤などとして利用される重要な化成品である。NHase を用いたアクリルアミド生産は、酵素法を用いた工業生産の初めての成功例であるが問題点として、高温、高濃度になるとアクリロニトリルやアクリルアミドにより阻害され反応が進まなくなる点が挙げられる。そのため、0～5ºC の低温で酵素反応を行う必要があり、冷却時にエネルーギが必要となる。そこで、本研究では、上記の問題点を解決するため、常温や高温で反応が効率よく進む耐熱性 NHase を持つ微生物の探索を目的とし研究を行った。



【実験方法】以前の実験より、ブチロニトリルを単一窒素源、グリセロールを単一炭素源として添加した培地を用い 65ºC で集積培養を行った結果、耐熱性 NHase 生産菌を富山県立大学の土壌より単離した。本研究では、精製した NHase を用いた性質検討および *Rhodococus rhodcrous* J-1 の精製酵素と比較を行った。

【結果】本菌より精製した酵素（468 U/mg）の諸性質の検討を行った。反応時間 5 分における至適温度は 60ºC、70ºC で 15 分インキュベートを行ったところ約 70%の残存活性を示し、熱に安定な酵素であった。また、耐熱性、アミド阻害およびアミド安定性の検討により、*R. rhodcrous* J- 1 に比べ熱に安定で、アクリルアミドによる生成物阻害の影響が少ないことが示された。

nitrile hydratase, thermostable, biotransformation

講演番号：2A34a05
講演日時、会場：3 月 27 日 09:44～ A 校舎 34 会場

Bacillus subtilis 由来のニトロ還元酵素とアゾ還元酵素の同定
Identification of nitroreductase and azoreductase derived from Bacillus subtilis
○坂原 稜平、内野 佑紀、清水 大二郎、善野 修平（前橋工科大工）
○Ryohei SAKAHARA, Yuki UCHINO, Daijiro SHIMIZU, Syuhei ZENNO (Maebashi Institute of Technology)

ニトロ還元酵素やアゾ還元酵素は、生体内で悪玉菌の指標酵素として取り扱われ、変異原生成に関わっている。ニトロ還元酵素活性を持つタンパク質はニトロ還元酵素ファミリー(Pfam00881)に、アゾ還元酵素活性を持つタンパク質は FMN 還元酵素ファミリー(Pfam03358)に属するものが多く同定されている。枯草菌 Bacillus subtilis 168 のゲノム上には、ニトロ/FMN 還元酵素ファミリーのメンバーである遺伝子が、15 種類存在する。これら 15 種の遺伝子産物は、もしかすると悪玉菌の指標活性を持ち備えているかもしれない。

本研究では、この 15 種の遺伝子産物がニトロ還元酵素活性やアゾ還元酵素活性を持ち得るのかを明らかにすることを第一の目的とした。15 種の還元酵素候補遺伝子に関して、大腸菌の発現系を構築し、その大腸菌抽出液に対して、NADH（もしくは NADPH）依存性のニトロ還元酵素活性、アゾ還元酵素活性を評価した。その結果、ニトロ還元酵素活性に関しては、NfrA1 と NfrA2 が NADPH 特異的な活性で、最も高い比活性を持っていた。Yfk0、YodC、YdgI は NAD(P)H 型の活性を有し、NfrA1 と NfrA2 の三分の一程度の比活性を持っていた。一方、アゾ還元酵素活性に関しては、AzoR1 と AzoR2 が NADH 特異的な活性を持ち、最も高い比活性を示した。Azr は NADPH 特異的な活性を示し、AzoR1 と AzoR2 の比活性の半分程度の比活性を持っていた。また、YdeQ、Ywr0 についても、僅かではあるが NADPH 特異的なアゾ還元酵素活性が確認できた。

次に、これらの還元酵素活性が確認できたタンパク質が、枯草菌の細胞内でどれほどの悪玉活性に関わっているのか。この問題を明らかにするために、枯草菌の遺伝子ノックアウトライブラリーを活用し、単一遺伝子の欠損が全体の還元酵素活性にどのくらい影響するかを評価した。先ずは、ニトロ還元酵素やアゾ還元酵素を誘導しない条件で試験した。その結果、ニトロ還元酵素活性では、NfrA2 欠損株と Yfk0 欠損株で、それぞれ二割程度の減少が確認できた。また、アゾ還元酵素活性でも、AzoR2 欠損株と Azr 欠損株で二割程度の減少がそれぞれに確認できた。その他の 8 種の欠損株については、悪玉活性への減少効果は見い出せなかった。高い悪玉活性を持つ NfrA1 と AzoR1 については欠損株が存在しないため残念ながら評価できていない。現在、悪玉還元酵素を誘導する条件での同様な解析を進めている。

今回の解析で、YdgI と YodC が新たにニトロ還元酵素であると同定できた。また、AzoR1 も新たにアゾ還元酵素であることを見い出せた。

Bacillus subtilis, nitroreductase, azoreductase

講演番号：2A34a06
講演日時、会場：3 月 27 日 10:05～ A 校舎 34 会場

失われた中央代謝系ハブ酵素の発掘―「新規」PEP carboxykinase の同定とその生物間分布

Identification and characterization of a lost central metabolic enzyme, phosphoenolpyruvate carboxykinase

○千葉 洋子[1,2]、神川 龍馬[3,4]、野崎 智義[2,1]([1]筑波大院・生命環境、[2]感染研・寄生動物、[3]京大院・地球環境、[4]京大院・人間環境)
○Yoko CHIBA[1,2], Ryoma KAMIKAWA[3,4], Tomoyoshi NOZAKI[2,1] ([1]Univ. Tsukuba Life and Env. Sci., [2]NIID Para., [3]Kyoto Univ. Global Env. Std., [4]Kyoto Univ. Human and Env. Std.)

【背景・目的】

Phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK)は PEP + CO_2、oxaloacetate 間の変換反応を可逆的に触媒し、解糖系・糖新生系と TCA 回路などの有機酸代謝系をつなぐ中央代謝系のハブ酵素である。PEPCK は oxaloacetate に付与するリン酸基の供給源によって、3 種類に分類される。ひとつは無機ピロリン酸(PPi)を用いる PPi-PEPCK (EC 4.1.1.38)、残りのふたつはそれぞれ ATP, GDP を用いる ATP-PEPCK (EC 4.1.1.49)および GDP-PEPCK (EC 4.1.1.32)である。後者については詳細な解析が進められており、ATP-PEPCK は主に細菌、高等植物に、GTP-PEPCK は多くの真核生物、古細菌および一部の細菌に存在することが知られている。一方、PPi-PEPCK については 1960-70 年代にグラム陽性細菌 *Propionibacterium freudenreichii* および赤痢アメーバ症を引き起こす原虫 *Entamoeba histolytica* から精製されているものの、その後遺伝子は同定されておらず生物間の分布も不明であった。そこで本研究は、PPi-PEPCK の遺伝子同定および生物間の分布を明らかにすることを目的とした

【結果・考察】

PPi-PEPCK 活性を指標に *E. histolytica* の細胞破砕からタンパク質を精製したところ、SDS-PAGE において約 130kDa を示すタンパク質が得られた。そこで本タンパク質を MS/MS 解析により同定したところ、3 種類の hypothetical protein の混合物であることが示された。これらタンパク質は、互いに 91%以上の identity を有した。また、これらタンパク質と 40%以上の identity を有するタンパク質遺伝子が *P. freudenreichii* のゲノム内に存在した。そこでこれらタンパク質を大腸菌にて発現させ精製したところ、確かに PPi-PEPCK 活性を示した。

今回同定された PPi-PEPCK は ATP-, GTP-PEPCK や他の既知タンパク質と相同性がなく、また機能ドメイン等も有さないことから、全く新規な酵素タンパク質である。また、*E. histolytica* および *P. freudenreichii* の PPi-PEPCK と 40%以上の identity を示すタンパク質遺伝子は様々な細菌および限られた、しかし系統的に多様な単細胞真核生物に存在することも明らかになった。PPi-PEPCK 遺伝子を有する生物の多くは ATP-もしくは GTP-PEPCK 遺伝子も有する。これら酵素は基本的に可逆であるが、PPi タイプは oxaloacetate 生成方向、ATP, GTP タイプは PEP 生成方向の反応を好むことから、生物は 2 種類の酵素を使い分けて中央代謝系の流れを制御していると考えられる。

central metabolism, novel enzyme, phosphoenolpyruvate carboxykinase

講演番号：2A34a07
講演日時、会場：3 月 27 日 10:16～ A 校舎 34 会場

新規ステロイド 11β水酸化酵素のクローニングおよび機能解析
Cloning and characterization of novel steroid 11-beta hydroxylase
○依田 尚文[2]、木村 隆利[1]、山本 恭士[2]、藤田 靖也[2]、阪本 剛[2]、日比 慎[1]、小川 順[1] ([1]京大院農・応用生命、[2]（株）三菱化学科学技術研究センター)
○Naofumi YODA[2], Takatoshi KIMURA[1], Yasuhito YAMAMOTO[2], Yasuya FUJITA[2], Takeshi SAKAMOTO[2], Makoto HIBI[1], Jun OGAWA[1] ([1]Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]MCRC)

医薬品として有用なハイドロコルチゾンやプレドニゾロン、またはそれらの誘導体の製造方法としては、17α,21-ジヒドロキシプレグネ-4-エン-3,20-ジオン（コンパウンドＳもしくは 11-デオキシコルチゾル）やその誘導体にカビなどの微生物を作用させ、11β位を水酸化する方法が用いられているが、その酵素活性が十分ではないこと、また副生成物の影響による精製工程での負荷といった課題があった。これまでも、ステロイド 11β水酸化反応に関与している酵素の精製及び遺伝子の取得の試みが検討されたものの、特に精製過程における酵素活性の維持が困難であること、またカビ類は多くの P450 タンパク質を持っていることから、これまでカビを含めた微生物からの 11β水酸化酵素遺伝子取得の報告はされていない。そこで、我々は、効率良くハイドロコルチゾンなどの 11βヒドロキシステロイドを合成する手法を開発することを目的として、11β水酸化酵素遺伝子を取得するとともに、組換え酵母による 11β水酸化反応について検討を行った。

ステロイド 11β水酸化活性を有する微生物として知られている *Curvularia lunata* MCI1688 から遺伝子配列を取得するため、独自にゲノム配列を解読した。その結果、*C. lunata* は他のカビ類同様少なくとも 50 を超える P450 タンパク質をコードしていると推定された。見出された P450 をコードしていると推定される配列より、11β水酸化活性が誘導される培養条件において転写量が増加している配列を RT-PCR 法によりスクリーニングし、２つの候補遺伝子（P450A1、P450A3）を選抜した。これら 2 つの遺伝子をクローニング後、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* で発現させ、コンパウンドＳを基質とした菌体反応を行った結果、P450A1 を発現する組換え酵母において、目的生成物であるハイドロコルチゾンの生成を確認し、新規な 11β水酸化酵素の取得に成功した。P450A1 は、酵母を用いる発現系において、哺乳類由来 CYP11B1 よりも著しく高い 11β水酸化活性を示した。これらの結果は、*C. lunata* 由来 11β水酸化酵素遺伝子を酵母等に導入して得られる形質転換体をコンパウンドＳ等の 11-デオキシステロイド化合物と反応させることにより、ハイドロコルチゾン等の有用化合物を効率良く製造できることを示している。本 11β水酸化酵素の今後の産業利用が期待される。

steroid, P450 monooxygenase, bioconversion

講演番号：2A34a08
講演日時、会場：3 月 27 日 10:27～ A 校舎 34 会場

ピペロナール代謝酵素の諸性質と生理学的意義
Physiological role of the enzyme involved in aldehyde metabolism
○土居 志織、富田 千晶、橋本 義輝、小林 達彦（筑波大院・生命環境）
○Shiori DOI, Chiaki TOMITA, Yoshiteru HASHIMOTO, Michihiko KOBAYASHI (Grad. Sch. Life Env. Sci., Univ. of Tsukuba)

ピペロナール（3-ベンゾジオキソール-5-カルボアルデヒド）は独特の甘い芳香を有する芳香族アルデヒドであり、香水や一般化粧品、食品香料の調合基剤、医薬品や麻薬の合成原料として使用され、今後も多分野での応用が期待される化合物である。ピペロナールはイソサフロールの酸化などによって化学的に合成されるが、コショウやバニラなどの植物から抽出される精油にも含まれ、自然界にも存在する天然化合物である。しかし、微生物によるピペロナール分解・代謝についてはこれまで全く報告がなく、生物における分解経路および代謝に関わる酵素は未解明である。

我々は既に土壌からピペロナール代謝活性を持つ微生物の単離に成功している。ピペロナール代謝活性が最大となるような最適条件を決定し、大量培養した。得られた菌体を破砕し、硫安分画および４種のクロマトグラフィーにより本酵素の精製標品を得た。しかし、酵素量は少なく諸性質の解析には十分でないため、精製した本酵素の部分アミノ酸配列を決定し、その情報を基にピペロナール代謝酵素遺伝子のクローニングに成功した。さらに、His タグを付与した本酵素の大量発現系を構築し、アフィニティークロマトグラフィーによる簡便な精製法を確立した。得られた精製標品を用いて本酵素のキネティクス、基質特異性などの諸性質を解析した。また、ピペロナールなどの化合物を炭素源とし、濃度を変化させた様々な培地で本菌株の培養を行った。各培地条件下での生育およびピペロナール代謝酵素活性を測定し、本菌における本酵素の生理学的意義を解明した。

metabolism, aldehyde, enzyme

講演番号：2A34a09
講演日時、会場：3 月 27 日 10:38～ A 校舎 34 会場

リグナン代謝微生物の探索
Screening of lignan metabolizing microorganisms
○藤木 恵津子、熊野 匠人、橋本 義輝、小林 達彦（筑波大院・生命環境）
○Etsuko FUJIKI, Takuto KUMANO, Yoshiteru HASHIMOTO, Michihiko KOBAYASHI (Grad. School of Life and Environm. Sci., Univ. of Tsukuba)

【目的】リグナンはゴマなどの植物に多く含まれる化合物であり、抗酸化活性やエストロゲン様活性を示すことが知られている。また、肝臓で代謝されることによって、より活性の強い化合物へと変換されることも報告されている。しかし、リグナンの代謝産物のなかでも活性が強いとされるものは天然には微量しか存在せず、また、複数の不斉炭素を持つため有機合成は困難である。また、リグナンは天然に広く分布するにもかかわらず微生物による代謝経路は未解明である。
　そこで、本研究では、リグナンを代謝する微生物を土壌からスクリーニングし、有用な生理活性を有する代謝産物の取得と新規な代謝経路の解明を目的とした。

【方法・結果】リグナンを単一炭素源とする培地に、土壌を接種し 28 ℃および 37 ℃で数日間振盪培養した。その後、新しい培地に植継ぐことを繰り返して集積培養を行い、適当に希釈してから同組成の寒天培地に植菌した。生育してきたコロニーをさらに植継ぎ、33 株を単離した。
　次に、それぞれの菌を単独培養し、休止菌体反応を行った。単一炭素源培地より単離した 33 株のうち、7 株で HPLC により基質の減少が確認できた。
　本研究により、リグニン資化能を有する菌を取得することができた。

Lignan, Metabolism, Screening

講演番号：2A34a10
講演日時、会場：3 月 27 日 10:49～ A 校舎 34 会場

膜結合型デキストラン合成酵素の発見とその機能解析

Discovery of membrane-bound dextransucrase in acetic acid bacteria

○足立 収生[1]、アワーズ ロケ A.[2]、赤壁 善彦[1]、阿野 嘉孝[3]、品川 恵美子[4]、片岡 尚也[1]、薬師 寿治[1]、松下 一信[1] ([1]山口大・農、[2]ラプラタ大学・発酵工学研、[3]愛媛大学・農、[4]宇部高専・物質工学)

○ Osao ADACHI[1], Roque A. HOURS[2], Yoshihiko AKAKABE[1], Yoshitaka ANO[3], Emiko SHINAGAWA[4], Naoya KATAOKA[1], Toshiharu YAKUSHI[1], Kazunobu MATSUSHITA[1] ([1]Yamaguchi Univ., [2]CINDEFI・UNLP, [3]Ehime Univ., [4]Ube Natl. Coll. Technol.)

【目的】*Acetobacter* 属酢酸菌がセルロースはじめ種々な菌体外多糖を生成することの生理学的重要性はよく知られている。一方、乳酸菌が作る菌体外多糖のデキストランは *Leuconostoc* 属や *Streptococcus* 属菌が菌体外に分泌するデキストラン合成酵素 (デキストランスクラーゼ、DSase、EC 2.4.1.5) によって生成され、種々なデキストラン工業を支えている。これまで酢酸菌には乳酸菌の酵素と同じ反応を触媒する DSase の存在は知られていなかった。演者らは最近の研究から *Gluconobacter thailandicus* に属する一群の酢酸菌が DSase の作用でデキストランを生成することを発見した。既知の乳酸菌の DSase は例外なく水溶性であるのに対し、酢酸菌の DSase は典型的な膜結合型酵素であった。本報では酢酸菌の DSase の生成とその諸性質、及び機能解析について調べた結果を報告する。

【方法】主として *G. thailandicus* NBRC 3258 を使用して、蔗糖培地で通気撹拌培養した。DSase 活性測定には、デキストラン合成によって放出される果糖を、酢酸菌の果糖脱水素酵素と共役させて測定する簡便な方法を確立して使用した。

【結果と考察】酢酸菌を蔗糖培地に培養すると、生成するデキストランによって培地に粘性が観察された。しかし標準株 *G. oxydans* ではデキストラン生成は見られなかった。デキストラン生成は酢酸菌の培養細胞、洗浄菌体や細胞膜で見られたが、培地中に DSase はほとんど分泌されなかった。これらの事実は、酢酸菌による従来法と違ったデキストラン製造法や新たな用途の可能性を示唆している。酢酸菌の DSase が唯一蔗糖からデキストランを合成できる点で、デキストリンデキストラナーゼ (EC 2.4.1.2) やアミロスクラーゼ (EC 2.4.1.4) とは異なっていた。酢酸菌が生成したデキストランを単離して乳酸菌由来のデキストランと比較した。酢酸菌のデキストランのサイズは 2 MDa 以上で、α-アミラーゼによって消化されず、グルコースが唯一の構成糖であったので、その主鎖はα-1,6-結合から構成されているものと推定した。これらの結果から酢酸菌が生成するデキストランは、乳酸菌由来のデキストランに類似であると結論した。酢酸菌細胞膜から DSase を界面活性剤で可溶化・精製した。可溶化後の DSase は界面活性剤の共存下で安定であった。酢酸菌の DSase の至適 pH は 4.0～6.0 にあり、蔗糖に対する *K*m 値は 15 mM であった。

acetic acid bacteria, dextransucrase, membrane-bound dextransucrase

講演番号：2A34a11
講演日時、会場：3 月 27 日 11:10～ A 校舎 34 会場

環状イミド化合物の立体選択的な加水分解反応を触媒する微生物酵素の探索

Screening of microbial enzymes for the stereoselective hydrolysis of cyclic imides

○志澤 宏明[1]、野尻 増俊[3]、日比 慎[2]、堀之内 伸行[1]、八十原 良彦[3]、高橋 里美[2]、小川 順[1]([1]京大院農・応用生命、[2]京大院農・産業微生物、[3]株式会社カネカ　バイオテクノロジー開発研究所)
○Hiroaki SHIZAWA[1], Masutoshi NOJIRI[3], Makoto HIBI[2], Nobuyuki HORINOUCHI[1], Yoshihiko YASOHARA[3], Satomi TAKAHASHI[2], Jun OGAWA[1] ([1]Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]Ind. Microbiol., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [3]Biotechnology Development Laboratories, KANEKA CO., LTD.)

【目的】

光学活性を持つジカルボン酸モノアミド（ハーフアミド）は、キラル医薬品などの合成原料として有用である。例えば 3-置換グルタル酸モノアミドである(*R*)-3-(4-chrolophenyl)glutaric acid monoamide（CGM）と(*R*)-3-isobutylglutaric acid monoamide（IBM）はそれぞれ arbaclofen、pregabalin の合成原料となる。しかし、ハーフアミドはその立体選択的な化学合成が困難な化合物である。一方で、酵素による環状イミド化合物の立体選択的な加水分解反応を用いれば、光学活性ハーフアミドの生産が可能となる。さらに、対称構造を有するプロキラルな環状イミドを基質にした際には、定量的に一方の光学活性ハーフアミドが得られると想定される。本研究では、立体選択的な環状イミド加水分解酵素（イミダーゼ）を保持する微生物の探索、そしてイミダーゼを触媒とした光学活性 3-置換グルタル酸モノアミドの生産を試みた。

【方法と結果】

単純な環状イミド構造をもつglutarimide、およびsuccinimideを単一炭素源とする培地を用いて、これらの化合物を資化する微生物の集積培養を行った。資化性が認められた菌株に対し、3-(4-chrolophenyl)glutarimide（CGI）及び 3-isobutylglutarimide（IBI）を基質とした菌体反応を行ったところ、加水分解反応が進行した菌株を得ることができた。そこで加水分解が進行した菌株のうち、反応の立体選択性が高かった複数の菌株に対して 16S rRNA 遺伝子による簡易同定を行ったところ、その多くが *Achromobacter* 属, *Alcaligenes* 属, *Comamonas* 属などのβプロテオバクテリアであった。さらに研究室に保存されている上記属の菌株を対象としたスクリーニングを行ったところ、CGI と IBI の両化合物からそれぞれ高光学純度の(*R*)-CGM と(*R*)-IBM を生成する菌株を見出した。現在、この菌株よりイミダーゼの酵素精製を進めている。

imidase, cyclic imide, stereoselective hydrolysis

講演番号：2A34a12
講演日時、会場：3 月 27 日 11:21～ A 校舎 34 会場

Lactobacillus plantarum AKU 1009a の不飽和脂肪酸飽和化経路に関わる水酸化脂肪酸脱水素酵素の機能解析

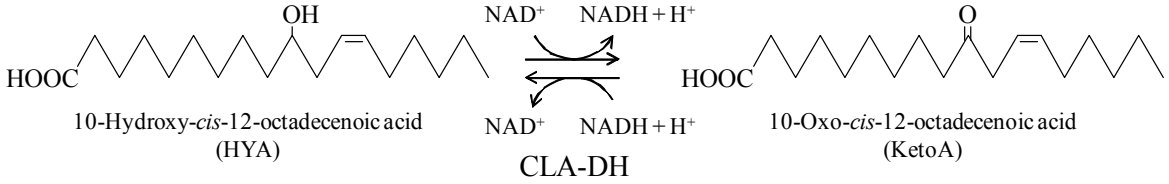
Functional analysis of hydroxy fatty acid dehydrogenase involved in polyunsaturated fatty acid saturation metabolism in *Lactobacillus plantarum* AKU 1009a

○竹内 道樹[1]、朴 時範[2]、北村 苗穂子[1]、内堀 良重[1,3]、岸野 重信[1]、小川 順[1,4]（[1]京大院農・応用生命、[2]京大院農・産業微生物、[3]日東薬品工業、[4]京大・生理化学ユニット）

○Michiki TAKEUCHI[1], Si-Bum PARK[2], Nahoko KITAMURA[1], Yoshie UCHIBORI[1,3], Shigenobu KISHINO[1], Jun OGAWA[1,4] ([1]Div. Appl. Life Sci., Kyoto Univ., [2]Lab. Ind. Microbiol., Kyoto Univ., [3]Nitto Pharm., [4]Res. Unit Physiol. Chem., Kyoto Univ.)

【目的】

近年、共役脂肪酸、水酸化脂肪酸、オキソ脂肪酸など特異な構造を有する脂肪酸の生理機能に注目が集まっており、微生物による機能性脂肪酸の生産に関する研究も盛んに行われている。機能性脂肪酸の一つであり、トマトに含まれる 13-オキソ-9,11-オクタデカジエン酸が脂質代謝改善機能を有することから、類似の構造を有するオキソ脂肪酸にも注目が集まっている。当研究室では、乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* AKU 1009a におけるリノール酸飽和化代謝を明らかにしており、本代謝中間体としてオキソ脂肪酸を同定している。そこで本研究では、オキソ脂肪酸の誘導に機能する酵素、水酸化脂肪酸脱水素酵素 (CLA-DH) の諸性質解明を試みた。本酵素は、10-hydroxy-*cis*-12-octadecenoic acid (HYA) から 10-oxo-*cis*-12-octadecenoic acid (KetoA) への可逆的変換反応を触媒する酸化還元酵素である。



【方法・結果】

L. plantarum AKU 1009a 由来の CLA-DH を IPTG 添加により誘導発現する形質転換大腸菌を作成し、得られた形質転換体の無細胞抽出液から各種クロマトグラフィーを用いて、CLA-DH を精製した。本酵素の Native 分子量はおよそ 32,000 であり、本酵素はモノマーであると推測された。HYA の酸化反応および KetoA の還元反応について、ガスクロマトグラフィーにより生成物を定量分析し、機能解析を行った。本酵素の酸化・還元反応における補酵素はそれぞれ NAD^+・NADH であった。さらに、酵素活性に対する補酵素濃度、反応温度、反応 pH の影響や、酵素の温度安定性、pH 安定性等を検討した。また、還元反応により生成する HYA の水酸基の立体構造についても検討した。

1) Kishino *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 637-640 (2013)

lactic acid bacteria, hydroxy fatty acid, oxo fatty acid

講演番号：2A34a13
講演日時、会場：3 月 27 日 11:32～ A 校舎 34 会場

Lactobacillus acidophilus 由来の新規不飽和脂肪酸水和酵素の同定と諸性質解明

Cloning and functional analysis of a novel unsaturated fatty acid hydratase from *Lactobacillus acidophilus*

○平田 晶子[1]、竹内 道樹[1]、内堀 良重[1,2]、岸野 重信[1]、小川 順[1] ([1]京大院農、[2]日東薬品工業)
○Akiko Hirata[1], Michiki Takeuchi[1], Yoshie Uchibori[1,2], Shigenobu Kishino[1], Jun Ogawa[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Nitto Pharm.)

【目的】

水酸化脂肪酸は、工業用、医薬品用、化粧品用の素材として幅広い分野で利用されている。また近年の研究で、いくつかの水酸化脂肪酸が抗炎症作用や脂質代謝改善機能を有することが示唆され、その生理機能についても注目が集まっている。

これまでに本研究室では、*Lactobacillus plantarum* AKU 1009a に、リノール酸のΔ9 位の二重結合を水和し C10 位に水酸基を導入する水和酵素(CLA-HY)を見いだす[1)]とともに、*Pediococcus* sp. AKU 1080 に 10,13-dihydroxy-octadecanoic acid を生成する活性を見いだしている[2)]。本研究では、新たにリノール酸のΔ12 位の二重結合を水和し C13 位に水酸基を導入する *L. acidophilus* を選抜し、本活性を担う酵素遺伝子の特定と酵素の諸性質解明を試みた。

【方法・結果】

リノール酸を 13-hydroxy-*cis*-9-octadecenoic acid へ変換する *L. acidophilus* NTV001 を選抜した。次に *cla-hy* とのホモロジー検索により、本反応を触媒する酵素遺伝子(*fa-hy*)を本菌のゲノムよりクローニングし、形質転換大腸菌を作製した。得られた形質転換体の洗浄菌体を触媒として炭素数 18 の様々な脂肪酸に対する水和反応を検討した結果、リノール酸、α-リノレン酸、γ-リノレン酸から、各々対応する 13-hydroxy 脂肪酸が生成することを確認した。また、10-hydroxy-*cis*-12-octadecenoic acid から 10,13-dihydroxy-octadecanoic acid が生成した。これにより、FA-HY を発現させた形質転換大腸菌を触媒として様々な 13-hydroxy 脂肪酸の生成が可能となった。

また FA-HY を精製し、酵素学的諸性質を検討した結果、反応の至適 pH は 6.0、至適温度は 40℃であり、pH 3.5～8.0、温度 40℃までの条件下で安定であった。さらに本酵素の UV 吸収スペクトルから本酵素はフラビン酵素であることが示唆され、FAD の添加により水和活性が上昇することを明らかにした。

1) S. Kishino *et al*., *Biochem. Biophys. Res Commun*, **416 (1-2)**, 188-193 (2011).
2) M. Takeuchi *et al*., *Eur. J. Lipid Sci. Technol,* **115 (1)**, 386-393 (2013).

Hydroxy fatty acid, hydratase, lactic acid bacteria

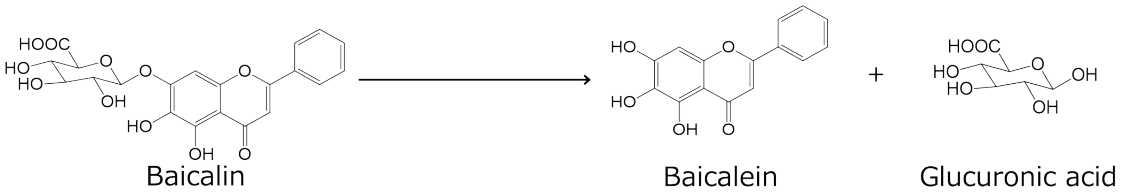
講演番号：2A34a14
講演日時、会場：3 月 27 日 11:43～ A 校舎 34 会場

漢方薬配糖体成分をアグリコンへ変換する乳酸菌の探索

Screening of lactic acid bacteria transforming glycoside in herbal medicine

内堀 良重[1,2]、○小佐田 健吾[1]、岸野 重信[1]、小川 順[1]([1]京大院・農・応用生命、[2]日東薬品工業)
YOSHIE UCHIBORI[1,2], ○KENGO OSADA[1], SHIGENOBU KISHINO[1], JUN OGAWA[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Nitto Pharm.)

【目的】漢方薬の有効成分には配糖体化合物があり、腸内細菌やヒトの代謝を受けアグリコンとなることで薬効や吸収性が向上することが知られている。また、漢方薬の薬効に個人差が生じる要因の一つとして腸内細菌叢の関与が指摘されている。近年、高血圧や肥満に伴う諸疾患などの改善に寄与する防風通聖散（BOF）が注目を集めている。本研究では、BOF の薬効・吸収性を向上させるプロバイオティクスの開発を目指し、BOF の成分である Baicalin をアグリコンである Baicalein へと変換するβ-glucuronidase 様活性を示す乳酸菌の探索とその機能解析を行った。



【方法と結果】乳酸菌約 200 株を MRS 培地にて培養し、遠心により菌体を集菌後、洗浄した。得られた洗浄菌体を、BOF を含む反応液に懸濁し、嫌気的条件下、37℃にて 5 時間振とう反応した。反応後、反応液を HPLC 分析に供することで Baicalin の代謝能を評価した。その結果 *Lactobacillus brevis* subsp. *coagulans*（ラブレ菌）が、Baicalin を効率よく Baicalein へと変換することを見いだした。そこで、本菌から Baicalein 生成反応を触媒する酵素を単離精製し、N 末端アミノ酸配列情報をもとに本酵素遺伝子を同定するとともに、本酵素を発現する形質転換大腸菌を作製した。形質転換体より得た精製酵素を用いて Baicalin を基質とする反応を行い、本酵素が Baicalein 生成反応を触媒することを明らかにした。本酵素は GH family 30 に帰属されたが、本 family における β-glucuronidase の報告はなく、既知の β-glucuronidase とは異なる新規性の高い酵素であった。

Lactobacillus brevis subsp. coagulans, Baicalin, ß-glucuronidase

講演番号：2A34p01
講演日時、会場：3 月 27 日 14:00～ A 校舎 34 会場

Chryseobacterium sp. 5-3B 由来 *N*-アセチルトランスフェラーゼの発現と特性解析
Expression and characterization of *N*-acetyltransferase from *Chryseobacterium* sp. 5-3B
○尾関 貴博[1]、田中 耕生[2]、吉田 健一[2]、竹中 慎治[2] ([1]神戸大農、[2]神戸大院農)
○Takahiro OZEKI[1], Kosei TANAKA[2], Ken-Ichi YOSHIDA[2], Shinji TAKENAKA[2] ([1]Kobe Univ., [2]Kobe Uni.)

【目的】微生物の代謝酵素系の利用法として、人工合成化合物の分解や除去を図る「バイオレメディエーション」と生体触媒として活用する「バイオコンバージョン」が挙げられる。本研究では、微生物による芳香族アミンの代謝分解系を明らかにする過程で見出した反応機構を参考に、脂肪族アミンのアミノ基を立体選択的に *N*-アセチル化する酵素生産菌についてその酵素特性を明らかにすることを目的としている。*Chryseobacterium* sp. 5-3B 株の生産するアセチル CoA 依存性 *N*-アセチルトランスフェラーゼ（NatA）は、キラルアミンである 2-フェニルグリシン（2-PG）の L-体（*S*-体）に対してのみ活性を示す特異な酵素である。[1, 2)] 本研究では、本酵素遺伝子をクローニング、大腸菌にて発現し、得られた組み換え酵素（rNatA）の酵素化学的諸性質を調べたので報告する。
【方法】　酵素活性：アセチル CoA 共存下で反応を行い、2-PG の *N*-アセチル化物である 2-アセチルアミノ-2-フェニル酢酸の生成量（HPLC 法）または遊離 CoASH 量（DTNB 法）を定量し、算出した。また、生成物は Chiralcel OD-H キラルカラムにてその構造（*R*-体および *S*-体）を確認した。酵素遺伝子発現：*natA* 断片を pET28b ベクターに組み込み、大腸菌 BL21 株に導入して得られた形質転換株で組み換え酵素を発現させた。
【結果】　*natA* 遺伝子は 486 bp からなる ORF によりコードされていた。同酵素（一次配列）は、*N*-アセチルトランスフェラーゼと機能推定されているタンパク質とは高い類似性を示したが、特性解析が詳細に進んでいるアリルアミン *N*-アセチルトランスフェラーゼ（ANAT）とはほとんど類似性がなかった。大腸菌による同酵素の発現系を検討した結果、発現誘導時の培養温度は 15℃で、C 末端に His タグをつけた発現系が効率的に rNatA を調製できた。精製 rNatA を用いて基質特異性を中心にその特性を調べた。アミノ基受容体に対しては本酵素の基質特異性は厳密で、L-体の 2-PG 以外に 2-クロロフェニルグリシンと L-体の 4-ヒドロキシフェニルグリシンに対してのみ活性を示し、ANAT やアリルアルキルアミン *N*-アセチルトランスフェラーゼにとって最良の基質と報告されている 5-アミノサリチル酸や 5-ヒドロキシトリプタミンに対しては活性を示さなかった。また、アシル基供与体に対しては Acetyl、Propionyl、Butyryl-CoA まで活性を示した。現在、既報のアセチル基転移反応機構を参考に、Acetyl-CoA との結合や転移に関わるアミノ酸残基についてアミノ酸置換変異酵素を調製し、触媒能の変化を現在解析している。(1) S. Takenaka et al., *Biotechnol Lett.* **35(7):** 1053-9, 2013.　(2) S. Takenaka et al., *Appl Environ Microbiol.* **80(5):** 1770-6, 2014.

Chryseobacterium, N-acetyltransferase, 2-Phenylglycine

講演番号：2A34p02
講演日時、会場：3 月 27 日 14:11～ A 校舎 34 会場

Eggerthella sp. YY7918 由来のエクオール産生酵素ダイゼインレダクターゼの酵素学的性質
Enzymatic characterization of daidzein reductase from equol producing *Eggerthella* sp. YY7918
○五島 智子[1]、川田 結花[2]、横山 慎一郎[3]、鈴木 徹[2] ([1]岐阜大学応用生物科学部、[2]岐阜大学連合農学研究科、[3]岐阜県産業技術センター)
○Tomoko GOSHIMA[1], Yuika KAWADA[2], Shin-ichiro YOKOYAMA[3], Toru SUZUKI[2] ([1]Gifu Univ., [2]Gifu United Grad.School agricultural Sci., [3]Gifu Pref.)

【目的】 大豆イソフラボンの一種であるダイゼインは、特定の腸内細菌によって代謝され、エクオールへと変換される。エクオールの構造は女性ホルモンのエストラジオールに類似しており、更年期の女性ホルモンの減少に起因する各種症状に緩和効果を示すとして注目されている。
エクオールは腸内細菌の有する酵素であるダイゼインレダクターゼ、ジヒドロダイゼインレダクターゼ、テトラヒドロダイゼインレダクターゼの3種の還元酵素によって生合成されることが明らかとなってきた。ダイゼインからエクオールへの代謝系を理解する上で酵素学的性質を解明することは重要である。そこで本研究は、ダイゼイン還元反応初期に関わるダイゼインレダクターゼの酵素化学的性質の解明を目的として行った。
【方法･結果】当研究室にて単離されたエクオール生産菌 *Eggerthella* sp.YY7918 株の N 末端に His-Tag を付与したダイゼインレダクターゼ遺伝子をクローニングした大腸菌組換え体から、Ni-agarose カラムを用いたアフィニティー精製を行った。SDS-PAGE による確認の結果、本標品は、ダイゼインレダクターゼ遺伝子配列から推定されるものとほぼ同一の、約 69kDa のタンパク質のバンドを示した。本酵素は、NADPH 依存酵素であり、至適 pH は 6.2、pH6.8 で最も安定であった。また、本酵素は無酸素状態で反応を行うと好気条件より高い活性を示すことが明らかとなった。Km は 13.9μM、Vmax は 2.39μmol/min/mg protein であった。また、本酵素による産物をキラルカラムを用いた HPLC によって分析したところ、*R* 体と *S* 体のジヒドロダイゼインが共に産生されることが明らかとなった。

isoflavone, equol, gut microflora

講演番号：2A34p03
講演日時、会場：3 月 27 日 14:22～ A 校舎 34 会場

Eggerthella sp. YY7918 株のジヒドロダイゼインラセマーゼの解析
Analysis of dihydrodaidzein racemases of *Eggerthella* sp. YY7918

○川田 結花[1]、五島 智子[2]、横山 慎一郎[3]、丹羽 利夫[4]、鈴木 徹[1] ([1]岐阜大学連合農学研究科、[2]岐阜大学応用生物科学部、[3]岐阜県産業技術センター、[4]尚絅学院大)
○Yuika KAWADA[1], Tomoko GOSHIMA[2], Shin-ichiro YOKOYAMA[3], Toshio Niwa[4], Toru Suzuki[1] ([1]Gifu United Grad. School agricultural Sci., [2]Gifu Univ., [3]Gifu Pref., [4]Shokei Gakuin Univ.)

【背景】大豆イソフラボンの一種であるダイゼインは、ある種の腸内細菌によってエクオールと呼ばれる化合物に代謝され、体内へと吸収される。エクオールは、更年期症状や骨粗しょう症などの加齢に伴うホルモン性の疾病の予防や改善効果が期待されている。我々はこれまでに、ヒト糞便からエクオール産生菌 *Eggerthella* sp. YY7918株を単離し、遺伝子組換え実験により、ダイゼインからエクオールに変換する3つの還元酵素を明らかにし、2013年度、本大会にて報告した。また、代謝中間体はキラル中心を有しているにも関わらず、本菌はS体のエクオールのみが産生される[2)]。酵素還元反応の過程において、何らかの立体選択が行われているものだと考え、ジヒドロダイゼインの立体選択に関与する酵素の解析を試みた。
【方法および結果】ジヒドロダイゼインのラセミ化に関与すると推測されるEGA 15690遺伝子を、発現ベクターpCold2へ導入し、大腸菌組換え体を作製した。15ºCで24時間培養することで、コールドショックプロモーター制御下により本遺伝子を発現させ、Ni-agaroseを用いたアフィニティー精製を行った。精製した組換えタンパク質をSDS-PAGEに供したところ、当該遺伝子産物と目される約17.1 kDaのバンドを確認した。本タンパク質のジヒドロダイゼインに対するラセマーゼ活性について検討した。基質であるジヒドロダイゼインは、ダイゼインを出発材料としてギ酸アンモニウムを用いた化学的還元反応を行い、H^1–NMRによる構造確認後、キラルカラム (SUMICHIRAL OA-7000) を用いたHPLCにより、*R*体と*S*体に分取した。これらを基質とし、精製酵素と37°Cで反応後、反応液を酢酸エチルで抽出し、HPLC (同上) にて*R*、*S*体を定量した。その結果、*R*体、*S*体ともにラセミ体への変換が確認された。以上の結果より、*Eggerthella* sp. YY7918株は、ジヒドロダイゼインの*R*、*S*選択を行うことによって、最終産物である*S*-エクオールの産生を行っている可能性が示唆された。

[1)]川田ら 2014年日本農芸化学会大会講演要旨集 2A10p08
[2)]Yokoyama, S., Suzuki, T., 2008. Biosci. Biotechnol. Biochem., 72: 2660– 2666.

isomerase, intestinal bacteria, soybean

講演番号：2A34p04
講演日時、会場：3 月 27 日 14:33～ A 校舎 34 会場

大腸菌変異株を用いたセレン微粒子生成関連遺伝子の探索
The search for genes involved in the formation of selenium particles in *Escherichia coli*
○田島 寛隆[1,2]、大場 杏奈[1,2]、大内田 竜大[1]、斎藤 茂樹[1,2]、谷 泰史[1,2]、プラカッシュ N. テジョ[3]、三原 久明[1] ([1]立命館大生命科学、[2]立命館大 R-GIRO、[3]タパー大学)
○Hirotaka TAJIMA[1,2], Anna OOBA[1,2], Ryuta OUCHIDA[1], Shigeki SAITO[1,2], Yasushi TANI[1,2], N. Tejo Prakash[3], Hisaaki MIHARA[1] ([1]Ritsumeikan Univ., [2]Ritsumeikan Univ., R-GIRO, [3]Thapar Univ.)

【目的】
セレンはカルコゲン元素であり、同族の硫黄と似た性質をもつ。工業的に重要な元素だが、環境中では主に毒性の高いオキシアニオンとして存在し、汚染原因物質ともなっている。また、セレンは動物の必須微量元素であるが、必要量と中毒量との差が小さい。近年、セレンオキシアニオンを還元し毒性の低い元素状セレンの微粒子を形成する微生物が相次いで報告されており、この作用を活用した浄化法が注目されている。また、微生物によって形成されるセレン粒子は粒径が比較的そろっており、この機構を応用した有用な金属微粒子合成法が考えられている。近年、*Thauera selenatis* の SefA がセレン微粒子の粒径決定に関与することが報告された。しかし、SefA は *T. selenatis* に固有であり、有意な相同性を示すタンパク質は他の生物種に存在しない。一方、我々がインド高濃度セレン蓄積地帯の土壌より単離した､亜セレン酸還元細菌 *Enterobacter* sp. E3b によって形成されたセレン粒子には、GroEL、FlgK、OmpC、OmpA などが強く結合しており、これらのタンパク質がセレン粒子の形成に関与する可能性が考えられた。また、大腸菌も亜セレン酸を還元し、セレン粒子を形成する。そこで、大腸菌の遺伝子欠失株を用いて、セレン微粒子の粒径決定に関わるタンパク質の同定を試みた。

【方法・結果】
E3b のセレン粒子より同定されたタンパク質に対応する遺伝子を欠失した大腸菌変異株に亜セレン酸を与えてセレン粒子を形成させ、粒径を計測した。その結果、Δ*ompC* 株やΔ*ompA* 株では平均粒径が有意に増加することを見出した。大腸菌では *ompC* や *ompA* の欠失により菌体からの物質の放出に関わる外膜小胞 (outer membrane vesicle、OMV) が増加することが報告されている。そこで、大腸菌の OMV 形成変異株の亜セレン酸還元能を調べた。OMV 形成量が増加する欠失株としては、Δ*ompC* 株、Δ*clpX* 株、Δ*nlpI* 株の亜セレン酸還元量が 1.8 倍から 2.6 倍に増加したが、Δ*degP* 株やΔ*rseA* 株はそれぞれ 0.7 倍、0.6 倍に低下し、Δ*ompA* 株やΔ*clpP* 株では有意な差は見られなかった。OMV 形成量が減少する欠失株としては、Δ*pepP* 株の亜セレン酸還元量が 0.4 倍に低下したが、Δ*nlpA* 株では有意な差は見られなかった。また、Δ*nlpI* 株ではセレン粒子の平均粒径の値が上昇し、Δ*pepP* 株では低下した。以上より、OMV 形成量と亜セレン酸還元量の相関は見られなかったが、*ompC*、*nlpI*、*pepP* などが亜セレン酸の還元およびセレン粒子形成に関与していることが示唆された。

nano particle, selenium, outer membrane vesicle

講演番号：2A34p05
講演日時、会場：3 月 27 日 14:44～ A 校舎 34 会場

有機溶剤耐性をもつ改変型カルボニル還元酵素の取得

Engineering of carbonyl reductase for enhanced organic solvent-stability

○松井 美里、伊藤 紀幸、川野 茂、八十原 良彦（カネカ・バイオテクノロジー開発研）
○Misato MATSUI, Noriyuki ITO, Shigeru KAWANO, Yoshihiko YASOHARA (Kaneka)

【背景と目的】光学活性アルコールは医薬品や農薬の有効成分およびその原料として有用な化合物群である。常温、常圧の穏やかな条件下でカルボニル化合物を光学活性アルコールへ不斉還元する酵素反応は工業的に有用である。水溶性の低い原料を反応させる場合、原料の溶解を促す有機溶剤を反応液に添加することが望ましいが、多くの場合、溶剤によって酵素活性が失われてしまう。そこで、工業的に有用なカルボニル還元酵素を改変して、基質の溶解度向上に効果が高いジメチルホルムアミド（DMF）の存在下での安定性が向上する変異型酵素の取得を試みた。

【方法・結果】酵母菌 *Vanderwaltozyma polyspora* 由来のカルボニル還元酵素をコードする遺伝子を鋳型に Error Prone PCR 法によって変異酵素ライブラリーを作製した。本ライブラリーに対して DMF 存在下で安定性の高い変異酵素のスクリーニングを行なった。酵素液を DMF の存在下、30℃でインキュベートした後の残存活性が高いものを選択し、当該酵素の変異箇所を解析した。その結果、DMF40%(v/v) 存在下で 3 時間インキュベートした場合の残存活性は、野生型酵素では 8%であったが、K259E、K270M、T257S の変異がそれぞれ導入された酵素の残存活性は、29%、36%、20%と安定性が有意に向上していた。また、T257S-K259E-K270M 三重変異酵素では、さらに DMF 存在下における安定性の向上が認められた。この三重変異酵素を用い、補酵素 NADPH とグルコースデヒドロゲナーゼによる補酵素再生系の共存下、DMF を添加して難水溶性のカルボニル化合物を基質とする還元反応を行なったところ、野生型酵素の場合と比べ収率よく光学活性アルコールを得ることができた。

carbonyl reductase, organic solvent, engineered enzymes

講演番号：2A34p06
講演日時、会場：3 月 27 日 15:05～ A 校舎 34 会場

油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* の油脂蓄積関連遺伝子の発現解析
Expression of genes responsible for triacylglycerol accumulation in oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi*

○山崎 晴丈[1]、坂井 真人[1]、志田 洋介[2]、小笠原 渉[2]、高久 洋暁[1]([1]新潟薬大応生科、[2]長岡技科大生物)
○Harutake YAMAZAKI[1], Manato SAKAI[1], Yosuke SHIDA[2], Wataru OGASAWARA[2], Hiroaki TAKAKU[1] ([1]Niigata Univ. Pharm. Appl. Life Sci., [2]Nagaoka Univ. Technol.)

【背景と目的】　日本の油脂自給率はカロリーベースで約 3%と低いため，輸入に依存しない安定した油脂自給システムの構築は我が国の喫緊の課題である。そこで我々は油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* を利用した油脂生産に注目している。この酵母は細胞内に油脂（トリアシルグリセロール）を脂肪球に高蓄積できる。また、廃材や稲わらなど未利用の木質系バイオマスを酵素処理により糖化することでグルコースやキシロース、ガラクトースなどといった様々な糖が得られるが、この酵母はこれらを資化することで細胞内に油脂を生産・蓄積する性質を持つ。このようなことから，*L. starkeyi* を産業利用し，食料廃棄物などから「醸造油」を生産することによって，上記の課題克服を目指している。そのための基盤として，*L. starkeyi* が油脂を蓄積する詳細な機構を理解することは重要である。そこで本研究では油脂合成に関与する遺伝子の発現解析を行い，各遺伝子が脂質代謝にどう関与しているかの知見を得ることを目的とした。
【方法】　*L. starkeyi* CBS 1807 株を S 培地（5% Glucose, 0.05% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.01% $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0.5% $(NH_4)_2SO_4$, 0.1% KH_2PO_4, 0.01% NaCl, 0.1% Yeast extract）で経時的に培養し，油脂合成に関与する遺伝子の発現様式について定量 PCR を用いて検討した。
【結果と考察】　アセチル CoA や脂肪酸合成に関与する遺伝子（*ACL1*, *ACC1*, *FAS1*, *FAS2*）発現量は対数増殖期初期に一過的に著しく上昇したものの、それ以降は時間の経過と共に低下した。ジアシルグリセロールからトリアシルグリセロールを合成する酵素の遺伝子（*DGA1*, *LRO1*）は，前述の遺伝子群ほどの大きな発現量の変化は見られなかった。トリアシルグリセロール分解酵素遺伝子（*TGL3*, *TGL4*）の発現量は培養を通して大きな変化は見られなかったため，油脂分解は定常的に起こっており，炭素源枯渇後の油脂量の減少は分解ではなく合成量が低下することに起因すると考えられた。以上のことから、アセチル CoA や脂肪酸を合成する経路の遺伝子を恒常的に高発現できれば、油脂量の増加に繋がるのではないかと推察している。また，遊離脂肪酸からアシル CoA を合成する酵素の遺伝子である *FAA2* や，そのアシル CoA を利用して β 酸化を行う酵素の遺伝子 *POX1*, *POX2*, *POT1* は炭素源枯渇後に発現が大きく上昇しており，蓄積したトリアシルグリセロールを分解して，細胞を維持するエネルギーを獲得していると考えられた。
尚，本研究は「農林水産省，農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業」の支援を受けて行われた。

Lipomyces starkeyi, oleaginous yeast, triacylglycerol

講演番号：2A34p07
講演日時、会場：3 月 27 日 15:16～ A 校舎 34 会場

油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* における油脂低蓄積変異株の取得とその油脂生産関連遺伝子の発現解析

Expression profile of genes responsible for lipid production in oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi* mutant exhibiting low lipid accumulation

○小黒 雅智[1]、山崎 晴丈[1]、志田 洋介[2]、小笠原 渉[2]、高久 洋暁[1]([1]新潟薬大・応生科、[2]長岡技大・生物)
○ Masatomo OGURO[1], Harutake YAMAZAKI[1], Yousuke SHIDA[2], Wataru OGASAWARA[2], Hiroaki TAKAKU[1] ([1]Fac. Appl. Life Sci., Niigata Univ. Pharm. Appl. Life Sci., [2]Nagaoka Univ. Technol.)

【目的】現在、我が国では油脂の大半を輸入に頼っており、世界情勢の変化による価格変動や粗悪油脂による健康被害などのリスクを抱えている。この問題の解決策として、油糧植物を用いた油脂生産が注目されているが、栽培面積の少ない我が国においては非常に不利なシステムである。これらのことから、本研究では油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* に注目している。この酵母は細胞内に油脂を高蓄積でき、その脂肪酸組成も油糧植物由来の油脂と近いため、この酵母を産業的に利用できれば上記のような問題を解決に貢献できると考えられる。しかしこの酵母を産業的に利用するには油脂生産能の向上が必須であり、育種や遺伝子工学的技術による形質の改善が求められているが、油脂関連遺伝子に対する知見は少ない。そのため、本研究ではこの酵母の油脂低蓄積変異株を取得し、その遺伝子発現解析結果を野生株と比較することで、油脂蓄積に重要な遺伝子を特定することを目的とした。
【方法】*L. starkeyi* CBS1807 を親株としてアルキル化剤である Ethyl methanesulfonate (EMS) を用いて突然変異導入を行った。油脂の密度は、水よりも低いことから、油脂低蓄積変異株は、野生株と比較して密度が高いと予想された。そこで、これらの変異導入群細胞の Percoll 試薬を用いた密度勾配遠心による分離を繰り返すことにより、油脂低蓄積変異株を含むと考えられる高密度画分を濃縮した。その後、単コロニー化し、96 穴深型マイクロプレートで培養した後に、細胞内油脂検出試薬ナイルレッドで細胞を染色し、蛍光強度を測定することで、簡便かつ迅速に 1 次スクリーニングを行った。次に 2 次スクリーニングでは、バッフル付フラスコで培養を行い、継時的に生育、グルコース消費量、油脂量を測定し、野生株と比較することにより、油脂低蓄積変異株を見出した。
【結果と考察】油脂低蓄積変異株を 2 株取得した。これらの油脂低蓄積変異株はグルコースの消費速度は野生株よりも早いにも関わらず、細胞あたりの油脂量が野生株と比較して非常に少なく、さらに油脂低蓄積変異株の細胞は、野生株の細胞と比べ、その体積は大きくなっていた。また、野生株では通常、細胞内に 1 つの大きな脂肪球を形成するが、これらの油脂低蓄積変異株では、細胞内に小さな脂肪球が複数個形成されていた。これらのことから、変異株が油脂を生産しにくいのは、グルコースの取り込みに欠損があるわけではなく、グルコースを取り込んだ後に油脂に変化する経路もしくは生産された油脂を蓄積する経路に欠陥があるか、生産された油脂の分解が著しく亢進していることが原因であると考えられる。現在はこれらの油脂低蓄積変異株の RNA 抽出を行い定量 PCR による油脂生産関連遺伝子の発現解析を行っている。
なお、本研究は農林水産省「農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業」の支援を受けて行われた。

Lipomyces starkeyi, oleaginous yeast, lipid droplet

講演番号：2A34p08
講演日時、会場：3 月 27 日 15:27～ A 校舎 34 会場

産業油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* における遺伝子破壊システムの開発とその利用

Development of targeted-gene disruption system for industrial oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi* and its applications

○小黒 芳史[1]、山崎 晴丈[1]、志田 洋介[2]、小笠原 渉[2]、高久 洋暁[1]([1]新潟薬大応生命、[2]長岡技科大)
○Yoshifumi OGURO[1], Harutake YAMAZAKI[1], Yosuke SHIDA[2], Wataru OGASAWARA[2], Hiroaki TAKAKU[1] ([1]Fac. Appl. Life Sci., Niigata Univ. Pharm. Appl. Life Sci., [2]Nagaoka Univ. Technol.)

油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* は、様々な糖を資化して、細胞内に油脂（トリアシルグリセロール；TAG）を高蓄積するユニークな酵母である。TAG が、バイオディーゼル原料や食用油脂として利用される有用油脂であることから、*L. starkeyi* の産業的価値は非常に高いと考えられる。しかしながら、この有用油脂酵母 *L. starkeyi* における油脂生産に関する詳細なメカニズムは、不明な部分が多い。その一つの理由として、*L. starkeyi* における遺伝子工学的手法の開発の遅れがあげられる。遺伝子工学的手法は、生理学的な性質の解明だけでなく、生産物の多様化・高付加価値化に活用できる重要な技術である。我々は、その第一歩として、これまでに *L. starkeyi* の形質転換系の開発に成功しているが [1)]、外来 DNA はランダムな位置に組み込まれることが多く、遺伝子ターゲッティング頻度が非常に低い問題を抱えていた。本大会では、非相同末端結合修復系に関与する遺伝子を欠失させることにより、相同組換え効率を改善させ、遺伝子ターゲッティング頻度を向上させた技術開発について報告する。さらに、本開発技術を利用して作製した *ACL1* 遺伝子（*L. starkeyi* 油脂生産に大きく寄与すると考える）の欠失変異株の表現型についても報告する。

L. starkeyi において、非相同末端結合修復系に関与していると考えられる *KU70* および *LIG4* 遺伝子の 5'領域および 3'領域を取得後、薬剤耐性遺伝子マーカーと連結させた。その遺伝子断片をそれぞれの遺伝子部位に導入し、遺伝子欠失株を取得した。また、形質転換は、これまでに我々が開発したスフェロプラスト-PEG 法を改良し、形質転換効率を向上させて実施した。*KU70* 欠損株における遺伝子ターゲッティング頻度は、野生株と比較して最大で 17 倍も向上した。さらに、*KU70* および *LIG4* 遺伝子を欠失させた二重破壊株から、ウラシル要求性株を取得した。次に、遺伝子ターゲッティング頻度の向上したこれらの株を利用して、油脂生産に大きく寄与すると考えられる ATP:citrate lylase をコードする *ACL1* 遺伝子欠失株を取得した。野生株が細胞内に油脂を蓄積するのに比べ、*ACL1* 欠失株は全く油脂を蓄積しなかった。すなわち、*ACL1* 遺伝子は、*L. starkeyi* における油脂生産に重要な遺伝子であることが明らかとなった。以上のように、我々が開発した技術は、*L. starkeyi* の油脂生産に関する詳細なメカニズムを明らかにでき、さらには本技術でその油脂生産に関する代謝を制御することにより、産業的付加価値を高めることに貢献できると考えている。

なお、本研究は農林水産省「農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業」の支援を受けて行われた。

1) Oguro *et al.*, *Biosci Biotechnol Biochem.* (2014)

Lipomyces starkeyi, oleaginous yeast, transformation

講演番号：2A34p09
講演日時、会場：3 月 27 日 15:38～ A 校舎 34 会場

機能性オリゴ糖ラクトビオン酸を生産する酢酸菌由来糖酸化酵素の同定
Indentification of lactobionic acid producing enzyme from acetic acid bacterium
○桐生 高明、駒 大輔、木曽 太郎、田中 重光、中野 博文、村上 洋（大阪市立工業研究所）
○Takaaki Kiryu, Daisuke Koma, Taro Kiso, Shigemitsu Tanaka, Hirofumi Nakano, Hiromi Murakami (Osaka Municipal Technical Research Institute)

【目的】カスピ海ヨーグルトに含まれる機能性糖質、ラクトビオン酸はその発酵菌の一つである酢酸菌 *Acetobacter orientalis* が牛乳中のラクトースの還元末端を酸化することで、ヨーグルト中に蓄積することをすでに明らかにしている。しかし、既報の文献では酢酸菌の菌体やその糖酸化酵素はラクトースを酸化しないことが報告されている。そこで、酢酸菌が保有するラクトースの酸化に関与する酵素を明らかにすることを目的に以下の研究を行った。
【方法・結果】カスピ海ヨーグルトから単離した酢酸菌 *A. orientalis* KYG22 株を破砕し超遠心分離により膜画分と可溶性画分に分画したところ、膜画分にのみラクトース酸化活性が検出された。酢酸菌の膜画分に含まれる糖酸化酵素には膜結合型のピロロキノリンキノン依存性グルコースデヒドロゲナーゼ（m-GDH）が知られており、取得した膜画分中のラクトース酸化活性の至適 pH などの性質は、既報の酢酸菌由来のm-GDH とほとんど同じであった。しかし、酢酸菌の菌体やm-GDH はラクトースを酸化しないことが報告されている。我々は HPAEC-PAD を用いた高感度検出法により様々な酢酸菌のラクトース酸化活性を調べたところ、ほとんどの菌株でラクトース酸化活性が検出され、ラクトース酸化活性が酢酸菌に広く分布することが分かった。しかし、ラクトースに対する酸化活性はグルコースに対する酸化活性に比較して非常で微弱であり、従来の文献中のグルコース酸化活性の測定条件では、微弱なラクトース酸化活性を検出するのは非常に困難であった。我々はラクトースの酸化に関与する目的酵素がm-GDH であると考え、全遺伝子配列が解析されている *Gluconacetobacter medellinensis* NBRC3288 株を用いm-GDH 欠失株を作成した。野生株ではラクトビオン酸およびグルコン酸の生産が確認されたが、欠失株ではそれらの生成物は確認されなかった。また、酢酸菌で m-GDH を発現させたところ、遺伝子発現株は野生株に比べ約 4 倍のラクトビオン酸を生産した。本結果は酢酸菌が有するラクトース酸化を触媒する酵素がm-GDH であることを示唆している。また、酢酸菌休止菌体のラクトース酸化活性は微弱であるものの、高濃度のラクトース（300 g/L）の存在下でも活性が失われず、反応が効率的に進んだ。ラクトース濃度を 50～300 g/L に上げることで反応速度を大幅に増大し、72 時間の反応でそれぞれモル収率 57～96 mol%でラクトビオン酸を生産することが可能となり、酢酸菌によるラクトビオン酸の工業的生産法の実用化へ道が開けた。現在、酢酸菌で生産されたラクトビオン酸はカルシウム吸収促進食品素材として乳製品やサプリメントに配合され市販されている。

acetic acid bacterium, glucose dehydrogenase, lactobionic acid

講演番号：2A34p10
講演日時、会場：3 月 27 日 15:49～ A 校舎 34 会場

微生物による D-グルコース、D-グルコン酸から D-グルカル酸への変換反応経路の推定

Estimation of intermediates of microbial oxidation of D-glucose and D-gluconate to D-glucaric acid

○村上 洋[1]、靜間 基博[1]、田所 宏基[2]、正木 久晴[2]、伊藤 哲也[2]、桐生 高明[1]、木曽 太郎[1]、藤田 孝輝[2]、三國 克彦[2] ([1]阪市工研、[2]塩水港精糖)

○ Hiromi MURAKAMI[1], Motohiro SHIZUMA[1], Hiroki TADOKORO[2], Hisaharu MASAKI[2], Tetsuya ITO[2], Takaaki KIRYU[1], Taro KISO[1], Koki FUJITA[2], Katsuhiko MIKUNI[2] ([1]Osaka Municipal Technical Research Institute, [2]Ensuiko Sugar Refining Co., Ltd.)

【目的】*Pseudogluconobacter saccharoketogenes* は、糖質の酸化還元に係る複数の酵素活性を有し、脂肪族炭化水素やポリオールに結合した一級水酸基、二級水酸基、アルデヒド基の脱水素反応（微生物変換）により、アルデヒド、カルボン酸、ケト酸を生成する。本菌株を D-グルコースおよび D-グルコン酸に作用させ、反応液を経時的に分析すると、D-グルコースおよび D-グルコン酸からはそれぞれ異なる中間体(A, B)が生じ、その後これらの減少に伴い D-グルカル酸が生成することが分かった。D-グルコン酸から生成する中間体を A、D-グルコースから生成する中間体を B として、これらの消長を比較すると共に単離して構造決定し、反応経路を推定した。

【方法】*Pseudogluconobacter saccharoketogenes* の取得菌株を培養し、休止菌体を得た。菌体の有する酸化(脱水素)活性は、D-グルコースおよびグリオキシル酸 Na を基質として用い、それぞれアルコールの酸化（脱水素）活性およびアルデヒドの酸化(脱水素)活性を、フェリシアニド法により測定した。両酸化活性を目安に用い、休止菌体を D-グルコースおよび D-グルコン酸に作用させた。反応生成物の分析は HPAEC-PAD、構造の推定は ESI-MS、NMR を用いて行った。

【結果】D-グルコース溶液(10 g/L)に調製した休止菌体を加え、NaOH により pH 調整しながら 30℃で通気加温撹拌した。経時的に反応液を分析し、D-グルコースが消失した時点で反応を止め、遠心分離により菌体を除いて反応液を回収した。陰イオン交換樹脂および陽イオン交換樹脂によるカラムクロマトグラフィーを行い、中間体 A を得た。調製した中間体 A のメタノール溶液を用いて質量分析を行い、$[M-H]^-$ 176.9, $[M^2-H]^-$ 354.8 の負イオンピークを検出した。また蟻酸存在下では $[M+HCOO]^-$ 222.8, $[M^2+HCOO]^-$ 400.7 の負イオンピークを検出し、中間体 A の分子質量は 178 と推定した。全糖量に対する還元糖量の比は 8.02 と強い還元性が認められた。

D-グルコン酸(30 g/L)に対して同様の反応および精製操作を行い、濃縮と再結晶により中間体 B ナトリウム塩結晶を得た。質量分析を行い、$[M^2-H]^-$ 193.0, $[M^2-H]^-$ 386.8, $Na[M^2-H^2]^-$ 408.9 の負イオンピークを検出したため、分子質量は 194 と推定された。^{1}H-NMR および ^{13}C-NMR の測定結果から、各スペクトルを帰属し、六炭糖構造（D-グルコース）の両端にカルボキシル基とアルデヒド基を一残基ずつ有する構造であることを確認した。

glucaric acid, saccharic acid, microbial conversion

講演番号：2A34p11
講演日時、会場：3 月 27 日 16:10～ A 校舎 34 会場

土壌メタゲノム由来 *Leifsonia* sp. S749 アルコール脱水素酵素 (LSADH)類縁遺伝子の評価

Characterization of *Leifsonia* sp. alcohol dehydrogenase (LSADH) - related enzymes isolated from soil metagenomes

○風間 美輝[1]、狩谷 理美[1]、黒川 純司[1]、伊藤 伸哉[1,2] ([1]富県大工、[2]富県大生工セ)
○Miki KAZAMA[1], Satomi KARIYA[1], Junji KUROKAWA[1], Nobuya ITOH[1,2] ([1]Dept. Biotech., Toyama Pref. Univ., [2]Biotech. Res. Center, Toyama Pref. Univ.)

【目的】
メタゲノムからの酵素遺伝子の単離法は各種考案されているが、その効率は高くない。我々は screening of gene-specific amplicons from metagenomes (S-GAM 法) と命名した PCR を基本技術とした微生物メタゲノムからの効率的な遺伝子ライブラリー構築法・スクリーニング技術を確立した[1)]。本法を *Leifsonia* sp. S749 由来アルコール脱水素酵素 (LSADH)[2)]に適用し、 LSADH とは異なる基質特異性、高い安定性を有するアルコール脱水素酵素(ADH)の類縁酵素遺伝子をメタゲノムから取得し、そのキャラクタリゼーションを行った。

【方法】
土壌及び堆肥、活性汚泥サンプルよりメタゲノムを抽出し、*lsadh* の類縁酵素遺伝子を取得するために設計した縮重プライマーを用いて PCR を行い、当該遺伝子の増幅を行った。また、増幅した遺伝子と活性中心部位をデリーションさせた pKELA (LSADH の発現ベクター)を In-Fusion 反応により融合させ、*E. coli* JM109 を用いてライブラリーを作製した(GAM 法)。このライブラリーより LSADH と異なる基質特異性や耐熱性を示すクローン(*hladh* と命名)を選別し、それぞれプラスミドを抽出してシーケンス解析を行った。この中から類縁酵素 HLADH-012, -021 を精製し評価を行った。

【結果】
S-GAM 法により、多数の *lsadh* の類縁酵素遺伝子(*hladh*)を取得することに成功した[1)]。酵素活性のスクリーニングにより、LSADH では低活性である 1-Boc-3-ピロリジノンや 2'-クロロアセトフェノン等に対する還元活性、耐熱性、15% 1-プロパノール存在下での 2,2,2-トリフルオロアセトフェノン還元活性等 LSADH よりも優れた酵素がいくつか認められた。特に HLADH-021 については各種光学活性アルコールの生産について検討し、その有用性を確認した。

1) N. Itoh, S. Kariya, J. Kurokawa, Appl. Environ. Microbiol., 80:6280-6289 (2014).
2) K. Inoue, Y. Makino, N. Itoh, Tetrahedron:Asymmmetry, 16, 2539-2549 (2005).

metagenome, ADH related enzyme, chiral alcohol

講演番号：2A34p12
講演日時、会場：3 月 27 日 16:21～ A 校舎 34 会場

有機溶媒耐性菌を用いたキラルエポキシ化合物生産プロセスの開発

Bioproduction of enantiopure epoxides using styrene monooxygenase expressed in organic solvent-tolerant microorganism.

○戸田 弘、伊藤 伸哉（富県大生工セ）
○Hiroshi TODA, Nobuya ITOH (Biotech. Res. Center, Toyama Pref. Univ.)

【研究目的】　光学活性なエポキシ化合物は、医薬・農薬・機能性高分子材料など様々な化合物の合成中間体として利用される重要化合物である。これまでに、化学的手法による光学活性エポキシ化合物合成が研究されているが、これらは重金属触媒や過酸を必要とすることから、設備管理維持や環境負荷などが課題となっている。一方、酵素触媒を用いるバイオプロセス法ではこれらを用いず、温和な条件下で光学活性なエポキシ化合物を生産できる環境調和型技術として研究が進められている。そこで本研究では、土壌細菌由来スチレン酸化酵素（スチレンモノオキシゲナーゼ）を利用した環境調和型バイオプロセスによる、光学活性エポキシ化合物の生産を検討した。

【方法・結果】　我々はこれまでに、スチレン資化性菌 *Rhodococcus* sp. ST-10 よりスチレンモノオキシゲナーゼ遺伝子（RhSMO）を単離し、その機能解析を行ってきた。RhSMO は各種芳香族アルケンおよび直鎖アルケン類に対して立体選択的なエポキシ化活性を示し、その光学純度は概ね 90%以上であった。そこで本酵素を利用し、光学活性エポキシ化合物生産バイオプロセスを構築した。*Leifsonia* sp. S749 由来アルコール脱水素酵素（LSADH）を NADH 補酵素再生系とする大腸菌組換え菌体を作成し、水系-有機溶媒二相系反応による各種アルケン類のエポキシ化試験を行った。約４０種類を超える芳香族アルケンおよび直鎖アルケンから光学純度９０％以上の（*S*）-体エポキシ化合物が生成され、RhSMO がエポキシ化合物生産に有用であることが示唆された(1,2)。

我々はさらに、直鎖アルケン化合物のエポキシ化の効率を向上させるため、有機溶媒耐性菌を宿主とした RhSMO 発現系を構築した。各種微生物を宿主として検討した結果、*Kocuria rhizophila* DC2201 を用いた時に有意に 1-ヘプテンを（*S*）-1,2-エポキシヘプタンへと変換した。本組換え菌を用いて各種変換条件を検討し、最適条件下において 400 mM の 1-ヘプテンから約 90 mM の（*S*）-1,2-エポキシヘプタンを生産した。また、各種直鎖アルケン類を基質としたとき、いずれの基質においても光学純度９０％程度の（*S*）-体エポキシ化合物を生成した。特に、6-クロロ-1-ヘキセンを基質としたとき 250 mM のエポキシ化産物を有機溶媒相に蓄積し、本プロセスが様々な修飾アルケンのエポキシ化に有効であることが示唆された。現在、さらに変換効率の向上を達成するため各種条件検討や宿主改良を検討中である。

1) H. Toda, N. Itoh et al., Tetrahedron: Asymmetry, 23:1542-1549(2012)
2) H. Toda, N. Itoh et al., Advanced Synthesis & Catalysis, 356:3443-3450(2014)

styrene monooxygenase, chiral epoxide, *Kocuria rhizophila*

講演番号：2A34p13
講演日時、会場：3 月 27 日 16:32～ A 校舎 34 会場

シークヮーサー由来フラボノイド 3’-*O*-メチル基転移酵素(FOMT)の機能解析およびメチル化フラボノイド生産

Characterization of flavonoid 3'-*O*-methyltransferase from *Citrus depressa*

○伊藤 伸哉[1,2]、鷲見 のはら[2]、戸田 弘[1,2] ([1]富県大生工セ、[2]富県大工)
○Nobuya ITOH[1,2], Nohara SUMI[2], Hiroshi TODA[1,2] ([1]Biotech. Res. Center, Toyama Pref. Univ., [2]Dept. Biotech., Toyama Pref. Univ.)

【研究目的】　近年、各種メチル化フラボノイドが様々な生理活性を有することが示唆されており、その効果は抗腫瘍活性、抗アレルギー、肥満抑制、認知症予防など多岐にわたる。これらメチル化フラボノイドの多くは植物体内で *S*-アデノシルメチオニン(SAM)依存フラボノイド *O*-メチル基転移酵素(FOMT)の作用により生成・蓄積されることが明らかとなっている。しかしこれらメチル化フラボノイドは高価なものが多く、その研究利用を妨げる要因のひとつとなっている。そこで本研究では、植物由来 FOMT 遺伝子を大腸菌等の異宿主で発現させ、効率的にメチル化フラボノイドを生産できるバイオプロセスの構築を目的として行った。

【実験方法・結果】　当研究室ではこれまでに、沖縄県産柑橘類であるシークヮーサーより複数の FOMT 様遺伝子を単離し、大腸菌による異宿主発現を試みている。それらのうち CdFOMT5 および CdFOMT6 の 2 遺伝子について、有意なフラボノイドメチル化活性を得ることができた（2013 年農芸化学会要旨,(1)）。本発表ではこれらのうち、CdFOMT6 について詳細な基質特異性の解明とメチル化フラボノイド生産バイオプロセスについて検討を行った。CdFOMT6 発現大腸菌体を用いて各種フラボノイド類に対する休止菌体反応を行った結果、ケルセチンをはじめミリセチン、ルテオリン、フィセチン、エピカテキン、エピガロカテキン、エリオジクチオールなどに対し 3’-OH メチル化活性を示した。ミリセチンを基質としたとき、メチル化産物と思われるピークが 2 つ検出されたことから B 環の 2 ヵ所の-OH 基(3’/5’-OH)がメチル化された産物が生成していると推測される。また、タマリキセチン(4’-メトキシケルセチン)やヘスペレチン(4’-メトキシエリオジクチオール)を基質としたときにはメチル化産物が生成しないことから、本酵素は B 環がカテコールまたはピロガロール構造をとる場合のみメチル化活性を示すと推測され、シークヮーサーにおけるメチル化フラボノイド生合成経路を考える上で興味深い。

本酵素を用いたメチル化フラボノイド生産プロセスを構築するために、炭素源や基質濃度など各種条件を検討し、ケルセチンからのイソラムネチン生産試験を行った。また、メチル基供与体である *S*-アデノシルメチオニン(SAM) の合成酵素(SAM synthase)および *S*-アデノシルホモシステイン(SAH) 分解酵素(SAH hydrolase)との共発現菌体を作成し、イソラムネチン生産における影響を検討中である。

1) 特願 2013-214464：シークヮーサー由来フラボノイド O-メチル転移酵素(FOMT)及びその利用

flavonoid *O*-methyltransferase, *Citrus depressa*, methoxyflavonoids

講演番号：2A34p14
講演日時、会場：3 月 27 日 16:43～ A 校舎 34 会場

環境中の炭素分布とアルカンヒドロキシラーゼ(alk)遺伝子との関係解析
Analyzing the relationship between the distribution of carbon and that of alkane hudroxylase gene in the environment
○植田 雄仁、向 真樹、ADHIKARI Dinesh、荒木 希和子、久保 幹（立命館大学）
○ YUTO UEDA, Masaki MUKAI, Dinesh ADHIKARI, Kiwako ARAKI, Motoki KUBO (Ritsumeikan Univ.)

[目的]
アルカンヒドロキシラーゼ(Alk)は炭化水素の分解に関わっている酵素である。これまでの研究から *alk* 遺伝子を保有する微生物は環境中に広く存在していることが明らかとなっている。自然界では動物・植物由来の炭素が多く存在することから、*alk* 遺伝子を保有する微生物がそれらの炭素を分解し、物質循環に関与していると考えられる。しかし、自然環境中における土壌中の炭素成分の組成、*alk* 遺伝子を保有している微生物の分布、ならびにこれらの炭素の分解への関与は明確になっていない。
本研究では植物と植物下の土壌に着目し、土壌中の炭素成分と *alk* 遺伝子を保有する微生物を調べ、これらがどのような環境下に多く分布しているかを明らかにすることを目的とした。
[方法・結果]
植物の葉の特性（常緑性もしくは落葉性）の違いに着目し、様々な地域や場所から土壌と植物をサンプリングし、土壌 10 g または葉 5 g にクロロホルム・メタノール溶液（3:1）24 ml を加えて撹拌を行い、抽出溶液をろ過し、ろ液を揮発させた。揮発後、クロロホルム・メタノール溶液を 1 ml 加え環境サンプル液を作製し、この液を用いて TLC-FID 法で解析した。
解析の結果、土壌 29 サンプルと葉 9 サンプルから炭化水素を検出した。特に常緑性の植物下の土壌から極性の強い炭化水素のピークが保持時間 0.4 min 以降に認められた。また、植物の葉から得た炭化水素のピークが土壌サンプルからも検出され、土壌環境中に植物由来のものと考えられる炭素成分が含まれていることが示唆されるこの結果をもとに土壌中の *alk* 遺伝子を保有する微生物数を real time PCR で解析した。

alkane hudroxylase, decomposing hydrocarbon, indeciduate plant

講演番号：2A34p15
講演日時、会場：3 月 27 日 16:54～ A 校舎 34 会場

石油分解菌によるワックス分解能の解明

Elucidation of wax degradation by petroleum degrading bacteria

○松浦 太一、向 真樹、ADHIKARI Dinesh、荒木 希和子、久保 幹（立命館大）
○Taichi MATSUURA, Masaki MUKAI, Dinesh ADHIKARI, Kiwako ARAKI, Motoki KUBO (Ritsumeikan Univ.)

【背景・目的】

石油による汚染土壌の浄化のために、様々な種類の石油分解菌が単離され、バイオレメディエーションに応用されている。先行研究より、炭化水素の分解に関与するアルカンヒドロキシラーゼ遺伝子（*alkB* 遺伝子）を保持する石油分解菌は環境中に普遍的に分布していることが明らかとなった。自然環境中において長鎖の直鎖炭化水素を有しているワックスは、植物の葉や昆虫の表皮などの構成成分であり、環境中に広く存在している。そのため、炭化水素の分解が可能な石油分解菌がワックスの分解にも関与している可能性がある。そこで、本研究ではワックスを基質とする培地下で石油分解菌を培養し、石油分解菌のワックスに対する分解能と分解産物を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】

パルミチン酸セチルを基質とする改変 LB 培地 100 ml に *alkB* 遺伝子を保持する *Rhodococcus* 属や *Gordonia* 属などの石油分解菌を加え、30 日間振盪培養を行った。培養液に油分抽出液（クロロホルム:メタノール=3:1）30 ml を加え攪拌した後、遠心分離しパルミチン酸セチルを抽出した。TLC-FID 分析より、抽出されたパルミチン酸セチルは 40.5~80.1 %が分解されていることが分かった。さらに乾燥重量においても減少していることが確認された。

さらに、改変 LB 培地中でのパルミチン酸セチルの挙動を解析するために、経時変化を調べた。上記と同様の培養条件で培養を行い、適宜培養液を 5 ml 採取した。採取した培養液に抽出液 3-メチル-1-ブタノール 1 ml を加え、分解産物を抽出した。GC 分析の結果、1 日目以降の培地中から中間産物と思われる物質を検出することができた。さらに、GC-MS 分析より、中間産物の構造を推定した。このことから、石油分解菌がワックスも分解することが明らかになった。

Alkanehydroxylase, wax, petroleum degrading bacteria

講演番号：2A34p16
講演日時、会場：3 月 27 日 17:15～ A 校舎 34 会場

超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* のキチン高分解・資化性株の創成

Development of a hyper-chitin-degrading strain of the hyperthermophilic archaeon, *Thermococcus kodakarensis*

堀内 あゆみ[1]、高橋 直哉[1]、Jha Savyasachee[2]、○金井 保[1,2]、跡見 晴幸[1,2]（[1]京大院工、[2]科学技術振興機構 CREST）
Ayumi Horiuchi[1], Naoya Takahashi[1], Savyasachee Jha[2], ○Tamotsu Kanai[1,2], Haruyuki Atomi[1,2] ([1]Kyoto Univ., [2]JST, CREST)

超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* はキチン代謝経路を有するが、キチンに依存した生育は観察されていない。本研究では *T. kodakarensis* のキチン高分解・高資化性株を遺伝子工学的に作製することを目指した。

本菌のキチン代謝系において、唯一、glucosamine (GlcN) kinase 遺伝子が同定されていない。そこで、sugar kinase とアノテーションされている遺伝子の中に、GlcN に対するリン酸化活性を示すものがあると考え、ADP-specific glucokinase（TK1110）と ADP-specific phosphofructokinase（TK0376）に着目した。大腸菌を用いて、これらの組換え型タンパク質を作製し、GlcN kinase 活性を測定したところ、TK1110 で GlcN kinase 活性が検出された。一方で、TK0376 には活性が観察されなかった。GlcN kinase の同定により、本菌のキチン代謝経路の全貌が明らかとなった。

続いて *T. kodakarensis* のキチナーゼ遺伝子（TK1765）のプロモーター領域を高発現型に置換することで、キチナーゼ発現量の増強を試みた。使用したプロモーターは強力で構成的な cell surface glycoprotein 遺伝子（TK0895）由来のものである。作製した KC01 株におけるキチナーゼ発現量を確認したところ、大量に分泌発現されていた。また、コロイド状キチンを添加した培地で培養すると、キチン分解能が著しく向上していることが観察された。培養液を用いた TLC 解析により、KC01 株ではキチンが分解され$(GlcNAc)_2$が蓄積していることが判明した。一方で、KC01 株においても、キチン依存的な細胞増殖の向上は観察されなかった。そこで、さらにキチン資化に関わる遺伝子群の強化を進めた。KC01 を元株として、$(GlcNAc)_2$の輸送と資化に関わる全遺伝子に対して、そのプロモーター領域を高発現型のものと置換した。こうして作製した KC04 株をキチン添加培地で培養し、培養液中のキチン分解産物を TLC により観察した。その結果、KC04 株では$(GlcNAc)_2$のスポットは一旦は蓄積するものの、培養の経過に伴って消失した。さらに、KC04 ではキチン資化に伴い生成することが予想されるアンモニアと酢酸が、培養液中に有意に蓄積することが判明した。以上の結果から、KC04 はキチン分解・資化能が向上した株であることが示唆された。

chitin, archaea, chitinase

講演番号：2A34p17
講演日時、会場：3 月 27 日 17:26～ A 校舎 34 会場

乳酸菌由来 Aspartate：Alanine 交換輸送体 (AspT) の基質依存的構造変化と輸送の解析

Analysis of the substrate dependent conformation change and transport of the amino acid exchanger AspT

○鈴木 聡美[1]、木村 拓也[1]、笹原 綾子[1]、七谷 圭[2]、阿部 敬悦[1,3] ([1]東北大・院・農・応用微生物、[2]東北大・院・工・応用生物物理学、[3]東北大・未来研)
○Satomi SUZUKI[1], Takuya KIMURA[1], Ayako SASAHARA[1], Kei NANATANI[2], Keietsu ABE[1,3] ([1]Div. Biosci. Biotechnol. Future Bioind., Grad. Sch. Eng., Tohoku Univ., [2]Dept. Biomol. Eng., Grad. Sch. Eng., Tohoku Univ., [3]NICHe, Tohoku Univ.)

【背景・目的】乳酸菌 *Tetragenococcus halophilus* 由来 Aspartate (Asp) : Alanine (Ala) 輸送体 AspT は、電位差形成的な $L\text{-}Asp^{-1}$、$L\text{-}Ala^{0}$ 交換輸送反応を触媒する。我々はこれまでに、AspT が異なる基質結合サイトを有することを明らかにした(1)。本研究では更なる輸送メカニズムの解明の為、基質の推定透過経路を形成する第 3 膜貫通領域 (TM3)(2) に焦点をあて、蛍光試薬を用いて各基質存在時の構造変化を追った。

【方法】TM3 内の Gly-62、Pro-79、Ser-83 を Cysteine (Cys) に置換した変異体 AspT-G62C、P79C、S83C を大腸菌で発現した。浸透圧法による菌体破砕によって取得した膜画分に、膜不透過 SH 基修飾試薬・オレゴングリーンマレイミド (OGM) と、各基質 L-Asp、L-Ala、D-Asp、D-Ala、L-Cysteic acid (L-CA)、L-Serine (L-Ser) を添加し、一定時間蛍光修飾した。その後、各変異体を界面活性剤抽出し、Affinity 精製を行った。各蛍光標識精製変異体を SDS-PAGE に供してバンドの蛍光及び CBB 染色強度を Image J で定量し、蛍光修飾効率を算出した。また、精製 WT-AspT を人工二重膜小胞（プロテオリポソーム）に再構成し、放射性基質と上記 6 種の基質を用いて Exchange 反応を行い、継時的な放射性基質の取り込みと排出を確認した。

【結果・考察】

P79C では L-Asp 添加濃度増加に伴い蛍光修飾効率が増加する一方、L-Ala では影響を受けなかったが、G62C では基質非存在下で蛍光修飾され、L-Asp、L-Ala 添加濃度増加に伴い蛍光修飾効率が低下した。また、L-Asp、L-Ala 共存下でどちらか一方の濃度を変化させると、濃度依存的に L-Asp、L-Ala 特異的な蛍光修飾パターンに移行した。これらのことから AspT は L-Asp 結合型、L-Ala 結合型、apo 状態の少なくとも 3 状態を有することが推察された。L-Asp のアナログである D-Asp は L-Asp と同様の蛍光修飾パターンを示し、L-Ala のアナログである D-Ala、L-Ser は L-Ala と同様の蛍光修飾パターンを示した。しかし、L-Asp のアナログである L-CA は L-Asp、L-Ala いずれの修飾パターンも示さなかった。Exchange 反応の結果、全基質が AspT に基質として輸送されたことが示された。以上のことから、L-Asp、D-Asp は L-Asp と、L-Ala、D-Ala、L-Ser は L-Ala と同様の結合型をとり、輸送に至るが、L-CA は例外で、いずれとも異なる結合型をとって輸送されていると推察された。

(1)Sasahara A., Abe K., *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 286 : 29044-29052 (2011)
(2)Nanatani K., Abe K., *et al.*, *J. Bacteriol.*, 191 : 2122-2132 (2009)

transporter, fluorescent labeling, conformation change

講演番号：2A34p18
講演日時、会場：3 月 27 日 17:37～ A 校舎 34 会場

In vitro 代謝工学を用いた NAD+サルベージ経路の構築
Construction of NAD+ salvage pathway by *in vitro* metabolic engineering
○原 直矢、中村 安奈、万袋 木麻子、本田 孝祐、岡野 憲司、大竹 久夫（大阪大工）
○Naoya HARA, Anna NAKAMURA, Komako MANDAI, Kousuke HONDA, Kenji OKANO, Hisao OHTAKE (Osaka Univ.)

【目的】
我々のグループでは種々の（超）好熱菌から取得した耐熱性酵素を *in vitro* で任意に組み合わせ、物質生産に特化した人工代謝経路を構築する「*In vitro* 代謝工学」の開発に取り組んでいる。これまでに本技術を用いて glucose から malate、lactate、*n*-butanol を高収率で生産することに成功している。しかしながら、高温で反応を実施する本法の動作原理上、一部の代謝中間体や補酵素、特に酸化還元補酵素である NAD(H)や NADP(H)の熱分解に起因する変換反応の持続性の低さが課題となっている。そこで本研究ではこれら補酵素の高温条件下での持続的利用を目指し、*in vitro* 代謝工学を用いた NAD+サルベージ経路の構築に取り組んだ。

【方法と結果】
NAD+の熱分解物を高速液体クロマトグラフィーにて分離し、得られたピークをNAD+のビルディングブロックとなり得る各種物質の標準標品の保持時間と比較した結果、NAD+はnicotinamide及びADP riboseに分解されることが明らかとなった。そこで、これらを初発物質としてNAD+を再合成するサルベージ経路をデザインした。データベース検索の結果に基づき、好熱性細菌 *Thermus thermophilus* HB8 より 4 種類の酵素、nicotinate phosphoribosyl transferase、nicotinate mononucleotide adenylyltransferase、ADP ribose pyrophosphatase、ribose phosphate pyrophosphokinaseを取得した。また、nicotinamideからnicotinateへの脱アミノ化反応を触媒する酵素として、上述の *T. thermophilus* が有する複数のputative amidaseをスクリーニングした結果、このうちの一つが目的の活性を有することを見出した。サルベージ経路の最終ステップであるnicotinic acid adenine dinucleotideのアミノ化を触媒する酵素には *Bacillus stearothermophilus* 由来のNAD synthetaseを選択した。次いで、構築したサルベージ経路を通じてのNAD+の合成速度がその熱分解速度と等しくなるよう、各酵素の濃度比を実験的に最適化した。こうして最適化された *in vitro* サルベージ経路酵素群とともにNAD+を60℃でインキュベートした結果、酵素群非添加時に比べNAD+のプールサイズが高いレベルに保持され続けることが確認できた。

In vitro metabolic engineering, thermophilic enzyme, NAD+ salvage pathway

講演番号：2A34p19
講演日時、会場：3 月 27 日 17:48～ A 校舎 34 会場

長鎖 DNA の導入に利用可能な大腸菌-*Rhodococcus* シャトルベクターの構築

Construction of an *E.coli-Rhodococcus* shuttle vector for introduction of a large-size DNA

○置田 祥子、本田 孝祐、畑中 大希、岡野 憲司、大竹 久夫（大阪大工）
○Shoko OKITA, Kohsuke HONDA, Daiki HATANAKA, Kenji OKANO, Hisao OHTAKE (Osaka Univ.)

【背景・目的】

Rhodococcus opacus は疎水性に富んだ細胞表層構造を有し、湿潤状態で有機溶媒に分散するなどといったユニークな特性を有する。このため、有機溶媒中の脂溶性基質との接触効率に優れ、脂溶性物質のバイオコンバージョンのための新たなプラットフォームとして期待されている。

R. opacus に異種遺伝子を導入するためのプラスミドベクターはすでに複数報告されているが、我々のグループでは長鎖 DNA の導入を目的として、*R. opacus* が有する巨大環状プラスミド pKNR の複製機構を利用した大腸菌/*R. opacus* の新規シャトルベクターを構築した。さらに、構築したベクターを *R. opacus* を宿主としたメタゲノムスクリーニングへと応用することを視野に入れ、環境サンプルから抽出した DNA の導入を試みた。

【方法・結果】

先行研究にて同定済みの pKNR の複製エレメント[1)]および分配遺伝子を大腸菌用のクローニングベクターに導入し、大腸菌、*R. opacus* の双方で自律複製可能なシャトルベクターを構築した。また、長鎖 DNA の導入操作を簡便化するため、市販コスミドベクター由来の cos 領域を導入するとともに、大腸菌-*Rhodococcus* 間の接合伝達因子である oriT 遺伝子を組み込んだ。

環境サンプルから抽出した DNA を制限消化し、構築したベクターと連結、ファージにパッケージングして大腸菌に感染させた。得られた大腸菌の形質転換体と *R. opacus* を共培養し、抗生物質を含んだ選択培地に塗布することで、接合伝達によりプラスミドの導入された *R. opacus* を取得した。大腸菌と *R. opacus* B4 それぞれの形質転換体からプラスミドを抽出後、制限消化し、電気泳動により外来 DNA の確認および比較を行った。いずれのプラスミドにおいても 20 kbp 程度の DNA 断片が挿入されていることが確認でき、また接合伝達の前後でその断片サイズに変化が認められなかったことから、導入した DNA が *R. opacus* 内で安定に保持されていることが確認できた。

[1)] Honda K et al. (2012) Biosci Biotech Biochem, 76: 1758-1764

Rhodococcus, metagenome, shuttle vector

講演番号：2A36a02
講演日時、会場：3 月 27 日 09:11～ A 校舎 36 会場

酵母に見出したフラボタンパク質 Tah18 依存的な NO 合成とその制御機構
Regulation mechanism of the flavorotein Tah18-dependent NO synthesis in yeast.

○吉川 雄樹、那須野 亮、渡辺 大輔、高木 博史 (奈良先端大・バイオ)
○Yuki YOSHIKAWA, Ryo Nasuno, Daisuke Watanabe, Hiroshi Takagi (NAIST)

【目的】

当研究室では、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* において、高温ストレスに応答してアルギニン依存的に一酸化窒素（NO）が合成され、細胞のストレス耐性に寄与すること、この NO 合成酵素（NOS）活性にフラボタンパク質の Tah18 が関与することを明らかにした。既知の NOS は NADPH からの電子の受け渡しを行なうレダクターゼドメインと、基質の結合を行なうオキシゲナーゼドメインの 2 つのドメインから構成される。しかし、Tah18 には NOS 活性に必須のオキシゲナーゼドメインが欠落しており、Tah18 が関与する NO 合成の詳細な機構は不明である。最近、Tah18 との相互作用が知られている Dre2 タンパク質が酵母の NOS 活性を阻害する可能性を見出した。

本研究では、これまでの知見から「非ストレス下では Dre2 は Tah18 と相互作用することで Tah18 依存的な NOS 活性を抑制しているが、ストレスに応答した Tah18-Dre2 複合体の解離によって遊離した Tah18 が NOS 活性に寄与する」という仮説を立て、酵母の新規ストレス応答的な NO 合成とその制御機構の解析を行った。

【方法・結果】

上記モデルの検証のため、Tah18 と Dre2 それぞれにタグを融合した共過剰発現株を作製し、プルダウン後のウェスタン解析により、高温や過酸化水素処理後の Tah18-Dre2 複合体の割合を非ストレス下のものと比較した。興味深いことに、高温や過酸化水素処理後 5 分で Tah18-Dre2 複合体の割合が低下した。また、過酸化水素処理 1 時間でその割合はさらに減少し、上記モデルを支持する結果となった。

次に、*TAH18* と *DRE2* 各遺伝子のノックダウン（KD）株を作製し、表現型を解析した。その結果、両 KD 株は野生型株に比べ、顕著な生育遅延を示したが、*DRE2* の KD 株においてのみ NOS 阻害剤（NAME）の添加によって生育速度が回復した。現在、Tah18-Dre2 複合体の形成・解離を介した NOS 活性の制御モデルを提唱しており、今回の結果から、ストレス下では遊離した Tah18 依存的に細胞保護に必要なレベルの NO が合成されるが、非ストレス下では Dre2 が Tah18 に依存した NOS 活性を抑制することで、NO が過剰に合成されないよう制御していると考えられる。現在、*TAH18* と *DRE2* 各遺伝子の KD 株における細胞内 NO レベルを検討するため、NO 特異的な蛍光プローブ DAF-FM DA を用いて蛍光レベルの測定を行っている。

Niric Oxide, Tah18 protein, NO regulation

講演番号：2A36a03
講演日時、会場：3 月 27 日 09:22～ A 校舎 36 会場

酵母におけるフラボタンパク質 Tah18 依存的な細胞死誘導機構の解明

The molecular mechanism of cell death induced by the flavoprotein Tah18 in *Saccharomyces cerevisiae*

○佐藤 裕士、那須野 亮、渡辺 大輔、高木 博史（奈良先端大バイオ）
○Yuji SATO, Ryo NASUNO, Daisuke WATANABE, Hiroshi TAKAGI (Nara Inst. of Sci. and Tech.)

【目的】一酸化窒素（NO）は老化や疾患をはじめ様々な生命現象に関わる重要なシグナル分子である。酵母 *Saccharomyces cerevisiae* のゲノムには、哺乳類 NO 合成酵素（NOS）のオルソログが存在しないため、NO の生成機構や生理機能は明らかではなかった。当研究室では最近、酵母の NOS 活性に関与するタンパク質として Tah18 を同定するとともに、NO が酸化ストレス耐性に寄与することを見出した。Tah18 は相互作用タンパク質である Dre2 に電子を運搬し、細胞質の鉄硫黄クラスタータンパク質の生成に関与する必須のフラボタンパク質である。一方、Tah18 の過剰発現株では野生株よりも過酸化水素処理後にアポトーシス様細胞死が強く誘導されると報告されている。アポトーシスは哺乳類等の多細胞生物では器官形成に必須の生命現象として知られているが、酵母などの単細胞生物においては、その分子機構や生理的意義に未解明な点が多い。そこで本研究では、*S. cerevisiae* において Tah18 依存的に合成される NO によって細胞死が引き起こされると予想し、解析を行った。
【方法と結果】まず、過酸化水素処理後の細胞生存率を測定したところ、Tah18 過剰発現株では野生株に比べて細胞生存率が有意に低下した。一方、Tah18 発現抑制株（*tah18* ノックダウン株）、および過酸化水素に耐性を示すと報告されている Tah18 機能欠損株（*tah18* $^{Y44C/R440G/I480V/N598Y}$ 株）では、野生株に比べて細胞生存率が有意に上昇した。続いて、TUNEL 染色法により細胞死の特徴を解析したところ、過酸化水素条件下にて、野生株の細胞内では Tah18 発現抑制株よりも DNA 断片化を示す蛍光がより強く観測された。この結果は、過酸化水素存在下では Tah18 タンパク質の量または機能依存的にアポトーシス様の細胞死が誘導されることを示唆している。次に、NO に特異的な蛍光プローブ（DAF-FM DA）を用いて過酸化水素処理後の NO レベルを測定した。その結果、野生株では過酸化水素処理により著しい NO の産生が認められたが、Tah18 の発現抑制株と機能欠損株では過酸化水素処理による NO 産生の増加は見られなかった。さらに、哺乳類 NOS の阻害剤（NAME）で細胞を処理したところ、野生株では過酸化水素処理後の細胞生存率が有意に上昇したが、Tah18 の発現抑制株と機能欠損株では細胞生存率に変化はなかった。以上の結果から、過酸化水素存在下で Tah18 依存的に合成される NO がアポトーシス様細胞死を誘導していることが示唆された。現在、メタカスパーゼをコードする *MCA1* の破壊株を用いた解析により、本研究で見出した Tah18 と NO に依存的なアポトーシスが既知のカスパーゼ経路に依存するかどうかを明らかにするとともに、NO の標的分子の探索を試みている。

Nitric oxide, Cell death, Tah18

講演番号：2A36a04
講演日時、会場：3 月 27 日 09:33～ A 校舎 36 会場

分裂酵母における一酸化窒素シグナルとその生理的役割

Nitric oxide signaling and its importance in oxidative stress response in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*

INDRI Astuti Rika、○渡辺 大輔、高木 博史（奈良先端大バイオ）
Astuti Rika INDRI, ○Daisuke WATANABE, Hiroshi TAKAGI (NAIST)

【目的】一酸化窒素（NO）は微生物から高等生物に至るまで、広くシグナル分子として様々な細胞機能に関与している。当研究室では、ゲノム上に哺乳類 NO 合成酵素（NOS）のオルソログ遺伝子が存在しない出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* において、NO がアルギニンから酵素的に合成され、酸化ストレス耐性に寄与することを見出した（*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2013; *PLoS ONE*, 2014）。本研究では、真核生物のモデルである分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* における NO シグナルに着目し、その生理的役割を解明することを目的に解析を行った。

【結果と考察】まず、分裂酵母において NO シグナルに応答して発現し、高濃度 NO の消去や解毒に必要な NO ジオキシゲナーゼ（NOD）及び *S*-ニトロソグルタチオンレダクターゼ（GSNOR）と相同性が高い遺伝子について解析した。その結果、NOD と GSNOR のオルソログ遺伝子（それぞれ *SPAC869.02c*, *fmd2*$^{+}$）の二重破壊によって細胞内の NO レベルが上昇することを見出した。また、*SPAC869.02c* は対数増殖期に、*fmd2*$^{+}$は定常期にそれぞれ特異的に発現しており、増殖のステージによって NO の合成機構や生理機能が異なる可能性が示唆された。さらに、NOS 阻害剤（NAME）で細胞を処理し、NO を観察すると、対数増殖期ではほぼ消失したのに対し、定常期では残存したことから、対数増殖期には NOS 依存的に、定常的には NOS 非依存的に NO がそれぞれ生成されると考えられた。NOS 非依存的な NO 生成はグルコース濃度の低下やラパマイシン処理などのミトコンドリア活性が上昇する条件や過酸化水素によっても同様に誘導された。以上の結果から、分裂酵母において NO 生成は酸化ストレスと密接に関連し、特に呼吸鎖複合体 III の活性が必要であることが示された。

また、非酵素的な NO ドナー（DetaNONOate）で細胞を前処理すると、過酸化水素処理に伴う活性酸素種（ROS）の生成が抑制され、酸化ストレス耐性を獲得することを見出した。そこで、このメカニズムを明らかにする目的で、DetaNONOate 処理が遺伝子の発現に及ぼす影響を DNA マイクロアレイにより解析した。その結果、（１）過酸化水素をフェントン反応により消費する鉄イオンの細胞内取り込みに必須な遺伝子（*fio1*$^{+}$, *fip1*$^{+}$, *frp1*$^{+}$）の発現上昇、（２）抗酸化酵素のグルタチオンペルオキシダーゼ遺伝子（*gst2*$^{+}$）及びスルフィレドキシン遺伝子（*srx1*$^{+}$）の発現上昇、（３）ミトコンドリアの呼吸鎖関連遺伝子群の発現低下などが認められた。以上の結果から、分裂酵母は酸化ストレスに応答して NO を産生し、生じた NO が酸化ストレスを緩和することが明らかになった。また、分裂酵母において酸化ストレス応答に対する NO シグナルの重要性を初めて示すことができた。

fission yeast, nitric oxide, oxidative stress

講演番号：2A36a05
講演日時、会場：3 月 27 日 09:44～ A 校舎 36 会場

糸状菌 *Aspergillus nidulans* のプロリン/アルギニン代謝を介した NO 耐性機構
Proline and arginine metabolisms tolerate *Aspergillus nidulans* against nitric oxide
○塚越 まどか、桝尾 俊介、周 勝敏、高谷 直樹（筑波大院生命環境）
○madoka TSUKAGOSHI, Shunsuke MASUO, Shengmin ZHOU, Naoki TAKAYA (Tsukuba Univ.)

一酸化窒素（NO）は不対電子を持つフリーラジカルであり、生体内において金属イオン、金属タンパク質およびタンパク質のシステイン残基などと速やかに反応し、強い細胞毒性を示す。一方、NO は、神経伝達のシグナル物質としてやマクロファージによる病原体の攻撃において機能を持つ。これらの重要性から、NO 分野の研究は、細菌や哺乳類を対象として行われてきたが、真菌の NO 代謝に関する研究は比較的少ない。そこで、本研究では、真菌のモデル生物である *Aspergillus nidulans* を対象として、本菌の生育の NO 耐性に関わる遺伝子を探索し、その機能を明らかにすることを目的とした。

NO 耐性に関わる遺伝子を単離するため、多コピー型の *A. nidulans* 染色体遺伝子ライブラリーを本菌に導入し、得られた形質転換体から NO 耐性を示す株を選抜した。得られた株に導入された遺伝子を同定したところ、新たに 5 つの遺伝子が *A. nidulans* の NO 耐性に関わることを見出した。このうち、AN4355 遺伝子は、プロリン合成系の酵素であるピロリン-5-カルボン酸レダクターゼ（ProC）と高い相同性を示したことから、プロリンが *A. nidulans* の NO 耐性に関わることが予想された。そこで、プロリンを添加した NO 含有培地を用いて本菌を培養したところ、プロリン濃度依存的に生育の NO 耐性が観察された。また、同培地で培養した時の細胞内プロリン量を測定したところ、培地中の NO 濃度に依存して細胞内プロリン量が減少した。また、γ-グルタミルリン酸レダクターゼをコードする *proA* の変異株の生育はプロリン要求性を示し、野生型株と比較して NO 感受性が強かった。他のアミノ酸についても同様の検討を行ったところ、アルギニンを培地に添加すると本菌の生育がプロリン添加時よりも強い NO 耐性を示すこと、NO が細胞内アルギニン量を減少させることを見出した。プロリンとアルギニンの合成・分解系は密接に関わっていることから、これら2つのアミノ酸の細胞内代謝と NO 耐性が関連すると考えられた。

nitric oxide, proline, stress response

講演番号：2A36a06
講演日時、会場：3 月 27 日 10:05～ A 校舎 36 会場

麹菌 *Aspergillus oryzae* の特異な光応答における AoVeA タンパク質の機能解析
Functional analysis of AoVeA protein in the unique light response of *Aspergillus oryzae*

○川田 純毅[1]、丸山 潤一[2]、渡邉 泰祐[1]、外山 博英[1]、北本 勝ひこ[2]（[1]琉球大農・亜熱生資、[2]東大院・農生科・応生工）
○ Junki KAWADA[1], Jun-ichi MARUYAMA[2], Taisuke WATANABE[1], Hirohide TOYAMA[1], Katsuhiko KITAMOTO[2] ([1]Dept. of Biosci. Biotech. Fac. of Agr., Univ. of Ryukyus, [2]Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo)

【目的】麹菌 *Aspergillus oryzae* は日本で古くから醸造食品の製造に使用されており、異種タンパク質生産の宿主としても用いられている。麹菌の分生子形成は、種麹造りや菌株の管理・保存において重要なプロセスである。光は主要な環境因子の一つであり、*Aspergillus nidulans* 等の糸状菌一般では光照射時に分生子形成が促進される[1)]。一方で、*A. oryzae* の分生子形成は光照射によって抑制されることから[2)]、他の糸状菌とは正反対の特異な光応答を示す。最近我々は、*A. oryzae* の光依存性の分生子形成抑制に青色光受容体 AoLreA が必要であることを明らかにしたが[3)]、その作用機序については不明である。*A. nidulans* の分生子形成を負に制御するタンパク質 VeA は、光照射条件で細胞全体に、暗条件では核に多く局在することから[4)]、光応答の制御を決定する重要な因子であると考えられる。本研究では、*A. oryzae* の VeA に相同なタンパク質の機能や光依存性の局在を調べることにより、その特異な光応答機構の解析を行った。

【方法と結果】*A. oryzae* のゲノムデータベースを用いて、*A. nidulans* の *veA* と相同性が高い遺伝子を見出だして *AoveA* と命名し、遺伝子破壊株を取得して表現型を調べた。その結果、野生型株での分生子形成は暗条件で誘導され、光照射により抑制されたのに対して、*AoveA* 破壊株では光の有無に関わらず分生子形成能が欠損していた。この表現型は、*A. nidulans veA* 破壊株が光の有無に関わらず分生子形成が誘導されるのとは逆であった。

次に、AoVeA の局在を解析するために、AoVeA-EGFP 融合タンパク質発現株を取得し、蛍光顕微鏡を用いて観察した。その結果、暗条件では細胞全体に EGFP 蛍光が観察されたのに対して、光照射条件では核への局在が多く見られるようになった。このことから、AoVeA は光に依存して核に局在する割合が高くなることが明らかとなり、暗条件で核に局在する *A. nidulans* VeA とは正反対の光応答であることがわかった。

以上の結果から、AoVeA が *A. nidulans* VeA と異なる働きをすることにより、*A. oryzae* の特異な光応答を制御していることが示唆された。現在、AoLreA との機能的関係を調べている。

1) Ruger-Herreros *et al*. (2011) *Genetics* **188**:809–22.
2) Hatakeyama *et al*. (2007) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **71**:1844–9.
3) Dietrich *et al.* 日本生物工学会 2014 年度大会要旨集 p. 23
4) Stinnett *et al.* (2007) *Mol. Microbiol.* **63**:242–55.

Aspergillus oryzae, light, conidiation

講演番号：2A36a07
講演日時、会場：3 月 27 日 10:16～ A 校舎 36 会場

酵母 TORC1 の in vitro での活性評価法の開発

Development of an in vitro assay to asses yeast TORC1 activity

○谷川 美頼、前田 達哉（東京大学）
○Mirai TANIGAWA, Tatsuya MAEDA (Tokyo Univ.)

TOR は真核生物に広く保存されたプロテインキナーゼで、ラパマイシン感受性の複合体 TORC1（TOR complex 1）と、非感受性の TORC2（TOR complex 2）という 2 種類の複合体を形成し、それぞれ独立した経路を構成している。TORC1 は細胞成長を制御する過程の中核を担っており、その活性はアミノ酸などの栄養源や増殖因子では正に、種々のストレスでは負に制御されている。TORC1 の活性化はタンパク質合成などの同化作用を促進し、オートファジーなどの異化作用を抑制することで細胞成長を促す。この制御は厳密になされており、その破綻は糖尿病やがんなどの疾病の進行と深く関わることが明らかになっている。

哺乳類ではアミノ酸による TORC1 の活性化は、低分子量 G タンパク質 Rag のヘテロ二量体である Rag 複合体が、アミノ酸依存的に TORC1 をリソソーム膜上にリクルートすることで起こると考えられている。酵母でも、Rag 複合体のオルソログである Gtr 複合体を介して TORC1 を活性化する相同な機構の存在が明らかにされている。しかし、TORC1 は生存に必須であるにも関わらず Gtr 複合体は必須でなく、さらに Gtr 複合体欠損株においても TORC1 のアミノ酸応答性が失われないことから、Gtr 複合体を介さない TORC1 活性化機構が存在すると考えられている。

我々は変異株を用いて Gtr 複合体を介さない機構に関わる分子の探索を試みている。しかし、その手段として TORC1 活性化を *in vivo* でモニターすることには大きな問題が存在する。それは、TORC1 が、栄養源で活性化されるのと同時に、栄養源の取り込みに関わるアミノ酸トランスポーターなどの発現と活性を制御しているということである。従って、例えば、変異株を用いて *in vivo* での TORC1 の活性をモニターする場合、常に変異による栄養源の取り込みへの影響を考慮に入れねばならず、その変異が TORC1 活性に与える直接の影響を評価するのが難しい。

我々は上記の問題を解決するために、*in vitro* で TORC1 のキナーゼ活性を測定する方法の確立を試みた。膜構造をなるべく維持した標品を用いることにより、*in vitro* でアミノ酸依存的な TORC1 活性を検出することに初めて成功した。また、このアミノ酸応答性は Gtr1 欠損時でも観察された。このことは、Gtr 複合体によらない TORC1 活性化機構の存在を改めて支持しており、今後この系を用いて解明されることが期待される。

TORC1, amino acid, rapamycin

講演番号：2A36a08
講演日時、会場：3 月 27 日 10:27～ A 校舎 36 会場

出芽酵母のリン酸飢餓応答におけるオートファジー誘導の役割とその制御機構の解析
Analyses of a role of autophagy induction in response to phosphate starvation and its regulatory mechanism in yeast
○横田 浩人、五味 勝也、新谷 尚弘（東北大院農）
○hiroto yokota, katsuya gomi, takahiro shintani (Tohoku Univ.)

オートファジーは膜輸送を伴う細胞質成分の分解機構であり、栄養飢餓条件下で誘導されることが知られている。出芽酵母を用いたオートファジー研究では窒素飢餓（アミノ酸を含む）が誘導条件として広く利用されており、その分解産物は不足した栄養素を補うためにリサイクルされることなど、オートファジーに関わる多様な知見が報告されてきた。しかし、窒素以外の栄養飢餓に関してはオートファジー誘導の可能性は言及されているものの、その明確な研究はほとんど行われていなかった。そこで、核酸や膜脂質などの生体分子に含まれ、すべての生物種にとって不可欠な栄養素だと考えられる「リン酸」に着目し、リン酸飢餓応答におけるオートファジーの役割について明らかにすることを目的とした。

オートファジーの活性測定は、オートファジー依存的に液胞へ輸送される二種類の異なるレポータータンパク質を用いたウェスタンブロット解析によって行った。その結果、窒素飢餓時と比べて活性は低いものの、リン酸飢餓下でオートファジーが誘導されていることが明らかとなった。さらに、出芽酵母は多量のリン酸をポリリン酸として液胞内に貯蔵しており、リン酸の貯蔵あるいは細胞質中へのリン酸放出を担うリン酸輸送体の変異株でリン酸飢餓誘導性オートファジー（P 飢餓オートファジー）の誘導が促進された。また、P 飢餓オートファジーの誘導促進が見られた変異株では、野生株と比べてリン酸代謝関連遺伝子の制御機構（*PHO* 経路）の活性化が見られた。このことは、これら変異株ではリン酸飢餓下で細胞質のリン酸濃度が低下していることを示しており、細胞内リン酸の枯渇によりオートファジーが誘導されることが示唆された。

さらに、P 飢餓オートファジーの誘導メカニズムの解析を進めたところ、*PHO* 経路はオートファジー誘導には関与していなかった。一方、Target of rapamycin complex 1（TORC1）の制御因子の変異株においてP 飢餓オートファジーが抑制され、窒素飢餓時と同様に TORC1 による制御機構が P 飢餓オートファジーの誘導に関わることが分かった。また、選択的に基質を液胞へ輸送する選択的オートファジーのアダプタータンパク質 Atg11 や選択的オートファジーの一種である Cytoplasm to vacuole targeting（Cvt）経路関連遺伝子の変異株では、窒素飢餓時では見られない、P 飢餓オートファジー特異的な誘導遅延が観察された。このことから、Cvt 経路特異的なメカニズムを介して P 飢餓オートファジーが誘導される可能性が示唆された。

yeast *Saccharomyces cerevisiae*, autophagy, phosphate metabolism

講演番号：2A36a09
講演日時、会場：3 月 27 日 10:38～ A 校舎 36 会場

出芽酵母オートファジーにおける SNARE タンパク質の役割
A role of SNARE protein in autophagy, in *Saccharomyces cerevisiae*
○菊地 のぞみ、柚賀 正樹、源田 博、五味 勝也、新谷 尚弘（東北大院・農・生物産業創成）
○Nozomi KIKUCHI, Masaki YUGA, Hiroshi GENDA, Katsuya GOMI, Takahiro SHINTANI (Grad. Sch Agric., Tohoku Univ.)

【目的】オートファジーは酵母からヒトまで広く保存されており、栄養飢餓時に自身の細胞質成分を分解することで栄養源のリサイクルを行う役割を果たしている。オートファジーは形態学的には①栄養飢餓に応答した隔離膜の出現とその伸張、②伸長した隔離膜の先端同士の融合によるオートファゴソーム（以下 AP）の形成、③AP と液胞の融合、④リソソーム加水分解酵素による AP 及びその内容物の分解、という膜動態を伴う。現在まで、AP の形成に必要な Atg タンパク質群が数多く同定され、分子レベルで個々の機能は明らかになりつつある。一方、一過的に出現する AP の膜起源の同定も多くの研究グループによって進められており、小胞体、ゴルジ体、エンドソームなどの細胞内膜系が AP 形成に関与することが示唆されている。しかし、膜成分が AP 形成部位にどのようにターゲティングされるか、ターゲティングされた膜からどのように AP が形成されるかは明らかでない。近年、AP 形成に小胞とオルガネラの融合に必須な SNARE（soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor）タンパク質の関与が示唆されている。出芽酵母では現在 24 種類の SNARE が同定されており、これらの局在と組み合わせによって正確な小胞輸送及び膜融合がなされている。本研究では、AP 形成に必要な SNARE を探索すると共に、AP を形成するための膜の供給源の解明を目的としている。
【方法・結果】各 SNARE 遺伝子の変異株を用い、オートファジーの活性測定を行った結果、SNARE の温度感受性変異株の内ほぼすべての株でオートファジーの活性が低下した。また、Atg9 をベイトとした免疫沈降法により、Atg9 膜構造体のアフィニティ精製を行ったところ、多くの SNARE が Atg9 膜構造体に含まれていた。その内のいくつかは膜構造体を界面活性剤で処理した後も、Atg9 と共沈降したことから、AP 形成に先だって形成される PAS において、これらの SNARE が Atg9 と相互作用していることが示唆された。さらに、Atg9 と SNARE の物理的相互作用を解析するために、二分子蛍光相補性試験（BiFC）及びスプリットユビキチン法を用いた解析を行い、多くの SNARE が Atg9 と相互作用していることがわかった。また、その中でもゴルジ体や液胞との膜融合で機能する SNARE が PAS 上で Atg9 と強く相互作用していることが示された。以上のことから、これら SNARE が AP 形成及びその後の液胞と AP との融合に必要であることが考えられた。

Saccharomyces cerevisiae, autophagy, snare

講演番号：2A36a10
講演日時、会場：3 月 27 日 10:49～ A 校舎 36 会場

分裂酵母プロテインキナーゼ A は転写因子 Rst2 を介してスピンドルチェックポイント Mad1 の発現を制御している

Expression of spindle assembly checkpoint protein, Mad1, is regulated by protein kinase A through transcription factor, Rst2, in fission yeast

酒井 智健、川向 誠、○松尾 安浩（島根大・生物資源・生命工）
Tomotake SAKAI, Makoto KAWAMUKAI, ○Yasuhiro MATSUO (Shimane Univ.)

分裂酵母でプロテインキナーゼＡは触媒サブユニット Pka1 と調節サブユニット Cgs1 からなるヘテロ 4 量体である。炭素源が豊富な条件下で、Pka1 と Cgs1 が解離し、下流因子をリン酸化して生体内の反応を調節している。これまでに分裂酵母では、糖新生、減数分裂過程移行への制御、ストレス応答、経時的老化に関わっていることが報告されている。

有糸分裂期のチェックポイントであるスピンドルチェックポイントは、細胞分裂の際に姉妹染色分体の正しい分配を監視している。当研究室では、*pka1Δ*が微小管重合阻害剤に感受性を持つことから、Pka1 がスピンドルチェックポイントへの関わりがあることを新たに見出した。そこで、本研究ではその詳細なメカニズムの解析を目的としている。

これまでに Pka1 が Mad2 と複合体を形成し、Mad2 のキネトコアへの局在を制御していることを明らかにしてきた。その中で、*pka1Δ*は *mad2Δ*よりも微小管重合阻害剤に対して強い感受性を示し、*pka1Δ mad2Δ*の二重破壊株はそれぞれの単独破壊株よりもさらに強い感受性を示すことから、Pka1 が複数のスピンドルチェックポイント因子をターゲットにしていることが示唆させた。そこで *pka1Δ*におけるスピンドルチェックポイント因子の発現量を、ウェスタンブロットを用いて調べたところ、Mad1 の発現量が著しく低下していた。また、Mad1 の動原体局在は、*pka1Δ mad2Δ*の二重破壊株において、それぞれの単独破壊株よりも劇的に低下していた。Mad1 の発現低下が、発現制御と翻訳後の分解制御のどちらに影響しているのかを明らかにするために、プロテアソーム阻害剤を用いたところ、*pka1Δ*においても Mad1 の発現に影響がなかった。このことから Pka1 が Mad1 の発現制御に関与していることが示唆された。以前に減数分裂過程移行への制御において、Pka1 が転写因子 Rst2 を制御していることが報告されている。そこで、*pka1Δ rst2Δ*の二重破壊株での Mad1 の発現を調べたところ、野生株と同程度であり、*rst2Δ*が *pka1Δ*での Mad1 発現低下を抑圧していた。さらに、*pka1Δ rst2Δ*の二重破壊株は微小管重合阻害への感受性を示さず、*rst2Δ*が *pka1Δ*の感受性を抑圧していた。以上のことから Pka1 下流の転写因子 Rst2 が Mad1 の発現制御をしていることを新たに見出した。

Protein kinase A, Spindle checkpoint, Rst2

講演番号：2A36a11
講演日時、会場：3 月 27 日 11:10～ A 校舎 36 会場

糸状菌における新規カーボンカタボライト抑制機構の発見

Discovery of a novel carbon catabolite repression system in *filamentous fungi*

内田 遼太、○野原 健弘、國武 絵美、金丸 京子、木村 真、小林 哲夫（名古屋大）
Ryota UCHIDA, ○Takehiro NOHARA, Emi KUNITAKE, Kyoko KANAMARU, Makoto KIMURA, Tetsuo KOBAYASHI (Nagoya Univ.)

Aspergillus 属におけるアミラーゼ遺伝子群の転写活性化因子 AmyR は誘導物質依存的にリン酸化される。このリン酸化に関わるプロテインキナーゼ遺伝子の探索の過程で、偶然 cAMP 依存的プロテインキナーゼである PkaA がカーボンカタボライト抑制に関わることを見出した。*Aspergillus* 属では CreA はカーボンカタボライト抑制を担う主要な転写抑制因子であり、*Trichoderma reesei* における CreA のホモログ Cre1 は、標的遺伝子プロモーターへの結合にそのリン酸化が必要であることが明らかになっている。このことから *A. nidulans* の CreA による発現制御にもリン酸化が関与する可能性が考えられる。一方、我々は *A. nidulans* セルラーゼ遺伝子の発現制御には、CreA 非依存的なカーボンカタボライト抑制が関与することを見出している。そこで本研究では PkaA 破壊株と CreA 変異株（*creA204*）を用い、両者のカーボンカタボライト抑制の特徴を比較することで PkaA が CreA 依存的・非依存的のいずれのメカニズムに関与するか検証した

1%の Starch と様々な濃度の Glucose を炭素源とした寒天培地を使用し、グルコース存在下での PkaA 破壊株のアミラーゼ生産量を CreA 変異株と比較した結果、CreA 変異は劇的にグルコース存在下でのアミラーゼ生産性を向上させるのに対し PkaA 破壊の影響は微弱であった。半定量 RT-PCR により確認した結果、確かに PkaA 破壊は *amyB* および *agdB* のグルコース抑制解除を引き起こしていた。一方、1%CMC を用いたプレートアッセイによるセルラーゼ生産の検討では、CreA 変異の影響は微弱であるのに対し、PkaA 破壊株では 2%グルコース存在下でもセルラーゼ生産が認められ、類似の結果は 1%グルコマンナンを用いたプレートアッセイでも見られた。これらの結果は、PkaA が CreA 非依存的なカーボンカタボライト抑制に関与することを示唆している。Mannose、Xylose、Fructose、Sorbitol によるセルラーゼ生産抑制について PkaA の関与を解析したところ、いずれについても PkaA 破壊により抑制解除が認められたがその程度は異なり、Mannose による抑制からの解除は Glucose の場合と類似して CreA 変異より劇的であるのに対して、残りの炭素源については CreA 変異とほぼ同等の解除を引き起こした。以上の結果は解析が進んでいる CreA 依存的抑制と異なる PkaA 依存的な新規のカーボンカタボライト抑制機構が存在することを示すものである。

本研究は、生研センターのイノベーション創出基礎的研究推進事業と農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業の一貫として行われた。

pkaA, *Aspergillus. nidulans*, Carbon Catabolite Repression

講演番号：2A36a12
講演日時、会場：3 月 27 日 11:21～ A 校舎 36 会場

麹菌 *Aspergillus oryzae* のタンパク質リン酸化酵素 PkaA は糖質加水分解酵素生産のカーボンカタボライト抑制に関与する
Cyclic AMP-dependent protein kinase (PkaA) is involved in carbon catabolite repression of *Aspergillus oryzae*

○小川 真弘[1]、國武 絵美[2]、小林 哲夫[2]、小山 泰二[1] ([1]野田産研、[2]名大院生農)
○ Masahiro OGAWA[1], Emi KUNITAKE[2], Tetsuo KOBAYASHI[2], Yasuji KOYAMA[1] ([1]Noda Institute for Scientific Research, [2]Nagoya Univ.)

【目的】セカンドメッセンジャーである cAMP と cAMP 依存型タンパク質リン酸化酵素 PkaA を介したシグナル伝達経路は、真核生物において広く保存されたシグナル伝達経路の一つである。*Aspergillus* 属糸状菌においては、PkaA が分生子形成や菌糸伸長などの分化制御や、ステリグマトシスチン-アフラトキシンなどの二次代謝産物の生産抑制を担っていることが報告されている。最近になってさらに、*Aspergillus nidulans* の PkaA は糖質加水分解酵素生産のカーボンカタボライト抑制(以下 CCR と記す)にも関与していることが明らかとなった。そこで我々は、PkaA の CCR への関与が、*Aspergillus* 属糸状菌間において広く保存されているかを調べることを目的とし、麹菌 *A. oryzae* の *pkaA* 破壊株を用いた実験を行った。
【方法および結果】麹菌の *pkaA* 遺伝子座(AO090026000426)に、栄養要求性マーカーである *pyrG* を導入することにより *pkaA* 遺伝子を破壊した。宿主株には、当研究所にて開発された染色体加工技術を用いてアフラトキシン生合成クラスターを除去した *A. oryzae* RkuptrP2-1 ΔAF 株(*Δku70*、*ΔpyrG*)を使用した。0.1%セロビオースと 1%カルボキシメチルセルロース(CMC)を炭素源とした寒天培地に、種々の濃度のグルコースを添加した条件にて、*pkaA* 破壊株によるハロアッセイを実施した。コントロールには、上記宿主株の栄養要求性マーカーを相補した株を使用した。さらに、CCR に関与することが知られている既知転写因子 CreA の遺伝子破壊株も同時にハロアッセイに供した。その結果、*pkaA* 破壊株ではハロのサイズがコントロール株よりも顕著に増大するとともに、CCR が緩和される傾向がみられた。一方、*creA* 破壊株ではこのような現象は観測されなかった。また、0.1% セロビオースと 1% CMC を炭素源とした液体培地を用い、CMC 分解酵素の生産試験を実施した。その結果、*pkaA* 破壊株および *creA* 破壊株において、コントロールよりも酵素生産量が増大し、*pkaA* 破壊株では *creA* 破壊株よりも高い酵素生産が見られた。これらのことから、*A. oryzae* の CMC 分解酵素生産の CCR では、PkaA のほうが CreA よりも高い寄与をするものと思われる。次に、デンプン、キシラン、およびコンニャクグルコマンナンを唯一の炭素源とした最少培地に、種々の濃度のグルコースを添加した条件にて *pkaA* 破壊株のハロアッセイを実施した。その結果、炭素源の種類により程度の差が見られるが、*pkaA* 破壊株において、CCR が解除される傾向が観測された。以上のように、*A. oryzae* の PkaA も *A. nidulans* と同様に、糖質加水分解酵素生産における CCR に関与していることが明らかになった。本知見は、バイオマス分解酵素を高生産する糸状菌を育種していく上で有用なものである。

PkaA, Carbon catabolite repression, *Aspergillus oryzae*

講演番号：2A36a13
講演日時、会場：3 月 27 日 11:32～ A 校舎 36 会場

環境センサーHysA を介した糸状菌ミトコンドリアの動態への影響
Mitochondrial localization through the function of sensor histidine kinase HysA in *Aspergillus nidulans*
○金丸 京子、林 早紀、小島 憲介、木村 真、小林 哲夫 (名大院生命農)
○Kyoko KANAMARU, SAKI HAYASHI, KENSUKE KOJIMA, MAKOTO KIMURA, TETSUO KOBAYASHI (Nagoya Univ.)

糸状菌の環境応答には、生物に広く保存された His-Asp リン酸リレー情報伝達機構が重要な役割を担っていることが知られている。このシステムでは、環境センサーであるヒスチジンキナーゼ（HK）からのリン酸基転移によって情報が細胞内に伝達される。以前われわれは、モデル糸状菌 *Aspergillus nidulans* の HK 破壊株（13 種類）における活性酸素種（ROS）の発生を観察し、*hysA* の破壊株において ROS の発生レベルが高いことを見いだした。

酸素呼吸を行う生物では、主にミトコンドリアの電子伝達系で ROS が発生する。発生した ROS を消去するシステムで細胞内の ROS のバランスを保っているが、ミトコンドリア機能の変化によってそのバランスが崩れると、増加した ROS が酸化ストレスとして生物の生育に影響する。そのため、*hysA* 破壊株において検出された ROS は、何らかのミトコンドリア機能の変化が原因であると考えられた。本研究ではまず、*hys*A 破壊株を寒天培地で培養し、ミトコンドリアを検出する蛍光色素、Mito Tracker Red で染色し、ミトコンドリアの菌体内における動態を顕微鏡下で観察した。分生子が活発に形成される分生子柄において野生株のミトコンドリアが均一に分布していたのに対し、破壊株では同様の部分においてミトコンドリアが偏って局在していた。野生株と破壊株から精製したミトコンドリアを用いて、電子伝達系の複合体 IV を構成するチトクローム c オキシダーゼ活性を測定したところ、両株では同程度量のミトコンドリアが精製され、また同程度のオキシダーゼ活性を示すことが明らかになった。すなわち、*hysA* 破壊によってミトコンドリアの量や活性は影響されないことが確認された。HysA がどのようにミトコンドリアの動態に影響するかを理解するために、HysA と緑色蛍光タンパク質 GFP の融合株を作成し HysA の菌体内局在部位を観察したところ、HysA は分生子柄においてミトコンドリアに局在すること、その局在は HysA が情報伝達因子として保持するリン酸化能に依存することが明らかになった。さらにどのような生育条件がミトコンドリアの動態に影響するかについては、酸化剤（過酸化水素、メナジオン）、浸透圧（NaCl、ソルビトール）、エタノールの添加や酸素制限の条件で HysA-GFP 融合株を培養したところ、HysA はミトコンドリアに局在せず、ミトコンドリアの分布も分生子柄内で偏っていた。以上の結果は、HysA がミトコンドリアに局在することがその正常な分布に重要であることを示唆した。ミトコンドリアは環境ストレスによる機能低下を補うために、絶えず融合と分裂をくりかえす動的なオルガネラである。本結果をもとに、環境センサーHysA を介した糸状菌ミトコンドリアの動態とその生理的意義について考察する。

histidine kinase, mitochondria, *Aspergillus nidulans*

講演番号：2A36a14
講演日時、会場：3 月 27 日 11:43～ A 校舎 36 会場

小胞体ストレス応答は麹菌のアミラーゼ高生産条件下での生育に必須である
Unfolded protein response is essential for growth of *Aspergillus oryzae* under inducing condition of amylolytic enzymes production.
○田中 瑞己、新谷 尚弘、五味 勝也（東北大院農）
○Mizuki TANAKA, Takahiro SHINTANI, Katsuya GOMI (Tohoku Univ.)

真核細胞は小胞体内での異常タンパク質の過剰な蓄積を回避するため、小胞体ストレス応答機構を備えている。小胞体ストレス応答機構では、転写因子 Hac1（Xbp1）をコードする mRNA のイントロンが活性化された小胞体膜貫通型エンドヌクレアーゼ Ire1 による切断を受け、それから翻訳された活性型転写因子がシャペロンタンパク質などの遺伝子発現を誘導する。糸状菌においては、還元剤の添加や異種タンパク質発現により小胞体ストレス応答が誘導されることが明らかとなっているものの、生理的条件下における小胞体ストレス応答の重要性についてはほとんど明らかとなっていない。我々は、アミラーゼ高生産糸状菌である麹菌 *Aspergillus oryzae* において Ire1 オーソログ（IreA） の遺伝子破壊株の作製を試みたものの、ホモカリオンの破壊株は取得できなかった。そこで、本研究では *ireA* の条件的発現株を作製し、麹菌のアミラーゼ高生産条件下における小胞体ストレス応答の役割を解析した。

ireA 条件的発現株の生育を調べたところ、グルコースやフルクトースを炭素源とした寒天培地では、発現抑制条件で生育が著しく抑制されたものの、生育可能であった。一方、マルトースやデンプンを炭素源とした寒天培地では、完全に生育不能であった。この生育不能がアミラーゼ生産と関係しているかを調べるため、*ireA* 条件的発現株においてアミラーゼ遺伝子発現を制御する転写因子 AmyR の遺伝子を破壊したところ、マルトース培地で生育可能となった。次に、生育不能が *hacA* のスプライシングの抑制と関係しているかを調べるため、人為的にイントロンを欠失させた *hacA* を *ireA* 条件的発現株で発現させたところ、マルトース培地で生育可能となった。また、人為的にイントロンを欠失させた *hacA* を発現させた株を宿主として *ireA* の遺伝子破壊を試みた結果、ホモカリオンの破壊株が取得でき、マルトース培地でも生育可能であった。アミラーゼ生産により小胞体ストレスが誘導されているかを調べるため、フルクトース液体培地で培養した野生株と *amyR* 破壊株をマルトース液体培地に移し、小胞体ストレスにより発現が誘導される *bipA* と *pdiA* の発現量をノーザン解析により調べた。その結果、野生株において *bipA* と *pdiA* が強く発現していたのに対し、*amyR* 破壊株ではほとんど発現が誘導されていなかった。以上の結果から、麹菌のアミラーゼ高生産条件での生育に小胞体ストレス応答が必須であることが示された。

Aspergillus oryzae, Unfolded protein response, ER stress

講演番号：2A36a15
講演日時、会場：3 月 27 日 11:54～ A 校舎 36 会場

麹菌マルトースパーミアーゼ分解におけるアレスチン様タンパク質 CreD の脱リン酸化の関与
Involvement of dephosphorylation of arrestin-like protein CreD in degradation of maltose permease in *Aspergillus oryzae*

○松浦 優佳、田中 瑞己、平本 哲也、新谷 尚弘、五味 勝也（東北大院農）
○Yuka MATSUURA, Mizuki TANAKA, Tetsuya HIRAMOTO, Takahiro SHINTANI, Katsuya GOMI (Tohoku Univ.)

【目的】

細胞は外部環境に応じて不要となった膜タンパク質を速やかに分解する機構を有している。我々はこれまでに、グルコース存在下において麹菌 *Aspergillus oryzae* のマルトースパーミアーゼ MalP がエンドサイトーシス依存的に液胞へ輸送され、液胞で分解されることを明らかにしている。出芽酵母の膜タンパク質がエンドサイトーシス依存的に分解される際、アダプターとして働くアレスチン様タンパク質 Rod1 を Snf1 キナーゼがリン酸化し、ユビキチンリガーゼ Rsp5 が膜タンパク質のユビキチン化を行う。我々は、麹菌のアレスチン様タンパク質 CreD の欠損により MalP のエンドサイトーシス依存的な分解が抑制され(1)、CreD 内に存在する 2 箇所のセリンがリン酸化されることを明らかにしている(2)。本研究ではさらに、MalP の分解における CreD のリン酸化の関与について解析を行った。

【結果】

CreD 内のリン酸化を受ける 2 箇所のセリンをグルタミン酸またはアラニンに置換し、それぞれ恒常的なリン酸化または脱リン酸化された CreD 発現株を作製し、sGFP-MalP のエンドサイトーシス依存的な取込みを解析した。蛍光顕微鏡観察を行った結果、アラニン置換株ではグルコース添加後に細胞膜上から蛍光が消失したが、グルタミン酸置換株では蛍光の消失が認められなかった。したがって、CreD の脱リン酸化が MalP のエンドサイトーシス依存的な取込みに関与していることが示唆された。さらに、*malP* プロモーターをチアミンにより制御可能な *thiA* プロモーターに置換した株を作製し、sGFP-MalP の発現量を調節して解析を行った結果についても報告する予定である。

加えて、MalP のユビキチン化における CreD の作用機構を明らかにするため、Rsp5 のオーソログであるユビキチンリガーゼ HulA と CreD との相互作用解析の結果についても報告する予定である。

1）平本ら、2013 年度日本農芸化学会大会講演要旨集、2B12a09
2）田中ら、2014 年度日本農芸化学会大会講演要旨集、3A13p09

maltose permease, CreD, *Aspergillus oryzae*

講演番号：2A36p02
講演日時、会場：3 月 27 日 14:11～ A 校舎 36 会場

接合伝達性プラスミドのモデル環境下における挙動解析

Behaviors of conjugative plasmids in the artificial enviroments

○片岡 大亮[1]、飯田 健義[2]、大熊 盛也[3]、金原 和秀[2]、新谷 政己[2,3]（[1]静大工、[2]静大院工、[3]理研 BRC-JCM）
○ Taisuke KATAOKA[1], Takeyoshi Iida[2], Moriya Ohkuma[3], kazuhide Kimbara[2], Masaki Shintani[2,3] ([1]Fac. Eng., Shizuoka Univ., [2]Grad. Sch. Eng., Shizuoka Univ., [3]RIKEN)

【目的】接合伝達性プラスミドは,微生物の進化能,環境への適応能に深く寄与する遺伝因子である．プラスミドは，分子生物学の必須のツールとして用いられている一方，薬剤耐性遺伝子を伝播する媒体として問題視されている．プラスミドの伝播現象（頻度や伝播可能な微生物種）は，環境因子や宿主の違いによって影響され，プラスミドがどのような微生物種にどのくらい伝播するのかを理解するには，その挙動解析が重要となる．そこで本研究では，接合伝達性プラスミドが，異なる微生物種にどの程度伝播するのか，伝播した宿主にどのような影響をおよぼすのか，その挙動解析を行った．
【方法】モデルプラスミドとして,広宿主域で高い伝達能力を有する pBP136（緑色蛍光タンパク質をコードする遺伝子，*gfp* を挿入した pBP136::*gfp*）を用いた．また，モデル供与菌として *Pseudomonas putida* KT2440 株の派生株 SMDBS 株を,モデル受容菌として *P. fluorescens* Pf0-1 株,*P. putida* PpY101 株，*P. resinovorans* CA10dm4 株の 3 菌株を用いて行った．また，静岡県浜松市にある佐鳴湖から採取した湖水を孔径 0.1 μm のメンブレンフィルターでろ過したものをモデル環境水とした．佐鳴湖水に供与菌（10^6 CFU/mL）と受容菌（10^8 CFU/mL）を接種した後 30℃で静置し，経時的に試料を採取して，供与菌・受容菌・接合完了体を計数した．また，プラスミドが宿主に与える負荷（コスト）を評価するため，プラスミド保持株と非保持株を液体栄養培地内で共存させ，各菌体数の変動を調べる competition assay を行った．その際，プラスミドの有無による各菌株の増殖速度の差を，プラスミドが宿主に与えるコストと定義して算出した．
【結果と考察】モデル環境中における接合完了体数は，実験開始後 1 日目では PpY101(pBP136::*gfp*) 株，CA10dm4(pBP136::*gfp*) 株，Pf0-1(pBP136::*gfp*) 株の順に多く，15 日間のモニタリング終了後には CA10dm4(pBP136::*gfp*) 株，Pf0-1(pBP136::*gfp*) 株，PpY101(pBP136::*gfp*) 株の順に多くなる傾向が観察された．このことから,プラスミドがある環境に定着するには，供与菌と受容菌の組み合わせが重要であることが示唆された．また competition assay の結果，Pf0-1 株，CA10dm4 株を宿主とした場合には，プラスミド非保持株が優占化した一方，PpY101 株を宿主とした場合にはプラスミド保持株が優占化した．このことから，PpY101 株は，pBP136::*gfp* によるコストを軽減する可能性が示唆された．現在，グラム陽性・陰性細菌を含む，異なる 38 種類の菌株を受容菌候補株として用い，好気条件下における pBP136 の伝達頻度の違いを比較している．

plasmid, conjugative transfer, host range

講演番号：2A36p03
講演日時、会場：3 月 27 日 14:22～ A 校舎 36 会場

Lactobacillus paracasei における脱アセチル化酵素サーチュインの機能解析
Function analysis of deacetylase sirtuin in *Lactobacillus paracasei*
○新 穂高[1]、郭 宣羚[1]、田中 尚人[2]、岡田 早苗[2]、遠藤 明仁[1]、宮地 竜郎[1]、中川 純一[1] ([1]東農業大院・生産、[2]東農大・菌株)
○Hotaka Atarashi[1], Sherling Kok[1], Naoto Tanaka[2], Sanae Okada[2], Akihito Endou[1], Tatsuro Miyazi[1], Junichi Nakagawa[1] ([1]Tokyo Univ. Agr., [2]NRIC, Tokyo Univ. Agr)

【目的】
サーチュインは真核生物において環境ストレスやカロリー制限などに対して応答反応を引き起こす脱アセチル化酵素である。大腸菌においてはタンパク質のアセチル化が過酸化水素や熱に対する耐性能に影響を与えることが知られているが、プロバイオティクスとして注目される乳酸菌でのサーチュインの役割は未だ不明である。そこで、脱アセチル化酵素サーチュインの標的タンパク質の探索および細胞内におけるサーチュインタンパク質の局在解析といった観点から、乳酸菌におけるサーチュインの役割を解明することを目的とした。
【方法および結果】。
実験には *Lactobacillus paracasei* BL23 株を用いた。サーチュインは NAD^+ 依存性の脱アセチル化酵素であり、その活性を賦活および阻害することにより、細胞内タンパク質のアセチル化レベルが変化することが考えられる。そこで、サーチュイン活性の阻害剤としてニコチンアミド (NAM) を用い、培地に NAM を 50 mM 添加した。アセチル化タンパク質の検出は Acetylated-Lysine Antibody によるウエスタンブロット法により行った。更に、サーチュインタンパク質の菌体内における局在を解析するため、*L. paracasei* NRIC0644 株由来の抗サーチュイン抗体を用いて免疫蛍光染色を行った。*L. paracasei* BL23 をパラホルムアルデヒドおよびメタノールで固定し、Lysozyme を用いて透過処理を行い、抗サーチュイン抗体および Alexa Fluor 488 Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) 抗体による抗原抗体反応を行った。また、核様体は Hoechst 33346 を用いて染色し、共焦点顕微鏡による観察を行った。
【結果および考察】
生細胞に対して NAM を作用させた *in vivo* 実験において、アセチル化が亢進する 28 kDa のタンパク質を検出した。さらに、*in vitro* では、細胞抽出タンパク質を基質にして過剰な組換えサーチュインタンパク質と NAD^+ 存在下で、脱アセチル化される 28 kDa のタンパク質を確認した。以上の結果を合わせると、この 28 kDa のアセチル化タンパク質はサーチュインによって脱アセチル化をうける標的と考えている。また、*L. paracasei* BL23 の菌体中のサーチュインタンパク質は分裂細胞における細胞隔壁に局在することが観察された。このことより、*L. paracasei* におけるサーチュインの役割として細胞分裂への関与が考えられた。

Sirtuin, Acetylated proteins, Intracellular localization

講演番号：2A36p04
講演日時、会場：3 月 27 日 14:33～ A 校舎 36 会場

超好熱菌 *Thermococcus kodakarensis* におけるポリアミンの細胞内局在及び濃度効果
Localization and concentration effect of polyamines in *Thermococcus kodakarensis*
○井上 貴央、中西 千穂、岡田 和真、藤原 伸介（関西学院大院理工）
○Takahiro Inoue, Chiho Nakanishi, Kazuma Okada, Shinsuke Fujiwara (Kwanseigakuin Univ.)

【研究目的】ポリアミンは様々な生命現象に関与している低分子の塩基性物質である。好熱菌では長鎖分岐型構造の N^4-ビスアミノプロピルスペルミジン[3(3)(3)4]が見出されており、これらは高温での核酸の構造維持に関与していると考えられている。超好熱菌 *Thermococcus kodakarensis* は培養温度の上昇に伴い、分岐型ポリアミンの割合は上昇する。このため分岐型ポリアミンは、転写や翻訳など遺伝子の発現制御にも関わっていると考えられる。本研究では、分岐型ポリアミンの機能解明を目指し、細胞内の局在性と遺伝子発現に及ぼす影響を検証した。
【実験方法】DBP1 株（*pyrF*, *bpsA*）は超好熱菌 *T. kodakarensis* の KU216 株（*pyrF*）から分岐鎖ポリアミン合成酵素遺伝子 *bpsA* を欠損させて構築された。今回、DBP1 株（*pyrF*, *bpsA*）からキチナーゼ遺伝子を欠損させた DBP2 株（*pyrF*, *chiA*, *bpsA*）を構築した。KC2 株（*pyrF*, *chiA*）、DBP2 株の培養温度変化に伴うポリアミン組成変化を調べるとともに、これら 2 株から、S30 画分、S100（細胞質）画分、リボソーム画分を抽出し、各画分のポリアミン組成の培養温度変化に伴う変動を調べた。S30 画分を用いた無細胞翻訳系で異なる温度でのキチナーゼ合成活性を評価した。また、高温下で N^4-ビスアミノプロピルスペルミジンが転写因子と DNA との結合性に与える影響を *T. kodokarensis* の硫黄代謝に関わる転写因子 *Tk*-SurR を用いたゲルシフトアッセイに添加することで検証した。
【結果と考察】DBP2 株は、培養温度が上がるにつれ、対数増殖期に移るまでの誘導期が長くなり、最終菌体収量、及び比増殖速度は低下した。85℃で増殖した DBP2 株細胞には N^4-ビスアミノプロピルスペルミジンは蓄積せず、高濃度のスペルミジン[34]が蓄積した。DBP2 株では長い誘導期の間にスペルミジンが蓄積し、N^4-ビスアミノプロピルスペルミジンの機能を代替したと考えられる。また、KC2 株で細胞質画分、及びリボソーム画分当たりの N^4-ビスアミノプロピルスペルミジンの割合は、ともに 90℃で最大になった。これは、高温下で分岐型ポリアミンがリボソームを安定化するとともに、細胞質中では何らかの機能（遺伝子の発現調節等）を有することを示唆する。実際、KC2 株を 90℃で培養した細胞から取得した S30 画分は、高温で高い翻訳活性が得られた。また、N^4-ビスアミノプロピルスペルミジンは、高温下での *Tk*-SurR と DNA の結合を促進させた。この効果は、過剰量のスペルミジンを添加しても、確認できなかった。つまり、N^4-ビスアミノプロピルスペルミジンが転写レベルで遺伝子発現を調節している可能性を強く示唆する。

Thermococcus kodakarensis, polyamine, hyperthermophile

講演番号：2A36p05
講演日時、会場：3 月 27 日 14:44～ A 校舎 36 会場

根粒菌の鉄・硫黄タンパク質生合成促進因子が植物相互作用に及ぼす影響

Physiological roles of the novel rhizobial gene in iron-sulfur cluster biogenesis and symbiotic nitrogen fixation

○三井 久幸（東北大院生命科）
○Hisayuki Mitsui (Tohoku Univ.)

根粒菌 *Sinorhizobium meliloti* はアルファルファ（マメ科植物）に根粒形成を誘導し、その細胞内で窒素固定を営む α-プロテオバクテリアである。*S. meliloti* が有する RpoH (σ^{32}) グループのシグマ因子 RpoH1 が共生窒素固定に必須の役割を果たすことに注目して、そのレギュロンの解析を行ってきた。その過程で、126 アミノ酸からなる機能不明タンパク質をコードする SMc00302 遺伝子に着目した。当遺伝子は *S. meliloti* ゲノム上で *sufBCDS* 相同遺伝子と *sufA* 相同遺伝子の間に位置する。上流（*sufS* 内部）の RpoH1 プロモーター直下からの転写がヒートショック特異的に誘導されることを 5′ RACE 解析により確認した。*suf* 遺伝子群は、鉄・硫黄（Fe/S）クラスター形成装置（SUF マシナリー）をコードしており、原核細胞・真核細胞両方に広く保存されている。他方 SMc00302 についても、大腸菌・シュードモナスの PaaD、ヒト FAM96B、シロイヌナズナ HCF101 等に存在する DUF59 様配列を有し、Fe/S タンパク質代謝への関与が予想されることから、本研究で *sufT* と命名した。当遺伝子の破壊（欠失変異）株は、野生株と比べて鉄キレーターdipyridyl への感受性が高まり、また、最小培地での増殖速度が顕著に低下していた。更に、6-ホスホグルコン酸脱水酵素、アコニターゼ、グルタミン酸合成酵素といった Fe/S 酵素の細胞内活性が野生株と比べて低下する一方、リンゴ酸脱水素酵素（非 Fe/S 酵素）は影響を受けないことが判明した。以上より、SufT は SUF マシナリーを介する Fe/S タンパク質生合成経路の効率化に関与し、この役割が共生成立過程では重要な意義を持つと推定した。次に、最小培地での増殖速度を指標にして *sufT* 変異株のサプレッサー変異株を分離し、そのゲノム解析を行った。その結果、解析 3 株いずれにおいても、包括的 Fe 制御因子をコードする *rirA* の ORF 内に欠失変異が確認された。そこで、改めて *rirA* を破壊して *sufT rirA* 二重欠失変異株を作製し、表現型解析に供した。この二重変異株は、最小培地において野生株と *sufT* 変異株の中間的な増殖速度を示し、また、野生株と同レベルの 6-ホスホグルコン酸脱水酵素・アコニターゼ各活性、および共生窒素固定能を示した。以上より、*sufT* 変異株の表現型は RirA の欠損が引き起こす細胞内 Fe レベルの上昇によってサプレスされると判断した。このことは、いまだ解明されていない SUF マシナリーへの Fe の供給機構に対する SufT の機能的関与を示唆するものである。

rhizobium, symbiosis, iron-sulfur cluster

講演番号：2A36p06
講演日時、会場：3 月 27 日 15:05～ A 校舎 36 会場

自然突然変異法で得られた抗菌性界面活性剤耐性大腸菌における変異部位の決定とその働きに関する研究

Characterization of mutation regions in spontaneously isolated antibacterial-surfactant resistant strains

○御厨 真幸[1]、中田 訓浩[2]、松村 吉信[1,2]([1]関西大・化学生命工、[2]関西大・ORDIST)
○Masayuki MIKURIYA[1], Kunihiro NAKATA[2], Yoshinobu MATSUMURA[1,2] ([1]Department of Life Science & Biotechnology, Kansai Univ., [2]ORDIST, Kansai Univ.)

〔目的〕公衆衛生や清潔志向への関心の高まりから、高い安全性と抗菌力をあわせもった抗菌剤の開発が望まれている。一方で、抗菌剤の需要の増加に伴い、抗菌剤に対する耐性菌の出現も懸念されている。このため、耐性菌の効果的な殺菌法の確立や耐性菌の出現を軽減する抗菌法の開発が望まれ、どのような過程で耐性菌が出現するのかを検証するとともに、抗菌剤に対する耐性菌の耐性機構を網羅的に解明する必要がある。これまで、抗菌性陽イオン性界面活性剤、臭化セチルトリメチルアンモニウム塩(CTAB)に耐性を示す自然突然変異株 *Escherichia coli* OW66 株を単離し、その親株である OW６株と比較したところ、スーパーオキシドストレス耐性に関わる遺伝子に変異が生じ、スーパーオキシドストレス耐性に変化していた。そこで新たに OW6 株を親株として耐性度の異なる複数の CTAB 耐性自然突然変異株を取得し、これら新規 CTAB 耐性株におけるストレス耐性能と CTAB 処理における活性酸素発生量の比較を行うとともに、次世代シーケンサーによる変異部位の同定を試みた。
〔方法〕CTAB 耐性自然突然変異株は L 培地または M9 培地に適当な濃度の CTAB を添加して培養した細胞より選択した。また、より高い耐性株の取得にはさらに高濃度の CTAB 培地で培養した細胞より選択した。最小発育阻止濃度(MIC)の測定は各薬剤を含む培地で 24 時間培養後、目視により増殖の有無で確認した。増殖が確認できない最少濃度を MIC とした。細胞内活性酸素の発生確認は活性酸素と特異的に反応する蛍光試薬を用い、蛍光顕微鏡観察法およびフローサイトメーター分析法で調査した。自然突然変異株の変異部位同定は、次世代シーケンサーMiSeq(illumine 社)および Ion PGM(life technologies 社)を用いた。
〔結果〕今回取得した CTAB 耐性自然突然変異株は、終濃度 540 μM CTAB を含む LB 培地と終濃度 34 μM CTAB を含む M9 培地から単離され、同時に、途中段階で単離された低程度および中程度耐性株も確認された。各耐性株は、CTAB 耐性能の向上に伴い、アンピシリン等のその他の薬剤に対する耐性能も獲得していた。CTAB 処理による活性酸素の発生を L シリーズ株と OW６株で調査した結果、CTAB 耐性能の向上とともに O_2^- や H_2O_2 の発生が減少していた。これら新規耐性株の結果や CTAB 耐性 OW66 株で得られている結果から、大腸菌細胞の CTAB 耐性化に活性酸素の消去能力の向上や発生能の低下が重要であることが示された。さらに、新規耐性株の変異部位を調査した結果、OW66 株で観察された *soxR* での変異とは異なり、*marR* 領域に変異が見られた。

antibacterial agents, registant mutant, reactive oxygen species

講演番号：2A36p07
講演日時、会場：3 月 27 日 15:16～ A 校舎 36 会場

Achromobacter denitrificans YD35 株の一酸化窒素耐性機構の解析

Novel mechanism tolerating nitric oxide in *Achromobacter denitrificans* YD35

○長岡 亜依[1]、平林 美保[1]、土肥 裕希[2]、高谷 直樹[1] ([1]筑波大院生命環境、[2]岡山理大工)
○ Ai NAGAOKA[1], Miho HIRABAYASHI[1], Yuki DOI[2], Naoki TAKAYA[1] ([1]Tsukuba Univ., [2]Okayama Univ. of Science)

活性酸素種（RNS）のひとつである一酸化窒素（NO）は、強い酸化力と変異原性を有し、RNS と同様に生体に対して強い細胞毒性を示す。高等動物への感染を成立させるためには、細菌は宿主免疫系が生産する RNS による攻撃の防御と回避が必須である。したがって、細菌の RNS 防御機構を解明することは、病原菌の感染の理解と新たな抗菌剤を開発する上で重要である。本研究では、自然界から単離された極めて強い NO 耐性の生育を示すグラム陰性細菌 *Achromobacter denitrificans* YD35 株（YD35 株）を研究対象としてその NO 耐性機構を解析し、細菌の新たな NO 耐性機構を明らかにすることを目的とした。

YD35 株のトランスポゾン挿入株ライブラリーを作製し、25 株の NO 感受性株を取得した。各種酸化ストレスに対するこれらの生育の感受性の程度は様々であったことから、変異遺伝子には RNS 特異的な耐性に関わるものと、酸化ストレス全般に対する耐性に関わるものがあると予想された。NO 感受性株のトランスポゾン挿入部位を特定したところ、5 種類の遺伝子が見出された。見出された遺伝子には、細菌の ROS および RNS ストレスへの応答に寄与する既知のラジカル解毒系タンパク質をコードする遺伝子は見出されなかった。得られた遺伝子の中から、メチオニンシンターゼをコードする *metH* に着目して詳細な解析を行った。*metH* 変異株の生育速度は NO 存在下で著しく低下したが、NO とともにメチオニンを添加すると生育の感受性の回復がみられた。このことから、*metH* は NO 存在下でのメチオニンの生合成に必須であることが示された。また、NO に応答して *metH* の転写が活性化することも明らかとなった。本研究は、細菌によるメチオニンの生合成と NO 耐性機構との関連性を示した初めての例である。本研究で用いたスクリーニング法は新規の NO 耐性機構の解明に有効であり、病原菌の感染機構の解明にも貢献すると期待される。

nitric oxide, pathogen, stress response

講演番号：2A36p08
講演日時、会場：3 月 27 日 15:27～ A 校舎 36 会場

大腸菌細胞における、キヌレニン抗体に反応する、疎水性の高いヒト SOD1 分子種の検出

Bacterially produced human SOD1 forms hydrophobic species that can be immunologically detected by anti-kynurenine antibody.

○黒川 洋一、桜田 真一、松井 義隆（福井県大生物資源）
○Youichi Kurokawa, Shin'ichi Sakurada, Yoshitaka Matsui (Fukui Pref. Univ.)

【背景と目的】SOD1 変異体は神経疾患 fALS の原因物質として知られ、その酸化を伴う異常化が、本病気の発症に関わるとされているが、その詳細なメカニズムは不分明な点が多い。私どもはこれまでに、大腸菌細胞におけるヒト由来 fALS SOD1 の可溶化発現系ならびに精製系を確立してきた。本研究では、病気の発症の原因と目される、分子表面の Trp 残基が酸化された分子種を、大腸菌細胞抽出液に見出すことができたので、その単離・精製を行って、異常蛋白質としての性質を調べることにした。
【方法と結果】ヒト SOD1 野生型あるいは点変異体を、*Rosetta-gami* 細胞において発現させ、細胞抽出液を各種クロマトグラフィーにて精製したところ、疎水性樹脂を用いた場合に、40%硫安存在下で溶出する疎水性の低い分子種、および 20%で溶出する疎水性の高い分子種とが存在した。これらの分子種は、SDS-PAGE および CBB 染色に供すると、前者は SOD1 モノマーに相当すると考えられる約 16kDa、後者は約 32kDa のダイマーと考えられるバンドとして検出され、抗 SOD1 抗体を用いたイムノブロットでは共に陽性のシグナルを与えた。興味あることに、Trp の酸化型であるキヌレニン抗体に対しては前者は反応せず、後者のみが特異的に検出された。分子表面の Cys 残基を Ala または Cys に改変した変異体 SOD1 変異体においても、キヌレニン抗体で検出される分子種を同様に精製することができたので、この分子種はジスルフィド結合以外の共有結合を介して形成されると考えられた。また、これらの分子種を、蛋白質の変性のプローブとなる蛍光分子存在下で一定時間インキュベートした後の蛍光スペクトルは、分子種によって大幅に異なったことから、これらの異常蛋白質性の違いを反映すると考えられた。当日は、詳細について報告する。

SOD1, kyunurenin, unfolded protein

講演番号：2A36p09
講演日時、会場：3 月 27 日 15:38～ A 校舎 36 会場

好気培養がカロテノイド生産乳酸菌のイソプレノイド生合成経路に与える影響

Effect of aerobic culture condition on isoprenoid biosynthesis pathway in carotenoid-producing lactic acid bacteria

○萩 達朗、小林 美穂、野村 将（農研機構・畜草研）
○Tatsuro HAGI, Miho KOBAYASHI, Masaru NOMURA (NILGS)

【目的】カロテノイドを生産する乳酸菌において、当該カロテノイドが酸化ストレス耐性の向上に関与することと、カロテノイド生産が酸化ストレスによって誘導されることがわかってきた [1)]。一般に、ストレス耐性機構に関わる因子はストレスによって誘導されることが多いものの、ストレス応答に関する乳酸菌のカロテノイド生合成経路の変化について、その詳細は明らかでない。本研究では、カロテノイド生産乳酸菌 *Enterococcus gilvus* において、酸化ストレス処理後のイソプレノイド生合成経路（カロテノイド生合成遺伝子 *crtNM* を含め、その上流に位置するメバロン酸およびイソプレン分子生合成遺伝子）の遺伝子発現量変化を観察した。
【方法】前培養した *E. gilvus* を、200 mL の GM17 培地 (0.5%グルコース含有) を含む 500 mL 三角フラスコに接種し、30℃、4 時間、静置培養した（嫌気）。その後、酸化ストレス処理として、フラスコを振とう培養し（好気）、30℃、30 分間培養した。各培養条件で回収した菌体について、逆転写定量 PCR でイソプレノイド生合成遺伝子群の遺伝子発現量を測定した。また、酸化ストレス応答のコントロールとして、superoxide dismutase (*sod*) および NADH oxidase (*nox*) 遺伝子の発現量も併せて測定した。
【結果】*E. gilvus* を好気培養することで、嫌気培養時に比べて *sod* および *nox* 遺伝子の発現量が大幅に上昇し、好気培養が菌体に対して酸化ストレスを与えることが確認された。このとき、カロテノイド生合成遺伝子 *crtNM* の遺伝子発現量も上昇し、さらに、hydroxymethylglutaryl-CoA reductase を除くメバロン酸生合成遺伝子およびイソプレン分子生合成遺伝子の発現量増加が認められた。この結果、*E. gilvus* において、酸化ストレスによって *crtNM* 遺伝子だけでなく、その前駆体の生合成遺伝子群も誘導されることが明らかとなった。

1) Hagi et al., 2014. *FEMS Microbiology Letters*, **350(2):**223-230.

lactic acid bacteria, carotenoid, stress

講演番号：2A36p10
講演日時、会場：3 月 27 日 15:49～ A 校舎 36 会場

エタノール生産細菌 Zymomonas mobilis 呼吸鎖の塩ストレス耐性への関与に関する研究

Study of involvement in salt tolerance to the respiratory chain of Zymomonas mobilis of ethanol-producing bacterium

○林 毅、村田 奈己、関村 光平、下郡 光貴、杉田 翔（別府大学食栄科）
○Takeshi HAYASHI, Nami MURATA, Kohei SEKIMURA, Mitsuki SHIMOGORI, Sho SUGUTA (Beppu Univ.)

【目的】これまでエタノール発酵菌 *Z. mobilis* において呼吸欠損株（RDM 株）の単離に初めて成功した。この呼吸欠損株は好気条件や高温条件において増殖能とエタノール生産性が著しく上昇したことから、*Z. mobilis* において呼吸鎖は好気や高温条件では自身の増殖の阻害因子として働くことが明らかとなった。この表現型を見る限り *Z. mobilis* にとって呼吸鎖は一見不要なものに思われるが、進化の過程で呼吸機能が淘汰されていないことから、この呼吸鎖には呼吸以外の別の生理機能があるのではないかと予想した。従って本研究では *Z. mobilis* 呼吸鎖の新規な生理機能の探索を行った。
【方法・結果】初めに *Z. mobilis* の呼吸鎖は何らかのストレス耐性に関与しているのではないかと予想し、浸透圧、高温、冷凍、有機溶媒など、様々なストレス存在下において野生株（wt 株）と RDM 株の増殖能の比較を行った。その結果すべての RDM 株において、浸透圧ストレス因子である塩化ナトリウムおよび塩化カリウムに対する耐性が低下していることが明らかとなった。一方で同因子として非イオン性のエチレングリコールにおいては、増殖能に変化は見られなかった。さらに呼吸鎖構成酵素（NADH デヒドロゲナーゼ遺伝子（*ndh*）もしくはシトクロム *bd* 型ユビキノール酸化酵素（*cydAB*））を用いて RDM 株の呼吸能の機能を補完したところ、各塩ストレス下における増殖能が wt 株と同等にまで回復した。またこれら呼吸鎖構成酵素遺伝子を wt 株に導入すると、塩ストレス下において wt 株と比べて 2 倍以上の細胞量を示したことから、呼吸鎖酵素の高発現により塩耐性株を創出できる可能性が示唆された。さらに呼吸鎖の補完により細胞形態においても改善が見られた。すなわち RDM 株は塩存在下では細胞分裂が阻害されて細胞が異常に伸びたものが多く観察されたが、呼吸鎖を補完すると異常形態の細胞は減っていた。以上の結果から、呼吸鎖が塩耐性に関与することが示唆された。
　次に呼吸鎖が塩耐性を付与するメカニズムの解析を行った。先ず、細胞内の塩化ナトリウム濃度を測定した。その結果、wt 株と wt-*ndh* 株（wt 株に *ndh* を導入して増殖能が大幅に増加した株）間で細胞内塩化ナトリウム濃度に違いが見られなかったことから、呼吸鎖が Na^+等の塩排出ポンプの機能を有する可能性は否定された。次に *Z. mobilis* は浸透圧ストレス下において適合溶質としてソルビトールを蓄積させるという報告がある。従って細胞内ソルビトール量を比較したところ、wt-*ndh* 株は wt 株よりも 1.25 倍のソルビトール量の増加がみられた。しかしながら、濃度の点からソルビトールが適合溶質として主として塩耐性に寄与しているとは考え難かった。現在、代謝の面から塩耐性メカニズムを解析するためにメタボローム解析を行っているので、合わせて報告したい。

Zymomonas mobilis, respiratory chain, salt tolerance

講演番号：2A36p11
講演日時、会場：3 月 27 日 16:10～ A 校舎 36 会場

希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* の運動性胞子の走化性制御メカニズムの解析

Analysis of the regulatory mechanism of chemotaxis in the *Actinoplanes missouriensis* zoospore.

○木村 知宏[1]、手塚 武揚[1]、中村 周吾[1]、奥 寛雅[2]、大西 康夫[1] ([1]東大院農生科・応生工、[2]群馬大院理工学府・理工)
○ Tomohiro KIMURA[1], Takeaki TEZUKA[1], Shugo NAKAMURA[1], Hiromasa OKU[2], Yasuo OHNISHI[1] ([1]Univ. of Tokyo, [2]Gunma Univ.)

【背景・目的】誘引物質や忌避物質の濃度勾配を感知して行う方向性を持った運動は走化性と呼ばれ、大腸菌をモデルとしてこれまでに多くの研究がなされてきた。*Actinoplanes missouriensis* は栄養飢餓条件下でべん毛をもった多数の運動性胞子を内包する胞子嚢を形成する希少放線菌であり、外界からのシグナルを感知すると胞子嚢が開裂し、胞子を放出する。直径 1.5 μm の胞子は、最大 400 μm/sec という驚異的な速度で遊走し、様々な化合物に対して走化性を示す一方、栄養生長に適した環境に到達すると遊走をやめ、発芽する。本菌のゲノム中には 3 つの走化性遺伝子クラスターが見出されている。本研究では、極めて高速で遊走する *A. missouriensis* の胞子が走化性を発揮するメカニズムの解明を目的として実験を行った。

【方法・結果】走化性を定量的に評価するアッセイ系の構築と、胞子の運動軌道の解析を行った。

本菌の運動性胞子は低濃度の低融点アガロース中でも遊走できなかったため、走化性アッセイに通常用いるソフトアガーアッセイは実施できなかった。そこで、遊走胞子が水溶液中の誘引物質の濃度勾配に従って運動している様子を観察するために Millicell μ-Migration Assay Kit (メルクミリポア社) を使用した。スライドグラス大のプラスチック片の中に菌体を導入する容量 8 μL の流路と、その上下に容量 42 μL ずつのバッファーを入れるスペースがあるこのシステムでは、濃度の異なる溶液を上下のスペースに充填することで流路中に濃度勾配を形成、維持可能である。誘引物質と報告されているガラクツロン酸を用い、濃度勾配に従って流路上下のバッファーを入れるスペースに移動してきた胞子を回収し、CFU に基づいて走化性を数値化した。その結果、野生株の胞子はガラクツロン酸を充填した側と充填しなかった側を比較すると約 3 倍の走化性を示した。一方、転写解析の結果から機能していると考えられる走化性遺伝子クラスター1 と 2 の二重破壊株の胞子は走化性を示さなかった。

また、走化性を示している際の運動軌道を観察するために、視野内の運動する物体を自動追尾できるトラッキング顕微鏡を用いて胞子ひとつひとつの軌道の観察を行った。視野外に誘引物質を置いて観察を行った場合、対照実験と比較して胞子の軌跡の方向ベクトルが誘引物質の方向へ偏ったため、観察条件下で走化性を発揮していると考えられた。この条件での軌跡を描き出しても、大腸菌で報告されている方向転換（タンブリング）は見られなかった。このことから、*A. missouriensis* の胞子は走化性を発揮する際に大腸菌とは異なる方法でべん毛による運動の制御を行っていると示唆された。

zoospore, chemotaxis, High-speed tracking system

講演番号：2A36p12
講演日時、会場：3 月 27 日 16:21～ A 校舎 36 会場

希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* の遊走胞子べん毛の回転運動の解析

Study on the rotation of zoospore flagellum of the rare actinomycete *Actinoplanes missouriensis*

手塚 武揚[2]、○堺 隆之[1]、曽和 義幸[3]、大西 康夫[2] ([1]東大農・生命化学工学、[2]東大院農生科・応生工、[3]法政大・生命科学部)
Takeaki TEZUKA[2], ○Takayuki SAKAI[1], Yoshiyuki SOWA[3], Yasuo OHNISHI[2] ([1]Facul. Agric., Univ. Tokyo, [2]Grad. of Agric. and Life Sciences, Univ. Tokyo, [3]Dept. Frontier Biosci., Hosei Univ.)

【背景・目的】希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* は液体中を超高速で運動する遊走胞子を形成する。その速度は環境により変化し、特定の条件では 400 μm/s もの超高速で運動する一方、栄養豊富な条件では運動を停止して発芽する。また、*A. missouriensis* の遊走胞子は走化性をもつと報告されているが、我々のグループのこれまでの解析から *A. missouriensis* の遊走胞子は大腸菌等で見られる方向転換（タンブリング）を行わないことが示唆された。*A. missouriensis* の遊走胞子は外部環境の変化を感知して遊走速度を変化させることで走化性を制御していると考えられるが、その分子メカニズムは全く未知である。本研究では、遊走胞子の運動制御メカニズムを解明するため、遊走胞子がもつべん毛の回転運動に注目して実験を行った。具体的には、①遊泳速度が変わる環境条件におけるべん毛の回転運動の解析、②走化性を示す環境条件におけるべん毛の回転運動の解析、③400 μm/s もの超高速度を生み出すべん毛モーターの性能評価、の 3 つに取り組むこととした。
【方法】べん毛の回転運動はテザードセル法及びビーズアッセイ法を用いて解析した。テザードセル法はべん毛をカバーガラス上に固定した細胞の回転を計測する手法である。一方ビーズアッセイ法は細胞をカバーガラス上に固定し、べん毛に直径 1 μm（あるいはそれ以下）の極小ビーズを付着させることでべん毛運動に伴うビーズの回転を計測する手法である。回転運動の検出には、細胞またはビーズの位相差像を高速度カメラまたは 4 分割フォトダイオードに結像させ、その重心位置をサブミリ秒・ナノメートルの精度で計測する手法を用いた。
【結果】テザードセル法について条件検討を行い、*A. missouriensis* の遊走胞子のべん毛がシリコナイズされたカバーガラス上によく付着することを見出した。さらにモーター回転計測により DW 中での回転数が約 20 Hz であることが示された。この回転数は大腸菌の約 2 倍の値である。現在このテザードセル法を用いて遊泳速度が変わる環境条件や走化性を示す環境条件において *A. missouriensis* の遊走胞子のべん毛の回転運動がどのように変化するかを解析している。一方、ビーズアッセイ法の条件検討も進めており、べん毛にかかる負荷を様々に変化させることで *A. missouriensis* がもつべん毛モーターの性能を明らかにしようとしている。以上の結果より、*A. missouriensis* の遊走胞子べん毛の回転運動の特徴について考察したい。

Actinoplanes missouriensis, flagellar rotation, tethered cell assay

講演番号：2A36p13
講演日時、会場：3 月 27 日 16:32～ A 校舎 36 会場

Stenotrophomonas maltophilia のフェノール類に対する走性及びその測定における高感度化の検討
Development of synthetic medium for *Stenotrophomonas maltophilia* and improved sensitivity of chemotaxis measurement

○渡邉 祐子、荷方 稔之、渡辺 大介、中屋敷 凌、小野寺 唯、柿井 一男（宇都宮大・工）
○Yuko WATANABE, Toshiyuki NIKATA, Daisuke WATANABE, Ryou NAKAYASHIKI, Yui ONODERA, Kazuo KAKII (Utsunomiya Univ.)

【目的】*Stenotrophomonas maltophilia* は *p*-クロロフェノールや内分泌攪乱物質の疑いのあるビスフェノール A をはじめとする幅広いフェノール類に正の走性を示す。本細菌は 12 の走化性センサー様遺伝子を有することが推定され、フェノール類のセンシングに関与する走化性センサー遺伝子を同定することで効率的なバイオレメディエーションへの応用が期待できる。これまで *S. maltophilia* は合成培地である MOPS-Glucose 培地にポリペプトンを加えて培養を行っていたが，ポリペプトンを含まない合成培地を新規調製し本培養に用いることで，より高感度な走化性測定条件を検討したので報告する。
【方法】走化性は以下の方法で測定した。1mM フェノール類を含む 0.5%アガロース溶液を充填・固化したキャピラリーを 40mM MOPS(pH7.0), 5mM $MgCl_2$ 溶液で洗浄した菌体懸濁液に挿入し、細菌の運動の様子を倒立位相差顕微鏡で観察・録画した。そこから静止画をコンピュータに取り込み二値化した後，キャピラリー開口部付近の菌体を計数して菌体濁度当たりの集積初速度（比集積初速度）で評価した。
【結果】*S. maltophilia* にはメチオニンおよびシステインを要求する株の存在が報告されている。これらのアミノ酸をポリペプトンを含まない MOPS-Glucose 培地に添加して培養したが増殖は認められなかった。そこで 20 種類のアミノ酸をもとに，本細菌の増殖に必要な組み合わせを探索したところ，メチオニン，セリン，バリンの 3 種のアミノ酸を添加することにより，ポリペプトンを含む MOPS-Glucose 培地と同程度に増殖し，かつ高い運動性を保持した菌体を与える合成培地を調製することが出来た。この合成培地を用いて培養した *S. maltophilia* の *p*-クロロフェノールに対する走性（比集積初速度 8.4cells/sec･OD660）は，ポリペプトンを含む従来の培地を用いた場合（比集積初速度 4.8cells/sec･OD660）と比べて 75%向上し，感度および再現性の高い測定を行うことが可能となった。現在この培地を用いて培養した菌体で *p*-クロロフェノールやビスフェノール A に対する走性センサー様遺伝子の同定を試みている。

chemotaxis, Stenotrophomonas maltophilia, synthetic medium

講演番号：2A36p14
講演日時、会場：3 月 27 日 16:43～ A 校舎 36 会場

青枯病菌 *Ralstonia solanacearum* のリン酸イオンに対する走性応答
Chemotactic response to phosphate of *Ralstonia solanacearum*.
○寺本 拓也[1]、荷方 稔之[1]、緋田 安希子[2]、奥 正太[2]、柿井 一男[1]、加藤 純一[2] ([1]宇都宮大・工、[2]広島大・院先端物質科学・分子生命機能科学)
○Takuya TERAMOTO[1], Tosiyuki NIKATA[1], Akiko HIDA[2], Shota OKU[2], Kazuo KAKII[1], Junichi KATO[2] ([1]Utsunomiya Univ., [2]Hiroshima Univ.)

【背景・目的】
青枯病菌 *Ralstonia solanacearum* は主にナス科の植物に感染し、導管内にバイオフィルムを形成することで通水性を低下させ、枯死させる植物病原細菌である。この感染には本細菌の走化性が関与している可能性が考えられている。走化性は、細胞膜に存在する膜貫通型の走化性センサータンパク質(MCP)が化学物質と結合することによって発現するため、それらをコードする遺伝子について網羅的な知見を得ることは重要である。本研究ではその一環としてリン酸イオンに対する走性を測定し、走性センサー遺伝子の同定を行った。
【方法】
細菌の走化性は、10mM HEPES(pH7.0)で二回洗浄した菌体の懸濁液に、リン酸イオンを含む 0.2%アガロース溶液を吸引、固化したキャピラリーを挿入し、集積する細菌の様子を倒立位相差顕微鏡で観察、録画した。さらに録画映像から静止画を取り込み、二値化して菌体数を計数し、測定開始直後の菌体数に対する 60 秒後の菌体数の比である Chemotaxis Index(CI)で評価した。
【結果及び考察】
本研究で用いた青枯病菌 *R. solanacearum* Ps29 株は、2mM 以下のリン酸イオンには応答を示さなかったが、6mM を超えるリン酸イオンに対しては正の走性を示した。これは青枯病菌がリン酸イオンの感知に関与する MCP を有していることを意味している。そこでリン酸イオンを感知する走性センサー遺伝子の単離を試みた。*R. solanacearum* GMI1000 株のゲノム情報から推定される 22 の走性センサー遺伝子をもとに複数の走性センサー遺伝子が破壊された多重変異株を作成し、それらのリン酸イオンに対する走性を測定したところ、*mcp16* を新たに破壊した多重変異株において応答が消失した。このことから本遺伝子がリン酸イオンの感知に関与していることが示唆された。しかし *mcp11*, *mcp16* の二重変異株はリン酸イオンに対して走性が残存していたことから、*R. solanacearum* Ps29 株のリン酸イオン走性には複数の MCP が関与していることが考えられた。また Mcp16 のリガンド結合ドメインは、緑膿菌のリン酸イオン走性センサータンパク質 CtpH, CtpL のいずれとも相同性を有しておらず、新規なリン酸イオン走性センサーである可能性がある。

Ralstonia solanacearum, chemotaxis, phosphate

講演番号：2A36p15
講演日時、会場：3 月 27 日 16:54～ A 校舎 36 会場

Studies on inhibitory effects of malic acid on plant infection of *Ralstonia solanacearum*

○ MATTANA TUNCHAI, SHOTA OKU, AKIKO HIDA, TAKAHISA TAJIMA, YUTAKA NAKASHIMADA, JUNICHI KATO (Hiroshima Univ., Grad. Sch. Adv. Sci. Matt.)

Ralstonia solanacearum, the causal agent of bacterial wilt disease, is regarded as one of the world's most destructive plant pathogenic bacterium due to its persistence in soil, wide geographic distribution and unusually broad host range. Previous studies found that chemotaxis is an important trait for the early stage of host invasion, virulence and pathogenic fitness in this pathogen, providing us a new target for disease control.

R. solanacearum strain MAFF106611, the highly virulent strain in tomato, showed positive chemotactic responses toward malic acid, one of tomato root exudates compounds. Our hypothesis is that malic acid may be one of the chemotactic key compounds releasing from plants root. Consequently, there is the possibility that soil amended with malic acid can blind their key chemotaxis signal causing a delay or even suppression the infection. In this study, we evaluated the effect of L- and D-malic acid toward strain MAFF106611 virulence. Interestingly, both malic acid treatments resulted in significantly lower wilt disease in gnotobiotic system of tomato than non-treatment, but the other treatments such as serine, aspartic acid and lactic acid treatment did not show the suppression effect. When directly injected the pathogen into tomato root, same virulent level was observed in both malic acid and non-amendment condition. These results indicated that the inhibition effect of malic acid amendment may be caused by inefficiently motile to host root at the early stage of host-invasion. To clarify whether chemotaxis is mechanism behind this inhibition, non-chemotactic mutant strain, Δ*cheA,* was applied to the system. There were no difference of virulence level between L-malic acid treatment and non-treatment. On the contrary, D-malic acid treatment still showed inhibition effect on wilt disease. This result can be explain by the evident that D-malic acid exhibited suppression effect on twitching motility, which is also required for full virulence in *R. solanacearum*.

In conclusion, the results so far reveal that soil amendment with malic acid is the promising method to suppress bacterial wilt disease at host-invasion stage, since L-malic acid may be able to suppress key chemotaxis, as well as D-malic acid may inhibit twitching motility which both type of motility are reported as important mechanism for pathogenic fitness and full virulence of *R. solanacearum*.

Chemotaxis, *Ralstonia solanacearum*, Bacterial wilt disease

講演番号：2A36p16
講演日時、会場：3 月 27 日 17:15～ A 校舎 36 会場

イネ苗立枯細菌病菌 *Burkholderia plantarii* における三成分制御系 TroK, TroR1, TroR2 によるトロポロン合成制御システム

A sensor kinase (TroK) and two response regulators (TroR1 TroR2) controls production of phytotoxin tropolone in *Burkholderia plantarii*

○三輪 瞬平[1]、吉岡 誠訓[1]、紀平 絵梨[1]、仲曽根 薫[2]、五十嵐 雅之[3]、波多野 和樹[3]、吉川 博文[4,5]、兼崎 友[5]、江口 陽子[1]、内海 龍太郎[1] ([1]近大院農バイオ、[2]近大工、[3]微化研、[4]東京農大応生化バイオ、[5]東京農大ゲノム解析セ)
○ Shunpei MIWA[1], Akinori YOSHIOKA[1], Eri KIHIRA[1], Kaoru NAKASONE[2], Masayuki IGARASHI[3], Kazuki HATANO[3], Hirofumi YOSHIKAWA[4,5], Yuu KANESAKI[5], Yoko EGUCHI[1], Ryutaro UTSUMI[1] ([1]Kinki Univ., [2]Faculty of Engineering Kinki Univ., [3]Inst. Microb. Chem., [4]Tokyo Univ., [5]Tokyo Univ.Genome research center)

[目的]
イネ苗立枯細菌病菌 *Burkholderia plantarii* が産生する植物毒素、トロポロンは七員環構造を有する非ベンゼン芳香化合物である。その誘導体としてヒノキチオールや stipitatic acid などが知られている。これらは抗菌、抗真菌、抗ウイルス、殺虫性等の広範囲な生物学作用が知られている。
このようにトロポロンとトロポロン誘導体は細菌、カビ、ヒノキによって生産される二次代謝産物であるが、その生物学的な作用は広範囲にわたりその生産の真の意味は明らかにされていない。最近、我々はトロポロン産生が *B.plantrii* のゲノム上、隣接して存在するヒスチジンキナーゼ(TroK)、レスポンスレギュレーター(TroR1、TroR2)の 3 成分情報伝達系遺伝子によって制御されている事を見出した。本研究では TroK、TroR1、TroR2 の機能解析をおこなうとともに、それらによって、制御される遺伝子群の解析を行った。
[方法及び結果]
TroK、TroR1、TroR2 のリン酸化がトロポロン生産に及ぼす影響を調べるために、TroK のリン酸化部位である H253、TroR1、TroR2 のリン酸化部位である D52、D46 をアラニンに変異したプラスミドを用い、*TroK*、*TroR2*、*TroR1* 各変異株に対する相補実験を行った。その結果、*TroKH253-A*、*TroR1D52-A*、*TroR2D46-A* 変異プラスミドは、各変異株のトロポロン生産を回復させることはできなかった。これらの結果は、*B. plantarii* のトロポロン生産に、TroKH253 のリン酸化と TroR1D52、TroR2D46 へのリン酸基転移反応が関与していることを示した。
次に TroK、TroR1、TroR2 の His6 融合タンパク質と[γ-^{32}P] ATP を用いた自己リン酸化及び、リン酸基転移実験を行った。その結果 TroK の自己リン酸化と TroK から TroR1、TroR2 の両方へのリン酸基転移が確認された。一方、TroK H253A、TroR1 D52A、TroR2 D46A 変異タンパク質においては自己リン酸化、リン酸基転移能の消失が確認された。これらの結果から *B. plantarii* におけるトロポロン産生には、TroKH253→TroR1D52、TroKH253→TroR2D46 への 3 成分が関与する新しいリン酸化リレーによる制御システムの存在が示唆された。
最後にこれら 3 成分制御によって制御される遺伝子群を明らかにするために、各変異株を用いた RNAseq 解析実験を行った。その結果、TroK-TroR1、TroK-TroR2 制御下の遺伝子群が存在することが明らかになった。

Burkholderia plantarii, Troplone, three component system

講演番号：2A36p17
講演日時、会場：3 月 27 日 17:26～ A 校舎 36 会場

酸応答性ヒスチジンキナーゼセンサー EvgS の活性化と細胞内 pH

Activation of an acid-responding histidine kinase sensor, EvgS, is related to internal pH

○江口 陽子、山中 芽依、内海 龍太郎（近畿大農）
○Yoko EGUCHI, Mei Yamanaka, Ryutaro Utsumi (Kinki Univ.)

[目的] 細菌に広く保存される二成分制御系 (TCS) は、環境の変化をシグナルとして認識し、その情報を菌体内部へと伝えることで環境変化への適応に関わる。シグナルを最初に認識するセンサーは、ヒスチジンキナーゼ活性およびペアとなるレスポンスレギュレーターへのリン酸基転移活性をもち、シグナルを感知するとこれらの酵素活性を活性化あるいは抑制することで情報を伝達する。センサーが複数のシグナルを認識する場合や第三のタンパク質の修飾によって活性が調節される場合も知られているが、これらのシグナルがセンサーのどの領域で認識され、シグナル認識後どのようなメカニズムでセンサーの酵素活性が変化するかはほとんど解明されていない。本研究では大腸菌 TCS EvgS/EvgA 系のセンサー EvgS に着目した。EvgS/EvgA 系は低 pH を認識して活性化し、酸耐性化に関連する遺伝子群の発現を誘導することで菌に酸耐性能を付与する。現在までに、我々は、EvgS による低 pH の認識には EvgS のペリプラズム領域以外に細胞内のリンカー領域（膜貫通領域と二量体化に関わる DHp ドメインの間）も必要であることを主張してきた(1)。そこで、本研究では、リンカー領域と低 pH との関連を検討した。

[方法と結果] リンカー領域と低 pH との関連を調べるために、pH 感受性蛍光タンパク質フルオリン（変異型 GFP) を用いて大腸菌の細胞内 pH (pHi) を測定し(2)、EvgS の活性化条件と比較した。その結果、EvgS が活性化する M9 (pH6 に塩酸で調整) 培地で大腸菌を培養したときに pHi は 7.0 であったのに対し、M9 (pH6 に酢酸で調整) 培地で培養したときには EvgS は活性化せず pHi は 5.9 であった。さらに、M9 (pH5.5 に塩酸で調整) 培地で好気培養したときは EvgS が活性化し pHi は 6.5 であったのに対し、嫌気培養では EvgS は活性化せず pHi は 5.8 であった。以上の結果より、EvgS が低 pH で活性化するには、細胞内外の pH 勾配が必要であることが示唆され、細胞膜を挟んだプロトン勾配（外が高く、内が低い）が実際のシグナルであることが考えられた。このことは、低 pH の認識に EvgS の細胞内のリンカー領域が必要である理由として考えられた。

(1) Eguchi and Utsumi, J Bacteriol., **196**, 3140-3149 (2014).
(2) Morimoto et al, PLoS ONE **6** (5): e19598 (2011).

histidine kinase, acid resistance, EvgS

講演番号：2A36p18
講演日時、会場：3 月 27 日 17:37～ A 校舎 36 会場

Mode of Action of Bacterial Histidine Kinase Inhibitor, Waldiomycin in *Staphylococcus aureus*

○MD FAKHRUZZAMAN[1], Hirokazu Kino[1], Yoichi Inukai[1], Masayuki Igarashi[2], Yoko Eguchi[1], Ryutaro Utsumi[1] ([1]Grad. Sch. of Agric., Kinki Univ., [2]Inst. Microb. Chem.)

The WalK (histidine kinase)/WalR (response regulator) two-component signal transduction system is a master regulatory system for cell wall metabolism and growth. This system is very highly conserved and specific to low G+C Gram-positive bacteria, including a number of important pathogens such as *Stapphylococcus aureus*. The WalKR two-component system (TCS) is essential for the viability of *Staphylococcus aureus*, playing a central role in controlling cell wall metabolism.

Waldiomycin, a new histidine kinase inhibitor, discovered by screening metabolites from actinomycetes (1), belongs to the family of angucycline antibiotics and is structurally related to dioxamycin. WalK inhibitors are likely to show bactericidal effects against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). In this present study, we are investigating the modes of action of waldiomycin in *S. aureus.* The half-maximal inhibitory concentration of waldiomycin against WalK in this bacteria was 10.83 μg/ml and its minimum inhibitory concentration was 8μg/ml against this MRSA.

To establish that waldiomycin exerts an effect on the WalKR system in *S. aureus*, the effect of waldiomycin on in vivo expression of WalR regulon genes was evaluated by qRT-PCR. There are nine genes which potentially belonging to the WalKR regulon that appeared to be involved in *S. aureus* cell wall degradation. We have found that the transcriptions of several cell wall metabolism genes such as *isaA*, *ssaA*, *sceD,* SA2353, and SA2097 were inhibited due to addition of waldiomycin to the *S. aureus* culture and the cells also displayed increased aggregation instead of proper cellular dissemination after division.

To verify whether the positive effect of WalKR levels on hydrolytic activities is associated with increased susceptibility to cell lysis, we tested the effect of a nonionic detergent, Triton X-100, on autolysis of *S. aureus* cells. The cells showed higher resistance to Triton X-100-induced lysis when they were treated with waldiomycin at sub-MIC levels. Waldiomycin-treated cells were also more resistant to lysostaphin-induced lysis, suggesting modifications in cell wall structure. These phenotypes are consistent with those of cells starved for WalKR system as previously reported (2). The findings of our present study suggested that waldiomycin targeted WalK histidine kinase and preferentially inhibited the WalR regulon genes expression to affect both cell wall metabolism and cell division, caused *S. aureus'*cell death.

(1) Igarashi M *et al.* J.Antibiot.66, 459-464 (2013), (2) Dubrac S *et al*. J. Bacteriol.189, 8257-8269 (2007)

histidine kinase inhibitor, waldiomycin, *Staphylococcus aureus*

講演番号：2A37a06
講演日時、会場：3 月 27 日 10:05～ A 校舎 37 会場

Streptomyces coelicolor A(3)2 M145 における内在性 NO の生理的意義の解明

physiolosical roles of endogenously produced NO in S. coelicolor

○小川 翔大、草間 慎一朗、杉浦 遼、伊藤 晋作、矢嶋 俊介、祥雲 弘文、佐々木 康幸（東京農業大学)
○Shota Ogawa, shinichiro Kusama, ryo sugiura, shinsaku ito, shunsuke yajima, hirofumi shoun, yasuyuki sasaki (tokyo university of agriculture)

放線菌 *Streptomyces* 属細菌はグラム陽性の土壌細菌であり、これまでに報告されている放線菌種のうち半数以上を占めている。本菌は、胞子が発芽し生育と共に栄養菌糸 (基底菌糸) が伸長・分岐し、再び胞子を成熟させるといった糸状菌のような複雑なライフサイクルを持ち、かつ結核菌の治療薬として用いられるストレプトマイシンをはじめ、二次代謝産物として様々な天然生理活性物質を生産するといった特徴を有していることから基礎研究、応用研究の両面において、非常に興味深い菌である。

我々の研究グループは、モデル放線菌 *Streptomyces coelicolor* に、有機体窒素から NO を合成する新規窒素代謝経路の存在を明らかとしたことから、二次代謝や形態分化に関与することが示唆された。また本菌のゲノム上に、NO をシグナルとする他菌の二成分制御系（TCS）のホモログを見出した。TCS は、細菌の主要な外的環境応答制御機構であることが知られており、様々な遺伝子の発現をコントロールしている。本二成分制御系と内在性 NO の関連性を検証した結果、自身で生産した NO をシグナルとして受容している事が明らかとなった。

他菌の TCS では複数の遺伝子発現を調節していることが知られていることから、本研究では *S. coelicolor* に見出した NO に関する TCS の制御下遺伝子について 2D-PAGE により検証した結果、複数の遺伝子を制御していることが示唆された。また見出された遺伝子の破壊株の表現型により、それらは二次代謝に関与している事が示唆された。

Streptomyces coelicolor, NO

講演番号：2A37a07
講演日時、会場：3 月 27 日 10:16～ A 校舎 37 会場

放線菌の亜硝酸生産に関する解析
nitrite production of actinobacteria
○本田 紗英、小口 優、伊藤 晋作、矢嶋 俊介、祥雲 弘文、佐々木 康幸（東農大バイオ）
○Sae HONDA, Haruka OGUTI, Shinsaku ITO, Shunsuke YAJIMA, Hirohumi SYOUUN, Yasuyuki SASAKI (Tokyo Univ.of agri.)

放線菌は、胞子が発芽し、基底菌糸を形成、気中菌糸へと進み、分化を繰り返して、また胞子を形成するという、複雑な形態分化をする好気性土壌微生物である。今日までにマイコプラズマ肺炎治療薬である *Streptomyces erythreus* のエリスロマイシンや、抗がん剤である *Streptomyces ardus* のマイトマイシンを初めとする抗生物質や、抗寄生虫薬である *Streptomyces avermitilis* のエバーメクチン、農薬として知られる *Streptomyces kasugaensis* のカスガマイシンなどの工業的に重要な二次代謝産物が発見、実用化されており、非常に有用な菌として位置付けられている。近年、我々の研究チームでは、放線菌 *Streptomyces coelicolor* A3(2) が好気・NO_3^-非添加条件下で、窒素酸化物を生産する、新規窒素代謝経路を確認した。本代謝系により生産される窒素酸化物は、self control factor として機能しており、*S. coelicolor* の二次代謝及び形態分化を制御していることが明らかとなった。NO_2^-生産系は２つの type が確認されている。*S. antibioticus* では glucose 添加により NO_2^-生産が制御されるが、*S. coelicolor* では glucose の影響を受けない。

そこで、本実験では様々な放線菌の NO_2^-生産能おける glucose の影響を検証した。その結果、glucose 添加により NO_2^-生産が抑制される菌株と、glucose の影響を受けない菌株、glucose 添加により NO_2^-生産が促進される菌株、NO_2^-生産を行わない菌の 4 つの系統に分かれることが明らかになった。NO_2^-生産能を複数の異なる属の放線菌に確認し、本代謝系が、放線菌門に広く分布していることが強く示唆された。

更に *S. coelicolor* では、培地中に亜硝酸を強化することによって、抗生物質生産量の向上を誘導したため、複数の放線菌門細菌に対する亜硝酸の添加効果を調べた。
以上について報告する。

streptomyces, nitrite, antibiotics

講演番号：2A37a08
講演日時、会場：3 月 27 日 10:27～ A 校舎 37 会場

Streptomyces coelicolor の新規窒素代謝系の解明

The production pathway of nitrogen oxides in S. coelicolor

○行岡 揺弥、小口 悠、信田 啓介、小林 卓也、伊藤 晋作、矢嶋 俊介、祥雲 弘文、佐々木 康幸（東農大）
○ yuriya YUKIOKA, yuu OGUCHI, keisuke SHIDA, takuya KOBAYASHI, shinsaku ITO, syunsuke YAJIMA, hirohumi SYOUUN, yasuyuki SASAKI (tokyou university of agriculture)

放線菌はグラム陽性菌の土壌細菌であり複雑な形態分化や様々な二次代謝産物で広く知られている。特に *Streptomyces* 属において抗生物質生産が有名であり、その多くを生産している。

我々のチームでは放線菌 *Streptomyces coelicolor* M145 株において新規の窒素代謝系を見つけた。これは生体内の代謝制御に関わっていると考えられ、本代謝により生成される NO がシグナルとして働き、抗生物質生産や形態分化に強く影響を与えていることが示唆された。未だ、NO の生産機構の詳細は不十分であったことから、これを検証した。その結果、本代謝系に関与している硝酸還元酵素が NO の生産に積極的に関与していることが、強く示唆された。

一方、本培養条件下では循環している窒素酸化物はその役割を終えた後、速やかに培地中から消失した。その機構を検証した。aNir は亜硝酸をアンモニアに代謝する。S.coelicolor はゲノム中に本酵素のホモログを有していた。そこで、本酵素の遺伝子の破壊株を作成し、培地中の亜硝酸量の経時的変化を検証した結果、培地中に蓄積する事が明らかとなり、本新規窒素代謝系の成分の一部となることが明らかとなった。以上の窒素酸化物生成機構について報告する。

Streptomyces coelicolor, nitrogen oxides, NO

講演番号：2A37a09
講演日時、会場：3 月 27 日 10:38～ A 校舎 37 会場

超好熱菌 *Thermococcus kodakarensis* のアミノ酸酸化代謝に関与する 2 種のインドールピルビン酸:フェレドキシン酸化還元酵素ホモログの機能解析
Functional analyses of two indolepyruvate:ferredoxin oxidoreductases potentially involved in amino acid oxidation in the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakarensis*
○野原 健太[1]、折田 和泉[1]、中村 聡[1]、今中 忠行[2]、福居 俊昭[1] ([1]東京工業大学、[2]立命館大学)
○Kenta NOHARA[1], Izumi Orita[1], Satoshi Nakamura[1], Tadayuki Imanaka[2], Toshiaki Fukui[1] ([1]Tokyo Tech., [2]Ritsumeikan Univ.)

【目的】　90℃以上の高温環境で生育する超好熱菌はユニークな酵素や代謝経路を有していることに加え、系統解析において根に近傍の系統枝に位置することから興味深い研究対象である。超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* は培地中のアミノ酸をカルボン酸へと酸化することでエネルギーを獲得する。アミノ酸酸化における 2-ケト酸の酸化的脱炭酸反応は 4 種類の 2-ケト酸:フェレドキシン (Fd) 酸化還元酵素 (KOR) ホモログが担っているが、それぞれの役割などの詳細については不明な点が多い。本研究では *T. kodakarensis* が有する KOR ホモログのうち、インドールピルビン酸:Fd 酸化還元酵素 (IOR) に着目し、その機能解析を行った。

【方法】　水素代謝を単純化するために *T. kodakarensis* において水素消費反応を担う細胞質ヒドロゲナーゼ (Hyh) の遺伝子欠失株 (KUW1Δhyh 株) を宿主とし、*pyrF* をマーカーとする相同性組換えにより目的遺伝子の破壊株を作製した。ピルビン酸を添加した人工海水栄養豊富培地による水素発生条件下、85℃で培養し、増殖に伴って発生した気体をアルミニウムバッグで捕集した。水素･二酸化炭素の発生量はガスクロマトグラフィーにより測定し、培養液上清中のアミノ酸消費量およびカルボン酸生成量は高速液体クロマトグラフィーまたは酵素法で測定した。

【結果】　IOR は大小 2 つのサブユニット IorA と IorB から構成されるヘテロ二量体タンパク質である。*T. kodakarensis* 染色体上には IOR1 をコードする隣接遺伝子 *iorA1* (*tk0136*)、*iorB1* (*tk0135*) に加え、*iorA2* (*tk1643*)、*iorB2* (*tk2244*) が存在する。IorA2 と IorB2 はパラログである IOR2 を構成することが推測されているが、実際の機能は不明である。そこで *T. kodakarensis* の *iorA1*、*iorA2* の単独破壊株およびこれらの二重破壊株を作製した。いずれの破壊株も宿主株と同等の生育特性を示したが、*iorA1* 破壊株では芳香族アミノ酸の消費量およびそれらに対応するカルボン酸の生成量が著しく減少していた。このことから本菌における芳香族アミノ酸酸化は IOR1 が特異的に担っていることが強く示唆された。本菌のアミノ酸酸化代謝について更なる知見を得るために、分岐鎖アミノ酸酸化に特異的に機能する KOR ホモログである 2-ケトイソ吉草酸 : Fd 酸化還元酵素 (VOR) と IOR1 の二重欠失株を作製した。これら組換え株の生育特性や水素発生代謝におけるマスバランスなどについて報告する。

Thermococcus kodakarensis, amino acid oxidation, hydrogen production

講演番号：2A37a10
講演日時、会場：3 月 27 日 10:49～ A 校舎 37 会場

Autotrophic and heterotrophic accumulation of poly-β-hydroxybutyrate by a moderately thermophilic hydrogen-oxidizing bacterium Hydrogenophilus thermoluteolus TH-1

○ Huu Tri NGUYEN[1], Fumiko Ishizuna[2], Yuya Sato[3], Hiroyuki Arai[1], Masaharu Ishii[1] ([1]Department of Biotechnology, Graduate school of Agriculture and Life Science, The University of Tokyo, Bunkyo, Tokyo 113-8657, Japan, [2]Technology Advancement Centre, Graduate school of Agriculture and Life Science, The University of Tokyo, Bunkyo, Tokyo 113-8657, Japan, [3]Research Institute for Environmental Management Technology, National Insitute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), Ibaraki 305-8569, Japan)

Hydrogenophilus thermoluteolus TH-1 is a thermophilic hydrogen-oxidizing microorganism that was reported to have highest growth rate among autotrophs. Genome analysis revealed that TH-1 contains three genes involved in poly-β-hydroxybutyrate (PHB) production: acetyl-CoA acetyltransferase (*pha*A), acetoacetyl-CoA reductase (*pha*B) and PHA synthase (*pha*C). Three copies of *pha*C gene were found to exist in the genome indicating that strain TH-1 is a high potential bacterium for PHB production. PHB accumulation was investigated in strain TH-1 under induction condition, also the role of three PHA synthase genes was analyzed and discussed. After induction by nitrogen starvation, PHB rapidly accumulated under autotrophic and heterotrophic conditions. PHB granules were globular form with a diameter of 0.2-0.5 μm. They were located close to or in contact with the membrane under autotrophic condition, but were randomly distributed in cytosol under heterotrophic condition. Although PHB granules appeared after 15 minutes of induction, drastic degradation of PHB was observed after 9-hr of induction. *H. thermoluteolus* TH-1 was found to produce up to 0.430±0.014 g/L after 6-hr of induction under heterotrophic condition. The highest percentage PHB amounts accumulated under autotrophic and heterotrophic conditions were 38.59% after 6 hrs and 53.8% after 3-hrs, respectively.

Hydrogenophilus thermoluteolus TH-1, poly-β-hydroxybutyrate, PHA synthase

講演番号：2A37a11
講演日時、会場：3 月 27 日 11:10～ A 校舎 37 会場

Methylobacterium extorquens AM1 のメタノール脱水素酵素 XoxF1 の熱安定性は補因子であるレアアースの種類に依存する

Thermal stability of XoxF1 from *Methylobacterium extorquens* AM1 depends on type of rare-earth elements as a cofactor

○日比野 歩美[1]、海老原 章郎[1]、谷 明生[2]、三井 亮司[3]、早川 享志[1]、中川 智行[1] ([1]岐阜大院応生、[2]岡山大植物研、[3]岡山理大理)

○Ayumi HIBINO[1], Akio EBIHARA[1], Akio TANI[2], Ryoji MITSUI[3], Takashi HAYAKAWA[1], Tomoyuki NAKAGAWA[1] ([1]Gifu Univ., [2]Okayama Univ., [3]Okayama Univ. Sci.)

【目的】

メタノールを炭素源として資化できる *Methylobacterium* 属細菌は，植物が産生するメタノールを生育に利用し，植物ホルモン等を供給することで相利共生を保っている植物共生細菌である。つまり，*Methylobacterium* 属細菌のメタノール代謝系は植物共生にとって欠かせない重要な機能のひとつであり，その初段階酵素メタノール脱水素酵素（MDH）は植物共生の鍵因子であるといえる。*Methylobacterium* 属細菌のモデル株である *M. extorquens* AM1 株は MDH をコードする *mxaF*，*xoxF1*，*xoxF2* の 3 コピーの遺伝子を持ち，*mxaF* は Ca 依存型 MDH を，*xoxF1* はレアアース元素（REE）依存型 MDH をコードすることが報告されている [1)]。一方, AM1 株の REE 依存的なメタノール生育は La，Ce，Pr，Nd の 4 種類のみに依存し，La，Ce に比べて Nd は著しい生育遅延を示す [2)]。また，REE 依存型 MDH 活性も La，Ce，Pr，Nd に特異性を持ち，その活性はメタノール生育と同様，Nd では顕著に低下する [2)]。しかし，*xoxF1* 発現量は REE 種によらず同程度であったことから，Nd-MDH をコードする遺伝子および Nd による MDH の活性発現については全く分かっていない。そこで，本研究では Nd-MDH をコードする遺伝子の同定と XoxF1 の酵素活性発現機構を観察することとした。

【方法・結果】

Nd-MDH の活性発現機構を明らかにするため, Nd および La 存在下でメタノールに生育した Δ*xoxF2* 株から，Nd-MDH および La-MDH を SDS-PAGE で単一なバンドを示すまで精製した。精製酵素を質量分析により同定した結果，Nd-MDH は La-XoxF1 と同様に XoxF1 であった。また，両酵素の比活性は, Nd-MDH が 37.7 U/mg, La-MDH が 32.7 U/mg であり, 至適 pH は La-MDH が 9.0, Nd-MDH が 9.5, 最適温度は共に 45ºC を示した。しかし，La-MDH は 60ºC において最適温度の 60%以上の活性が残存していたのに対し，Nd-MDH は 55ºC で急激に活性が低下し，60ºC では最適温度の 8%しか活性が残っていなかった。そこで両精製酵素の変性中点温度（Tm）を測定したところ，Nd-MDH は La-MDH に比べ著しく低 Tm 値を示した。以上のことから，XoxF1 は La のみならず Nd も補因子として利用できるが，補因子である REE の種類が XoxF1 の熱安定性に重要であることが示唆された。

1) Nakagawa T *et al*. (2012) *PLoS One*. 7:e50480.

2) 日比野ら（2014）日本農芸化学会 2014 年度 大会要旨集.

Methylobacterium extorquens, methanol dehydrogenase, rare-earth elements

講演番号：2A37a12
講演日時、会場：3 月 27 日 11:21～ A 校舎 37 会場

メチロトローフ酵母 *Pichia methanolica* のホルムアルデヒド脱水素酵素の発現とメタノール代謝制御
Gene expression of formaldehyde dehydrogenase and methanol metabolic regulation in the methylotrophic yeast *Pichia methanolica*
○若山 敬嗣、山口 早希子、早川 享志、中川 智行（岐阜大院応生）
○Keishi WAKAYAMA, Sakiko YAMAGUCHI, Takashi HAYAKAWA, Tomoyuki NAKAGAWA (Gifu Univ.)

【背景】
メタノールを唯一の炭素源として利用できるメチロトローフ酵母である *P. methanolica* は、強力なメタノール誘導性プロモータを有し、それらを用いた異種遺伝子発現系は、現在、広く利用されている。しかし、メチロトローフ酵母は高濃度メタノール環境下においてその生育が阻害されることが知られており、これはメタノールを炭素源とした本酵母の発酵生産系構築において重要な問題である。これまで私たちのグループでは、メチロトローフ酵母の高メタノール環境下における生育阻害の原因のひとつが細胞内に過剰に蓄積した代謝中間体であるホルムアルデヒド（FA）にあると推測し、研究を行ってきた。今回、FA 脱水素酵素であるホルムアルデヒドデヒドロゲナーゼ（FLD）に着目し、*P. methanolica* の高濃度メタノール生育における FLD の役割を明らかにし、FA 代謝制御機構を解明することを目的とした。
【結果および考察】
まず最初に、*P. methanolica* のメタノール生育における FA の挙動について観察した。*P. methanolica* は、生育初期に培地中に FA を蓄積し、その消費と共に対数増殖期に移行した。また、*FLD1* の FA 耐性における役割を明らかにするため、様々な炭素源・FA による *FLD1* の発現誘導をプロモータ発現レベルにて観察した。その結果、メタノール生育では高い発現を示し、グルコースでも低レベルではあるものの *FLD1* の発現が観察された。また、トレハロースを炭素源とすると、グルコースに比べやや高い発現を示し、メタノール添加により発現レベルが上昇した。そこで、FLD の誘導レベルとメタノール生育との関連性を観察したところ、グルコースを炭素源とした場合には、低 FA 濃度で生育が阻害されるのに対し、FLD が誘導されるトレハロース生育では強い FA 耐性が見られた。つまり *P. methanolica* は FLD の発現が高い炭素源での生育時には、FA 耐性能が高いことが示され、FLD の発現量を増加させることで FA 耐性を強化できると考えた。そこで、FLD マルチコピー株を作製し、FA 耐性能およびメタノール生育能を観察した。その結果、野生株と比べ、最大 3 倍程度の FLD 活性を示す株を複数取得したが、どの株においても FA 耐性能およびメタノール生育能は、野生株と同等であった。これらのことから、FLD は FA 耐性・メタノール生育に重要であるものの、FLD の高発現にて FA 代謝を促進させるだけでは、高メタノール耐性の獲得にはつながらず、メタノール代謝全体のバランスの調節が重要であるということが推測された。

Pichia methanolica, formaldehyde dehydrogenase, methanol growth

講演番号：2A37a13
講演日時、会場：3 月 27 日 11:32～ A 校舎 37 会場

出芽酵母の NADPH 供給系はアセトアルデヒドストレス耐性機構において重要な役割を持つ
NADPH supplying system has an important role in acetaldehyde tolerance of the budding yeast

○高木 哲史[1]、松山 明加[1]、佐藤 優太[1]、早瀬 未来[1]、早川 享志[1]、河井 重幸[2]、村田 幸作[3]、奥 公秀[2]、由里本 博也[2]、阪井 康能[2]、中川 智行[1] ([1]岐阜大応生、[2]京都大院農、[3]摂南大理工)
○ Tetsushi TAKAGI[1], Haruka MATSUYAMA[1], Yuta SATO[1], Miku HAYASE[1], Takashi HAYAKAWA[1], Shigeyuki KAWAI[2], Kosaku MURATA[3], Masahide OKU[2], Hiroya YURIMOTO[2], Yasuyoshi SAKAI[2], Tomoyuki NAKAGAWA[1] ([1]Gifu Univ., [2]Kyoto Univ., [3]Setsunan Univ.)

【目的】

反応性が高いカルボニル化合物であるアセトアルデヒド（AA）は，細胞内において様々な生体物質と付加体を形成し，多様な生体反応を阻害する毒性化学物質である。一方 AA は，細胞内において様々な代謝系で生産され，特に出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* のアルコール発酵では，AA の細胞内濃度は条件によっては 1 g/L に達することもある重要な毒性代謝中間体である。つまり，出芽酵母の分子育種では AA に対する耐性を強化することが重要な課題のひとつであると考えることができる。我々はこれまで出芽酵母の AA 耐性機構を解析し，グルタチオン還元系，脂肪酸合成系など，いくつかの NADPH 要求型代謝系が AA 耐性に重要であることを報告してきた。つまり，細胞内の NADPH の供給系が AA 耐性に大きく寄与していることが推測できる。そこで，本研究では AA 耐性機構における NADPH 供給系の役割の解明を目的とした.

【結果および考察】

NADPH は，$NADP^+$の還元および NAD^+/NADH のリン酸化によって供給される。出芽酵母では，$NADP^+$還元系としてペントースリン酸経路（PPP）と AA 脱水素酵素 Ald6 が報告されている [1)]。PPP 遺伝子群の欠損はグルコースを炭素源としたとき強い AA 感受性を示したが，グリセロールを炭素源としたとき PPP よりも *ald6*Δ 株の方が強い AA 感受性を示した。これは，出芽酵母が炭素源によって NADPH の供給系を切り替えていることを示唆している。さらには, AA ストレスにより細胞内 NADPH のみならず $NADP^+$量も顕著に増加したことから, NAD^+/NADH リン酸化系も AA 耐性に重要であることが分かった。また，AA ストレス下では *POS5*，*YEF1*，*UTR1* といった NAD^+リン酸化酵素をコードする遺伝子の発現量が増加しており，このうち *pos5*Δ 株および *yef1*Δ*utr1*Δ 株が AA 感受性を示した。以上より，出芽酵母では細胞質局在型 Yef1，Utr1 が AA 耐性機構における NADPH 供給に重要な役割を果たしていることが推察され，PPP と Ald6 が $NADP^+$還元系として機能することで細胞質 NADPH を増強していることが示された。また，ミトコンドリア局在型 Pos5 はオレイン酸生産系など，ミトコンドリアに局在する AA 耐性機構への NADPH 供給系として重要であることが推察された。

【参考文献】

1) Grabowska and Chelstowska (2003) *J. Biol. Chem*. 278: 13984-13988.

acetaldehyde tolerance, Saccharomyces cerevisiae, NADPH

講演番号：2A37a14
講演日時、会場：3 月 27 日 11:43～ A 校舎 37 会場

大腸菌におけるメタボリックスイッチ制御機構の解明
Regulation of metabolic switch in *E.coli*

○島田 友裕[1]、山梨 智也[2]、鮒 信学[2]、田中 寛[1]([1]東工大資源研、[2]静県大食品栄養)
○Tomohiro SHIMADA[1], Tomoya YAMANASHI[2], Nobutaka FUNA[2], Kan TANAKA[1] ([1]TITech, [2]Univ. of Shizuoka)

代謝系は全ての生物に普遍性が高く、自在にその流れを変えながら、様々な局面で重要な生命現象を引き起こしている。しかし、代謝制御に関わる知見が蓄積した今日でも、代謝フローの方向性を細胞が操る機構は明確でなく、任意の人為操作が可能となる目処も立っていない。私たちは研究の背景となる情報に富んだ大腸菌を材料とし、代謝フローの転換を引き起こす分子機構の「枠組み」を明らかにすることを目的として研究を進めている。

これまでの研究で、グルコースを主要な炭素源とした最小培地でのバッチ培養系を用い、培養開始時のグルコースを低濃度（0.002%）とすることで、代謝ステート（Metabolic States）が順次遷移していく実験系を確立した。この遷移の状況は、細胞内のレドックス状態に鋭敏に反応する *Vibrio* 由来ルシフェラーゼ活性によりモニターすることが可能であり、関連する代謝酵素や制御因子の変異株で調べることで、特定の酵素（因子）がどの代謝ステートに、あるいは代謝ステート間の遷移に働くかを解析することができる。その一環で、グルコース酸化により解糖系を中心にエネルギーを獲得する代謝ステート（State I）から、酢酸を利用して TCA を中心にエネルギーを獲得する代謝ステート(State III)への切り替えの際に Acetyl-CoA を酢酸へ変換する代謝ステート(State II)が存在する事を発見した。

本発表では、この State II に焦点を当て、その分子機構の解明について得られてきた結果を報告する。Phosphate acetyltransferase（*pta*）または Acetate kinase（*ackA*）を欠損させると State II から State III への遷移の際に、細胞増殖が著しく停滞することが観察された。これらの欠損株において Pyruvate dehydrogenase または 2-Oxoglutarate Dehydrogenase の特定のサブユニットを過剰発現させることや、*pta* 欠損株において Coenzyme A(CoA)の前駆体であるパントテン酸を添加することにより、増殖の停滞が部分的に回復することが分かった。さらに、細胞内の CoA 類の濃度を定量したところ、State II 以降では CoA 類の濃度が上昇しており、そのほとんどが Acetyl-CoA の状態であること、また、State II においてフリーの CoA の濃度が一過的に上昇していることが観察された。その一方で *pta* 欠損株においては Acetyl-CoA の濃度は野生株と同等であるものの、フリーの CoA の濃度の上昇は観察されなかった。これらの結果から、State II を引き起こすための分子機構、およびその生理的な意義について議論したい。

Metabolic switch, Metabolic state transition, Coenzyme A

講演番号：2A37a15
講演日時、会場：3 月 27 日 11:54～ A 校舎 37 会場

温度応答性高分子を用いた微生物代謝新規制御法の開発
A new method to control bacteria by using a temperature responsible polymer
○勝亦 雄太、豊福 雅典、小川 和義、野村 暢彦（筑波大学）
○ Yuta KATSUMATA, Masanori TOYOFUKU, Kazuyoshi OGAWA, Nobuhiko NOMURA (Tsukuba Univ.)

近年，微生物は個々に点在する形で存在するのではなく，バイオフィルムなどの集団として存在することが知られるようになってきた．また，このような集団中において，微生物がシグナルを介して個体間でコミュニケーションを行うことも明らかになってきた．そして，微生物間コミュニケーションの中でも Quorum Sensing (QS)というシステムは，細菌の感染，病原性発現，バイオフィルム形成といった，多くの病原性因子を制御していることから，特に盛んに研究が行われてきている．この QS は菌密度依存的なシステムであるため，菌体間の距離が重要な因子であるが，菌体間の距離を人工的に制御したという報告は今までにない．そこで我々は，菌密度を意図的に制御できる系の構築を試みた．系の構築を行うにあたって，我々は温度応答性高分子 poly-*N* -isopropylacrylamide(PNIPA)に着目した．PNIPA は 32℃を境に伸縮する性質を持っており，菌を包括させた PNIPA 担体に温度変化を与えることで菌密度を制御できると考えた．実験の結果，PNIPA 担体は温度に応答して体積を 70 %以上変化させ，PNIPA 担体中の菌は温度非応答性担体 poly-acrilamide(PA)中の菌と比較して異なる挙動を示した．この挙動が QS に関与するか現段階では明らかではないが，実験から得られた結果は PNIPA 担体の伸縮効果が微生物の集団，バイオフィルムの形成を制御する機能を持つことを示唆している．本研究は，温度応答性高分子を用いて微生物集団のデザインを制御できる可能性を示した．

Carrier, Biofilm, Quorum sensing

講演番号：2A37p02
講演日時、会場：3 月 27 日 14:11～ A 校舎 37 会場

Burkholderia sp. 5-2 株の L-グリセリン酸代謝に関わる L-glycerate dehydratase の解析
Analysis of L-glycerate dehydratase involved in L-glycerate catabolism of *Burkholderia* sp. 5-2.
○根岸 真衣子[1]、中村 顕[2] ([1]筑波大生命環境科学研究科、[2]筑波大生命環境系)
○Maiko Negishi[1], Akira Nakamura[2] ([1]Grad. Sch. Life. Environ. Sci., Univ.of Tsukuba, [2]Fac. Life. Environ. Sci., Univ.of Tsukuba)

地球上に存在する生物は糖やアミノ酸に対して鏡像異性体のどちらか一方のみを利用するホモキラリティーを示すが、その起源は明らかとなっていない。エネルギー源として最も一般的な糖であるD-グルコース(D-glc)およびその代謝中間体は全て D 体である。これに対し、当研究室で明らかにしたL-glc 代謝経路では、L 体の代謝中間体は代謝経路の途中で D 体へと変換され、D-グリセルアルデヒド 3 リン酸(D-G3P)へと変換される。D-glc の代謝中間体でもある D-G3P に対して、L-G3P は抗菌活性を示すことから、光学活性を示す最小単位である C3 化合物の代謝でもホモキラリティーは存在すると考えられる。また化学進化説では、原始地球で C1 化合物から純粋な化学反応で六炭糖が誕生したと説明されている。この過程では C3 化合物合成反応で初めて鏡像異性体が DL 混合体として誕生し、それ以降の反応で誕生する六炭糖も DL 混合体であったと考えられる。以上のことから、糖代謝のホモキラリティーの問題は、六炭糖よりもむしろ C3 化合物にあると考えられる。そこで本研究では C3 化合物である L-グリセリン酸(L-GA)資化菌を自然界よりスクリーニングし、その代謝経路を解析することを目的とした。

筑波大学構内の土壌をスクリーニング源とし、L-GA を単一炭素源とする最小培地を使用した集積培養により 5 種の L-GA 資化菌を取得した。4 つの資化菌について 16S rRNA 遺伝子配列を解析し、*Burkholderia* 1 株、*Achromobacter* 1 株、*Pseudomonas* 2 株を同定した。このうちの *Burkholderia* sp. 5-2 株より L-GA 代謝の初発反応を触媒する酵素を精製した。本酵素と L-GA の反応産物はピルビン酸であったため、本酵素は L-GA を脱水しピルビン酸へと変換する L-GA dehydratase (L-gaD)であることが明らかとなった。本酵素の部分アミノ酸配列を元に同遺伝子をクローン化したところ、本酵素のアミノ酸配列は *B. terrae* の galactarate dehydratase とアノテートされている WQE_08037 と 98%の相同性を示した。ところが本酵素は L-GA や L-GA に対しての 15%程度の活性で D-GA とは反応するものの、galactarate とは反応しなかった。そのため、本酵素は L-GA に特異性を示す dehydratase であると結論した。本酵素の詳細な酵素学的解析についても報告する予定である。

L-glycerate catabolism, *Burkholderia*, dehydratase

講演番号：2A37p03
講演日時、会場：3 月 27 日 14:22～ A 校舎 37 会場

油脂生産酵母 *Yarrowia lipolytica* の長鎖アルコール資化に関わるアルコールデヒドロゲナーゼおよび長鎖アルコールオキシダーゼ遺伝子の同定と解析

Identification and characterization of genes encoding alcohol dehydrogenases and a fatty alcohol oxidase involved in assimilation of fatty alcohols in oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*.

○岩間 亮[1]、太田 明徳[2]、堀内 裕之[1]、福田 良一[1]([1]東大院・農生科・応生工、[2]中部大・応生・応化)
○Ryo IWAMA[1], Akinori OHTA[2], Hiroyuki HORIUCHI[1], Ryouichi FUKUDA[1] ([1]Dept. Biotech., Univ. Tokyo., [2]Dept. Biol. Chem., Chubu Univ.)

油脂生産酵母 *Yarrowia lipolytica* は長鎖 *n*-アルカンや長鎖アルコール、脂肪酸などの疎水性化合物を単一の炭素源およびエネルギー源として生育できる酵母である。*Y. lipolytica* において、長鎖 *n*-アルカンは小胞体でシトクロム P450 の一種である P450ALK による末端水酸化を受けて長鎖アルコールへと変換された後、小胞体またはペルオキシソームで長鎖アルデヒド、脂肪酸へと順次酸化されて利用されると考えられている。これまでの解析から、*n*-アルカンを水酸化する Alk タンパク質や長鎖アルデヒドを酸化する Hfd タンパク質が同定されているが[1)2)3)]、長鎖アルコールの酸化に関わる酵素は不明であった。本研究では、本酵母の長鎖アルコールの酸化機構の解明を目的とした。

アルコールデヒドロゲナーゼをコードする *ADH1-ADH7* および *FADH* と長鎖アルコールオキシダーゼをコードする *FAO1* の全てを破壊した株（ALCY02 株)を作製し生育を解析したところ、この株は長鎖アルコールを炭素源とする培地での生育に欠損を示した。また炭素鎖長 10-12 の *n*-アルカンを炭素源とした培地での生育にわずかに欠損を示したのに対して、炭素鎖長 13-18 の *n*-アルカンを含む培地での生育には異常は見られなかった。ALCY02 株を *n*-ドデカン存在下で培養した場合、野生型株と比較して細胞内により多くの 1-ドデカノールを蓄積した一方で、ドデカン酸の蓄積量は低下した。ALCY02 株に *ADH1-ADH7*、*FADH*、または *FAO1* を導入したところ、*ADH1*、*ADH3*、 *FAO1* を導入した場合にのみ長鎖アルコールでの生育が回復した。また、これら 3 つの遺伝子の 3 重破壊株は、長鎖アルコールや短鎖 *n*-アルカンを含む培地で ALCY02 株と同様の生育欠損を示した。EGFP との融合タンパク質を用いた蛍光顕微鏡観察から、Adh1p、Adh3p は細胞質に局在するのに対して、Fao1p はペルオキシソームに局在することが示唆された。以上の結果から、Adh1p、Adh3p、および Fao1p は細胞外から取り込んだ長鎖アルコールの酸化に関わること、*n*-アルカンの水酸化により生じる長鎖アルコールの酸化には他の酵素が主要な役割を果たすことが示唆された。

1) Iida T, Sumita T, Ohta A, Takagi M (2000) *Yeast*, **16**, 1077-1087
2) Takai H, Iwama R, Kobayashi S, Horiuchi H, Fukuda R, Ohta A (2012) *Fungal Genet. Biol.*, **49**, 58-64.
3) Iwama R, Kobayashi S, Ohta A, Horiuchi H, Fukuda R (2014) *J. Biol. Chem.*, **289**, 33275-33286.

Yarrowia lipolytica, alcohol dehydrogenase, fatty alcohol oxidase

講演番号：2A37p04
講演日時、会場：3 月 27 日 14:33～ A 校舎 37 会場

スフィンゴモナッド細菌株の有機炭素源非添加無機固体培地での生育に関与する推定アルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子 *adhX* の解析

Analysis of putative alcohol dehydrogenase gene *adhX* involved in the oligotrophic growth of a sphingomonads strain

○稲葉 慎之介、平野 丈、宇井 博紀、大坪 嘉行、永田 裕二、津田 雅孝（東北大・院生命科）
○Shinnosuke Inaba, Jou Hirano, Hiroki Ui, Yoshiyuki Ohtsubo, Yuji Nagata, Masataka Tsuda (Tohoku Univ.)

【背景・目的】好気性従属栄養細菌でα-proteobacteria に属する *Sphingobium japonicum* UT26 株は、高度に難分解性の多様な物質分解能を有する様々な株が属することで知られるスフィンゴモナッド細菌群の一員であり、環境汚染物質である有機塩素系殺虫剤γ-hexachlorocyclohexane (γ-HCH) を唯一炭素源として生育できる。我々は、本株のγ-HCH 分解資化能に関する研究過程で、有機炭素源非添加の無機寒天培地で CO_2 固定を伴ってコロニー形成する（oligotrophic 表現型）突然変異株を複数取得した。これら突然変異株の解析から、変異による推定 Zn-dependent alcohol dehydrogenase (ADH) 遺伝子 (*adhX*) の高発現が本表現型の要因のひとつであることが示唆された。さらに、UT26 株に *adhX* 高発現プラスミドを導入した株も本表現型を示したことから、少なくとも *adhX* の高発現が本表現型の直接の要因となり得ると結論した。本研究では、*adhX* 産物の機能の解明を目的とした。
【方法・結果および考察】*adhX* およびその変異型遺伝子の高発現プラスミドを UT26 株に導入して各遺伝子の機能を評価する際、UT26 株に存在するサイレントな *adhX* が何らかの影響を及ぼす可能性が考えられたため、*adhX* 完全欠失株 UT26DAX を作製した。本株は通常の培養条件下では UT26 株と同等に生育し、*adhX* の導入高発現により oligotrophic 表現型を示した。なお、寒天の代わりに透明度の高いゲランガムを用いると oligotrophic 表現型がより明瞭に観察できることから、以降の解析はゲランガムを支持体として用いた。同様に AdhX の NAD^+結合モチーフに変異を導入した *adhX*_C42A, *adhX*_H43R, *adhX*_T44A 遺伝子を UT26DAX に導入高発現させたところ、*adhX*_H43R 導入株は野生型遺伝子導入株より弱い oligotrophic 表現型を示したのに対して、*adhX*_C42A と *adhX*_T44A 導入株は当該表現型を示さなかった。次に、C 末端に His タグを付与した野生型 AdhX および AdhX(C42A), AdhX(H43R), AdhX(T44A)を大腸菌で高発現・精製し、活性の検討を行った。その結果、AdhX は ethanol に対して ADH 活性を示した。また、AdhX(H43R)は AdhX より弱い ADH 活性を示したが、AdhX(C42A)と AdhX(T44A)は ADH 活性を示さなかった。以上の結果から、(i) *adhX* が実際に ADH 活性を有するタンパク質 AdhX をコードしていること、(ii) AdhX の ADH 活性と oligotrophic 表現型とに相関関係があることが明らかになった。さらに、AdhX は formaldehyde dismutase (FDM)とも相同性を示すことから、精製酵素の FDM 活性について現在検討中である。一方、UT26 株以外の各種細菌株に UT26 株由来 *adhX* 高発現プラスミドを導入したところ、*Sphingobium* sp. TKS 株に加えてβ-proteobacteria に属する *Burkholderia multivorans* ATCC 17616 株でも oligotrophic 表現型が観察された。

sphingomonads, oligotroph, carbon fixation

講演番号：2A37p05
講演日時、会場：3 月 27 日 14:44～ A 校舎 37 会場

分裂酵母 CoQ 欠損株が蓄積する中間体の解析
Analysis of the intermediate accumulation of CoQ defective mutants in fission yeast
○柳井 良太、赤井 華子、西野 耕平、戒能 智宏、川向 誠（島根大生物資源）
○Ryota YANAI, Hanako AKAI, Kouhei NISHINO, Tomohiro KAINO, Makoto KAWAMUKAI (Shimane Univ.)

コエンザイム Q（CoQ）はミトコンドリア呼吸鎖における電子伝達系の必須因子であり、生体内で合成される脂溶性抗酸化物質である。CoQ はキノン骨格部分とイソプレノイド側鎖の合成、骨格部分と側鎖の縮合、骨格部分の修飾と、大きく 3 つの過程を経て合成されており、原核生物である大腸菌では骨格部分の修飾に関与する遺伝子を破壊すると前駆体を蓄積することから、触媒する酵素やステップの対応付けがほぼ完了している。これに対して、真核生物である出芽酵母の破壊株では、前駆体の蓄積は見られず、初発物質である HHB（3-hexaprenyl-4-hydroxybenzoic acid)もしくは、HAB (3-hexaprenyl-4-aminobenzoic acid)が蓄積することが、CoQ 生合成経路の解明を難しくしている。我々は分裂酵母の *coq7*破壊株において Coq7 の基質である DMQ10（Demethoxyubiquinone10）が蓄積することを報告している(1)。そこで本研究では、分裂酵母の他の CoQ 生合成酵素遺伝子を破壊した株が蓄積する前駆体を調べることにより、分裂酵母 CoQ10 生合成経路の解明を目的として実験を行った。

coq3~*coq9* の 7 つの CoQ 生合成酵素遺伝子をそれぞれ破壊した株を用いて CoQ 中間体を抽出し、HPLC により解析した結果、*coq5* 破壊株において複数の中間体と思われるピークを検出することができた。これまでの研究から、*coq5* 遺伝子欠損株では最少培地での生育遅延、CoQ10 生合成能欠損、抗酸化ストレス感受性などの表現型を示すことや、Coq5 はミトコンドリアに局在することがわかっている。また、Coq5 は高等真核生物において非常に良く保存されており、分裂酵母の *coq5* 欠損株の表現型はヒト Coq5 により相補することが分かっている(2)。

coq5 破壊株が蓄積する物質を LC-MS で測定した結果、*coq5* 破壊株において 2 つの物質が蓄積していることが明らかとなった。野生株が合成する CoQ10 の UV による吸収極大が 275nm であるのに対して、これら 2 つの物質の吸収極大は 263nm であることから、CoQ10 とは異なる CoQ 合成の中間体であることが示唆された。また、*coq5* 破壊株の培養時に、キノン骨格に用いられる PHB(*p*-hydroxybenzoic acid)を添加することで、一方のピークが増加することが分かった。現在、TOF-MS を用いた解析を行い、蓄積している物質の精密な *m/z* 及び、フラグメンテーションパターンの予備的な結果を得ており、合わせて報告する。

(1) Miki R., *et al.*, (2008) *FEBS J.*, 275, 5309-5324
(2) Hayashi K ., *et al.*, (2014) *PLoS ONE.*, 9, e99038

Coenzyme Q, fission yeast, mitochondria

講演番号：2A37p06
講演日時、会場：3 月 27 日 15:05～ A 校舎 37 会場

イソプレノイド合成経路を代謝改変した大腸菌変異株における鉄硫黄クラスター生合成系の機能解析

Genetic and biochemical analysis of iron-sulfur cluster biosynthesis machinery in *Escherichia coli* by modifying isoprenoid biosynthetic pathway

○田中 尚志[1]、金澤 美秋[1]、葛山 智久[2]、朝井 計[1]、高橋 康弘[1] ([1]埼玉大院理工、[2]東大生セ)
○ Naoyuki TANAKA[1], Miaki KANAZAWA[1], Tomohisa KUZUYAMA[2], Kei ASAI[1], Yasuhiro TAKAHASHI[1] ([1]Saitama Univ., [2]Univ. of Tokyo)

鉄硫黄（Fe-S）タンパク質はFe-Sクラスターを持つタンパク質の総称で、TCA回路や電子伝達系などのエネルギー代謝から遺伝子の発現制御に至るまで、多彩かつ重要な機能を担っている。これらFe-Sタンパク質の機能を支えているのがFe-Sクラスターの生合成系である。大腸菌のFe-Sクラスター生合成系ISCマシナリーは、*iscSUA-hscBA-fdx-iscX*にコードされる 7 種類の成分から構成され、これらの成分が協調してクラスターを組み立て、最終的にアポ型タンパク質に渡していると考えられているが、具体的な作動機構はほとんどわかっていない。本研究では、大腸菌を用いて新たな遺伝学的実験系を構築し、ISCマシナリーの中心成分であるIscUについて機能解析を行った。

Fe-Sクラスター生合成系は生物の生存に必須であり、大腸菌においてもクラスター生合成系の欠損は致死となる。しかし、我々は大腸菌のイソプレノイド合成経路（MEP経路）を放線菌由来のメバロン酸経路に代謝改変すると、Fe-Sクラスター生合成系の必須性を回避することができることを見出した。MEP経路にはFe-S酵素（IspGとIspH）が関与しているが、メバロン酸経路には関与していないためである。これにより、Fe-Sクラスターの生合成系に関与する遺伝子群を自在に操作・解析することが初めて可能になった。この実験系を用いて、ISCマシナリーの各成分がコードされている遺伝子をそれぞれ破壊して、その影響について調べたところ、好気条件下ではIscS, IscU, IscA, HscB, HscA, Fdxの 6 種類の成分がISCマシナリーの機能に必須だが、嫌気的な条件下では、IscS, IscU, HscB, HscAの 4 種類のみが必須であることがわかった。さらに、Fe-Sクラスターの新規形成部位、IscUに対して系統的に部位特異的変異を導入し、相補実験によって変異型IscUの機能を評価したところ、IscUのクラスター配位子（C37, C63, H105, C106）に加えて、近傍のY3, D39, K103がIscUの機能に必須であることが分かった。また機能不全の変異IscUから復帰突然変異体を単離し、二次的な変異を調べたところ、IscU Y3の変異をサプレスする変異を、IscS（硫黄原子の供与体）の活性部位近傍に 4 種類見出した。変異型IscUとサプレッサー変異型IscSを精製して、生化学的な性質を野生型のタンパク質と比較したところ、IscU Y3はIscSから硫黄原子を受け取る際の相互作用に重要であることが判明した。これらの結果は、IscU Y3がIscSの構造変化を誘起し、硫黄原子受け渡し反応を促進させる役割があることを示唆している。

iron-sulfur, isoprenoid, iron sulfur protein

講演番号：2A37p07
講演日時、会場：3 月 27 日 15:16～ A 校舎 37 会場

枯草菌における鉄硫黄クラスター生合成オペロン（*sufCDSUB*）破壊株の構築と異種間での相補解析
Genetic analysis of the *sufCDSUB* operon involved in iron-sulfur cluster biosynthesis in *Bacillus subtilis*: Construction of disruptants and heterologous complementation analysis

○横山 奈央[1]、丸山 ちひろ[1]、野中 ちひろ[1]、葛山 智久[2]、朝井 計[1]、高橋 康弘[1] ([1]埼玉大・理工、[2]東京大・生物生産工学研究センター)
○Nao YOKOYAMA[1], Chihiro MARUYAMA[1], Chihiro NONAKA[1], Tomohisa KUZUYAMA[2], Kei ASAI[1], Yasuhiro TAKAHASHI[1] ([1]Saitama Univ., [2]Tokyo Univ.)

鉄硫黄（Fe-S）タンパク質は、Fe-S クラスターをコファクターとして持つタンパク質の総称で、エネルギー代謝から遺伝子の発現制御に至るまで様々な生命活動に関わっている。これら Fe-S タンパク質の機能を支えているのが、Fe-S クラスター生合成系である。バクテリアでは、3 種類（NIF, SUF, ISC）の Fe-S クラスター生合成系が同定されており、どれも複数の成分から構成される複雑なマシナリーである。大腸菌では、タイプの異なる 2 種類の生合成系（ISC と SUF マシナリー）が独立して機能することが知られている。一方、枯草菌などグラム陽性細菌のゲノムは *suf* 様オペロン（*sufCDSUB*）がコードされており、このオペロンの産物が Fe-S クラスター生合成マシナリーとして機能すると考えられている。興味深いことにこのマシナリーでは、大腸菌 ISC マシナリーの成分 IscU と、大腸菌 SUF マシナリーの 4 成分 SufCDSB とのハイブリッド構成という特徴が見られる。

枯草菌 *suf* 様オペロン内の 5 種類の遺伝子はどれも生育に必須なため、これまで遺伝学的な解析は進んでいなかった。枯草菌には Fe-S タンパク質が 70 種類以上存在しているが、それらの中で必須な Fe-S タンパク質はイソプレノイドの生合成（MEP 経路）に関与する 2 つの酵素（IspG, IspH）だけである。そこで本研究では、枯草菌のイソプレノイド生合成系を、Fe-S 酵素が関与しない放線菌由来のメバロン酸経路へと代謝改変したところ、*suf* 様オペロンを破壊することに初めて成功した。この方法によって構築した *sufCDSUB* の 5 種類の遺伝子の個別破壊株、ならびにオペロン全体を欠失させた変異株は、メバロン酸の添加に完全に依存して生育した。またこれらの変異株では、生育速度の低下や栄養要求性といった表現型も一致していたため、枯草菌 *suf* 様オペロンの遺伝子はどれも Fe-S クラスターの合成に必須であることが明らかになった。

これら *suf* 様オペロンの破壊株は、通常の方法では形質転換することができなかったが、コンピテンスの主要制御因子である ComK をキシロース誘導性プロモーターから人為的に過剰発現させることによって形質転換が可能になった。そこで、構築した破壊株に、大腸菌 *isc*／*suf* オペロンの関連遺伝子を導入して、相補実験によって異種生物間での互換性を検討したところ、意外なことに、枯草菌の SufU は、構造の類似している大腸菌 IscU ではなく、大腸菌 SufE と機能的に代替可能であることが判明した。すなわち、枯草菌の SufU は、大腸菌 IscU のように Fe-S クラスターの新規形成部位として機能するのではなく、大腸菌 SufE と同様、硫黄原子のキャリアとして機能することが明らかになった。

iron-sulfur, isoprenoid, iron sulfur protein

講演番号：2A37p08
講演日時、会場：3 月 27 日 15:27～ A 校舎 37 会場

高度好熱菌 *Thermus thermophilus* におけるタンパク質アセチル化酵素及び標的タンパク質の同定と機能解析

Identification and characterization of protein acetyltransferase from *Thermus themophilus*

○山本 寛之、吉田 彩子、富田 武郎、古園 さおり、葛山 智久、西山 真（東大生物工学セ）
○ Hiroyuki YAMAMOTO, Ayako YOSHIDA, Takeo TOMITA, Saori KOSONO, Tomohisa KUZUYAMA, Makoto NISHIYAMA (BRC, The Univ. of Tokyo)

【目的】ヒストン翻訳後修飾として知られるタンパク質アセチル化は、近年のプロテオミクス解析により非ヒストンタンパク質においても非常に広範に存在することが明らかとなった。タンパク質アセチル化は KAT（lysine acetyltrasferase）と KDAC（lysine deacetylase）の二つの酵素によって可逆的に制御され、これらがそれぞれアセチル CoA や NAD^+を基質とすることからもタンパク質アセチル化と代謝制御との関連が示唆されている。アセチル化タンパク質は、真核生物だけでなく、バクテリアにも多数存在することが明らかとなっており、KAT や KDAC のホモログも生物に広く保存されていることから、タンパク質の（脱）アセチル化が進化的に保存されたタンパク質の制御機構であると考えられる。バクテリアにおいて様々なアセチル化タンパク質の存在が明らかとなった一方で、実際に機能している KAT 及びその標的タンパク質の報告は極めて少ない。高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB27 は進化的に古いとされ、遺伝子数も少ないことから、生物に普遍的なタンパク質アセチル化の機能を解明する上で適した生物だと言える。また、*T. thermophilus* の保有する KAT ホモログの遺伝子数は 10 であり、他のバクテリアと比較して少ない。そこで我々は *T. thermophilus* を対象に今まで報告のない KAT 及びその標的タンパク質を同定し、その制御機構について明らかにすることを目的とした。
【結果】*T. thermophilus* HB27 において KAT とその基質タンパク質を同定するため、10 の KAT 候補遺伝子の破壊株を作製し、タンパク質アセチル化レベルへの影響を調べた。それぞれの破壊株の細胞抽出液に対してアセチル化タンパク質をウェスタンブロッティングにて検出したところ、*TTC1711* 破壊株においてアセチル化が顕著に低下したタンパク質 A を見出した。野生株の細胞抽出液からタンパク質 A を各種カラムを用いて精製し、MALDI-TOF MS にて分析した結果、タンパク質 A が TTC1083 であることが判明した。TTC1083 はこれまでアセチル化による制御の報告がないタンパク質であり、C 末端側及び N 末端側に CoA 加水分解ドメインを有していること、及びそのホモログの機能解析から、アセチル CoA を基質とするアセチル CoA 加水分解酵素あるいは CoA 転移酵素として機能すると推測される。更に、そのオーソログがドメインを跨いで存在することから TTC1083 のアセチル化による機能調節が広範に保存されている可能性が示唆される。また、我々は TTC1711 が TTC1083 をアセチル化することを両組換えタンパク質を用いて *in vitro* 反応によっても確認した。TC1083 の機能解析および TTC1711 による TTC1083 の調節機構についても発表する予定である。

Thermus thermophilus, Post-translational modification, Protein acetylation

講演番号：2A37p09
講演日時、会場：3 月 27 日 15:38～ A 校舎 37 会場

Corynebacterium glutamicum における短鎖アシル化修飾を介したホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ（PEPC）の機能調節

The role of lysine acetylation in the control of phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC) in *Corynebacterium glutamicum*

○永野 愛[1,2]、水野 裕太[2]、西山 真[1]、古園 さおり[1]（[1]東京大学生物生産工学研究センター、[2]協和発酵バイオ株式会社）
○ megumi nagano[1,2], yuta mizuno[2], makoto nishiyama[1], saori kosono[1] ([1]Tokyo Univ. Biotechnology Research Center, [2]KYOWA HAKKO BIO CO., LTD.)

アセチル化に代表されるタンパク質のアシル化修飾は、細菌からヒトまで進化的に保存された翻訳後修飾として近年注目されている。アシル化修飾が代謝酵素調節に関わる例が真核・原核の両方で見いだされており、これを標的とした代謝改変や育種への応用が期待される。*Corynebacterium glutamicum* は、ビオチン制限、Tween 40添加、およびペニシリン添加によりグルタミン酸を過剰生産することが知られている。上記の刺激は細胞膜張力に変化を与え、グルタミン酸排出を担うメカノセンシティブチャネルを開口させると同時に、2-oxoglutarate dehydrogenase complex (ODHC)などの代謝酵素反応のフラックスをグルタミン酸合成方向に変化させることは知られているが、ODHC以外の代謝フラックス変化が上記の刺激により誘発されるメカニズムについては明らかではない。当研究室におけるこれまでの検討では、中央代謝経路の多くの酵素においてグルタミン酸生産誘導と相関したアシル化修飾を観察しており、アシル化修飾が代謝フラックス変化に関わる可能性が示唆されている。本研究では、物質生産に重要な補充経路のホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ（PEPC）に着目し、グルタミン酸生産におけるアシル化修飾の機能解析を行った。

C.glutamicum ATCC13032株のPEPC及びPC（ピルビン酸カルボキシラーゼ)欠損株を作成し、グルタミン酸生産に与える影響を調べたところ、PC欠損株よりもPEPC欠損株でグルタミン酸生産が激減したことから、この株ではPEPCが補充経路として主要な役割を担っていると考えられた。Tween 40添加によるグルタミン酸生産誘導条件ではPEPCの比活性が増加することから、PEPCは翻訳後修飾等の質的制御を受けていることが示唆された。アシローム解析の結果から、PEPCにグルタミン酸生産非誘導条件及び誘導条件間でアシル化修飾量に変動が見られるLys残基を見出した。それらのLys残基についてアセチル化模倣変異株（KQ)、非アシル化模倣変異株（KR)、およびスクシニル化模倣変異株（KE）を造成し、グルタミン酸生産への影響を解析したところ、KQ変異によりグルタミン酸生産が減少する残基を同定した。変異株の粗酵素液を用いたPEPC活性測定の結果、KQ変異株では野生型株やKR変異株に比べて酵素活性が低下していたことから、アセチル化によりPEPC活性が負に制御されていることが示唆された。以上の結果から、グルタミン酸生産非誘導条件下の*C.glutamicum* ATCC13032株では、PEPCはアセチル化により活性が抑制されているが、グルタミン酸生産誘導条件下では脱アセチル化されることで酵素活性が増加し、効率的なグルタミン酸生産に寄与していると考えている。

Corynebacterium glutamicum, glutamate production, phosphoenolpyruvate carboxylase

講演番号：2A37p10
講演日時、会場：3 月 27 日 15:49～ A 校舎 37 会場

ピルビン酸キナーゼ欠失が *Corynebacterium glutamicum* のリジン生産に与える影響

The effects of pyruvate kinase gene deletion on lysine production in *Corynebacterium glutamicum*

○横田 篤、柳瀬 真紀、愛甲 徹、和田 大（北大院農）
○Atsushi Yokota, Masaki Yanase, Tohru Aikoh, Masaru Wada (Hokkaido Univ.)

【目的】

オキサロ酢酸（OAA）はリジンやスレオニンを始めとしたアスパラギン酸属アミノ酸の前駆体であり，我々は *Corynebacterium glutamicum* において OAA 供給強化に向けた代謝改変を行い，物質生産の効率化を目指している．これまで我々は，ピルビン酸キナーゼ欠失（ΔPYK）変異およびホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ（PEPC）のフィードバック阻害（FBI）解除変異がグルタミン酸生産に有効であることを明らかにしており，リジン生産への応用が期待された．しかし，ΔPYK 変異がリジン生産に与える影響については諸説あり，未だ不明確である．そこで，本研究ではΔPYK 変異がリジン生産に与える影響を改めて解析した．また，既にリジン生産に有効であることが報告されている PEPC の FBI 解除変異とΔPYK 変異を組み合わせた二重変異株についても解析した．

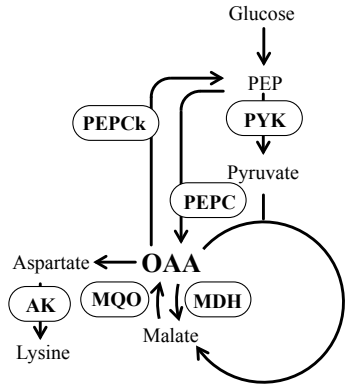
【方法】

C. glutamiucm ATCC 13032 に FBI 解除型のアスパラギン酸キナーゼ（AK^{fbr}）を組み込んだリジン生産株を親株として用いた．二重相同組換え法によりΔPYK 変異，PEPC の FBI 解除変異，およびその両方を導入し，得られた株をそれぞれ D2，R2，DR2 株とした．これらの 4 株を 2L 容ジャーファーメンターを用いて，リジン生産培地で培養し，その発酵特性の解析を行った．

【結果】

解析の結果, 既知の有効変異である PEPC の FBI 解除変異を単独で持つ R2 株ではリジン生産能が向上していたが，ΔPYK 単独変異株 D2 ではわずかな向上しか見られなかった. しかし, 両変異を併せ持つ DR2 株では，R2 株よりも高いリジン生産能を示したことから，ΔPYK 変異は PEPC の FBI 解除変異をバックグラウンドとした場合には明確にリジン生産に寄与することが示された．

OAA 周辺の酵素活性を測定したところ，D2，DR2 株でホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ（PEPCk）活性の低下が見られ，ΔPYK 変異による PEP から OAA 方向への流量の増強が示唆された. この 2 株では，リンゴ酸：キノン酸化還元酵素（MQO）活性の低下に伴う呼吸活性の低下も見られ，OAA の過剰な蓄積を回避するための応答と考えられた．



The central metabolic pathway leading to lysine formation in *C. glutamicum*

Corynebacterium glutamicum, Lysine production, Pyruvate kinase

講演番号：2A37p11
講演日時、会場：3 月 27 日 16:10～ A 校舎 37 会場

Bifidobacterium longum 105-A のメチオニン利用において *S*-リボシルホモシステインリアーゼが重要な役割を果たす
S-Ribosylhomocysteine lyase plays an important role in methionine utilization of *Bifidobacterium longum* 105-A
○和田 大、小松 一喜、松本 菜々恵、横田 篤（北大院農）
○Masaru WADA, Kazuki KOMATSU, Nanae MATSUMOTO, Atsushi YOKOTA (Hokkaido Univ.)

【背景と目的】ビフィズス菌はヒトの腸内細菌叢における主要構成菌群の一つであり、宿主に対して健康増進効果を示す。近年、ビフィズス菌はプロバイオティクスとして用いられ、サプリメントや食品等、産業的に広く利用されている。このような有用効果をもつビフィズス菌が腸内で増殖するためには、貧栄養環境である大腸において効率的に栄養源を資化する必要がある。ビフィズス菌の栄養源獲得機構については未だ不明な部分が多く、腸内での挙動を知るために栄養源の代謝への理解が求められてきた。しかし、ビフィズス菌の代謝研究については、オリゴ糖を含む糖代謝研究が中心であり、アミノ酸代謝、特に含硫アミノ酸代謝に関する知見は極めて少ない。そこで我々はビフィズス菌の必須アミノ酸であると考えられてきたシステインに注目した。これまで、ビフィズス菌は有機硫黄源としてシステインを要求するとされてきた。しかし我々の解析から、一部の菌株はシステインの代わりにメチオニンを単一硫黄源として生育可能であり、メチオニンをシステインへ代謝する逆流硫黄経路をもつことが明らかになった(1)。本研究では、逆流硫黄経路の一部である *S*-アデノシルメチオニン (SAM) 回路に着目し、遺伝子破壊実験を行った。
【方法と結果】逆流硫黄経路を有する *Bifidobacterium longum* 105-A 株を用いて、*S*-アデノシルホモシステインヒドロラーゼ (AhcY) をコードする *ahcY* の欠損株を作成した。AhcY は *S*-アデノシルホモシステイン (SAH) からホモシステインへの反応を行う酵素である。欠損はプラスミドを用いた挿入変異導入により行った。その後、システイン及びメチオニンをそれぞれ単一硫黄源とする最少培地で生育を観察したところ、いずれの培養条件においても野生株と欠損株の生育に明確な差は見られなかった。そこで、SAH から *S*-リボシルホモシステインを経由してホモシステインへと代謝するもう一つの経路に着目し、*S*-リボシルホモシステインリアーゼ (LuxS) をコードする *luxS* の欠損株を平山らの方法(2)を用いて作成した。同様に生育を観察したところ、メチオニンを単一硫黄源とする最少培地において、*luxS* 欠損株では野生株と比較して大幅な生育の低下がみられた。このことから、本菌において AhcY のメチオニン資化に対する寄与は小さく、LuxS が SAM 回路において主に機能している可能性が示唆された。現在、*ahcY* および *luxS* の二重変異株と各相補株を作成中である。

(1) 鈴木ら、2014 年度日本農芸化学会、講演番号 : 3A15p17
(2) Hirayama *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **78** (2012) : 4984-499

bifidobacteria, *S*-adenosylmethionine pathway, sulfur amino acid metabolism

講演番号：2A37p12
講演日時、会場：3 月 27 日 16:21～ A 校舎 37 会場

深海脱窒細菌 *Pseudomonas* sp. strain MT-1 の亜硝酸塩還元酵素の電子供与体の発現と精製
Expression and purification of electron donor for nitrite reductase in deep-sea denitrifier *Pseudomonas* sp. strain MT-1

○榛村 惟[1]、荒木 琢磨[2]、三本木 至宏[3]、掘越 弘毅[4]、加藤 千明[4]、為我井 秀行[1,2] ([1]日大院総合基礎科、[2]日大文理、[3]広大院生物圏科、[4]海洋機構)
○Yui SHINMURA[1], Takuma ARAKI[2], Yoshihiro SAMBONGI[3], Koki HORIKOSHI[4], Chiaki KATO[4], Hideyuki TAMEGAI[1,2] ([1]Grad. Nihon Univ., [2]Nihon Univ., [3]Hiroshima Univ., [4]JAMSTEC)

【目的】*Pseudomonas* sp. strain MT-1 はマリアナ海溝チャレンジャー海淵水深 11,000m から単離された深海脱窒細菌である。16S rRNA 配列において浅瀬もしくは陸上由来の *Pseudomonas stutzeri* や常在菌の *Pseudomonas aeruginosa* と近縁であるが、MT-1 は *P. stutzeri* や *P. aeruginosa* と比べて低温・高圧に耐性があることが示唆されている。脱窒とは窒素サイクルの一部を担う経路で、硝酸イオンを分子状窒素まで還元する逐次反応であり、窒素栄養源を生態系より奪うが、窒素サイクルを完成させる系として、地球環境の恒常性維持に重要な経路である。MT-1 は初めて深海から単離された脱窒細菌であり、本細菌を用いた研究を行うことで、深海における窒素サイクルやエネルギー代謝について解明されることが期待できる。本研究では、脱窒に関与する酵素の中の亜硝酸塩還元酵素に着目している。亜硝酸塩は生体内で有毒であるので速やかに還元する必要があるため、この酵素は脱窒系のなかで必須である。脱窒細菌の異化型亜硝酸塩還元酵素にはシトクロム cd_1 型(NirS)と銅型(NirK)の 2 種類があり、MT-1 は NirS を持つことが知られている。また、これまでの研究で MT-1 の亜硝酸塩還元酵素の電子供与体は *c* 型シトクロムの NirM であることが明らかとなった。そこで本研究では MT-1 の亜硝酸塩還元酵素 NirS とその電子供与体 NirM を用いて酸化活性測定を行い、MT-1 の亜硝酸塩還元酵素の深海環境への適応性について解明することを目的とした。
【方法】MT-1 の *nirM* 遺伝子を PCR で増幅し、構築したプラスミドを発現用大腸菌に導入し *c* 型シトクロムの発現株を構築した。構築した発現株を培養し、MT-1 の NirM を精製した。次に MT-1、*P. stutzeri*、*P. aeruginosa* を硝酸塩存在下で嫌気培養・集菌した。得られた菌体を破砕し、超遠心分離を行うことで NirS の粗酵素画分である可溶性画分を調製した。精製した NirM と調製したそれぞれの可溶性画分を用いて NirM 酸化活性における温度依存性、熱安定性について検討した。
【結果・考察】精製した NirM に対して、N-末端アミノ酸配列解析、ピリジンフェロヘモクロム法を行い、正常な発現を確認した。発現した NirM と調製した 3 つの菌体の可溶性画分を用いた活性測定の結果、温度依存性は 10℃～80℃まで 10℃刻みに測定すると MT-1 は 40℃、*P. stutzeri* は 50℃、*P. aeruginosa* は 60℃で最も活性が高くなった。熱安定性については、それぞれの可溶性画分を 25℃～50℃まで 5℃刻みに 10 min インキュベート後、20℃で活性測定を行った。その結果、MT-1 は *P. stutzeri* や *P. aeruginosa* に比べて高温側で不安定であることが明らかとなった。これらの結果から MT-1 の亜硝酸塩還元酵素は深海環境の特徴のひとつである低温に比較的適応することが示唆された。

denitrification, nitrite reductase, electron donor

講演番号：2A37p13
講演日時、会場：3 月 27 日 16:32～ A 校舎 37 会場

好冷好圧性細菌 *Shewanella violacea* DSS12 の無機ピロホスファターゼの発現と精製

Expression and purification of inorganic pyrophosphatase from piezo- and psychrophile *Shewanella violacea* DSS12

○石坂 光[1]、關 輝世[2]、秋元 理有[2]、三本木 至宏[3]、加藤 千明[4]、為我井 秀行[1,2] ([1]日大院総合基礎科、[2]日大文理、[3]広大院生物圏科、[4]海洋機構)
○Hikari ISHIZAKA[1], Teruyo SEKI[2], Riu AKIMOTO[2], Yoshihiro SAMBONGI[3], Chiaki KATO[4], Hideyuki TAMEGAI[1,2] ([1]Grad. Nihon Univ., [2]Nihon Univ., [3]Hiroshima Univ., [4]JAMSTEC)

【緒言】地球の過半数を占める海。その海の深く、「深海」は高圧で低温、さらには光がない、地上とは異なる過酷な環境である。このような環境下に生きる生物はどのような機構をもって生命を繋いでいるのだろうか。生物が好気的に呼吸している時、解糖系やクエン酸回路においてグルコース等が酸化され、NADH などの強い還元力の化合物が合成される。これらの化合物から複合体を介して酸化還元反応として電子の授受が生じ、プロトン濃度勾配を形成する(電子伝達)。これと共役した複合体Ⅴ(ATP 合成酵素)で ATP が合成される。合成された ATP から ADP と P_i への分解反応は生体内で幅広く用いられ、高エネルギーを与える重要な反応として知られている。本研究では、深海環境下(主に高圧下)での高エネルギーリン酸結合の挙動の解明を目的としている。しかし、ATP や ATPase は非常に複雑な構造をしているため、同じく高エネルギーリン酸結合をもつピロリン酸(PP_i)の分解反応($PP_i \rightarrow 2P_i$)を ATP 分解反応の単純なモデルとして用いた。PP_i の分解には、琉球海溝底泥から単離された好冷好圧性細菌である *Shewanella violacea* DSS12 の無機ピロホスファターゼ(SvPPase)を用いた。
【実験】DSS12 の PPase 遺伝子断片を PCR で増幅し、pMD19 vector に挿入した後、コロニーを選抜した。そこからプラスミドを抽出し、配列解析を行った。得られた PPase 遺伝子を pPAL7 vector に挿入し、精製用の Tag を付加した。発現用大腸菌を構築し、シャペロンを用いてタンパク質を発現させた。Bio-Scale Mini Profinity eXact Cartridges(アフィニティカラム)を用いタンパク質の精製を行った後、PP_i の分解活性を測定した。
【結果・考察】配列解析の結果より、データベース上の SvPPase の配列には、塩基の欠落によるフレームシフトが存在することが確認された。これより、今まで 624 bp と考えられていた ORF の全長が、918 bp であることが示唆された。タンパク質の発現は、インクルージョンボディの形成等により、発現の確認が難しかった。しかし、シャペロンを用い発現させると、可溶性画分での発現が多く見られた。発現確認後、アフィニティカラムへの吸着時間や吸着時の温度などを検討してタグフリーの SvPPase タンパク質を精製し、SDS-PAGE により発現と精製を確認した。タンパク質の活性測定を行うと、SvPPase の PP_i 分解活性における至適温度は 30～40℃である一方で、30℃以上の温度条件下では、20 分以上経過すると SvPPase が失活することがわかった。今後は高圧下での活性測定を行い、同属の非好圧性細菌との比較を行う。

high-energy phosphate bond, pyrophosphatase, deep sea

講演番号：2A37p14
講演日時、会場：3 月 27 日 16:43～ A 校舎 37 会場

Shewanella livingstonensis Ac10 の生育温度による *c* 型シトクロムの発現の違い
Regulation of *c* type cytochromes expression in *Shewanella livingstonensis* Ac10 with the growth temperature

○加藤 隆大[1]、迫田 彩日[2]、続木 麻里子[1]、門脇 芽里[1]、川本 純[3]、栗原 達夫[3]、為我井 秀行[1,2] ([1]日大文理、[2]日本大院総合基礎科、[3]京大化研)
○ Takahiro KATOU[1], Ayaka SAKODA[2], Mariko TSUZUKI[1], Meri KADOWAKI[1], Jun KAWAMOTO[3], Tatsuo KURIHARA[3], Hideyuki TAMEGAI[1,2] ([1]Nihon Univ., [2]Grad. Nihon Univ., [3]Kyouto Univ.)

【目的】*Shewanella livingstonensis* Ac10 は南極の海水から単離された好冷性細菌で、生育温度は 4℃～25℃、至適生育温度は 20℃である。ゲノム情報より Ac10 にはシトクロム c_4(Cyt c_4)とシトクロム c_5(Cyt c_5)の 2 種類の可溶性 *c* 型シトクロム、及び 2 種類のシトクロム *c* 酸化酵素が存在すると予想されている。これまでの Ac10 の細胞膜画分を用いた Cyt c_4 と Cyt c_5 の酸化活性における温度依存性に関する研究で、Cyt c_4 と Cyt c_5 ともに高温側で活性値が高くなることがわかっている。特に 10℃の時の Cyt c_4 の活性値は Cyt c_5 の活性値の約半分であったのに対し、40℃の時はほぼ同じ活性値となる。相対活性を見ると高温側では Cyt c_5 よりも Cyt c_4 の相対活性が高くなるため、低温側では Cyt c_5、高温側では Cyt c_4 が働き、生育温度によってシトクロムが使い分けられているのではないかと示唆される。そこで本研究では温度による呼吸系の使い分けが起こっているのかを調べるために、Cyt c_4 と Cyt c_5 の発現について検討した。また生育への影響を調べるために、2 種類の可溶性 *c* 型シトクロム、及び 2 種類のシトクロム *c* 酸化酵素それぞれの破壊株を構築している。
【方法】Ac10 の Δ*pyrF* 株を 4℃と 20℃で培養し、集菌した。得られた菌体を超音波により破砕し、超遠心分離により 2 種類の可溶性画分を調整した。得られた 2 種類の可溶性画分を用いて（還元型－酸化型）スペクトル測定を行った。さらに 2 種類の可溶性画分のタンパク質濃度を Lowry 法から求め、タンパク量を一定にして SDS-PAGE を行い、ヘム染色を行うことで生育温度による *c* 型シトクロムの発現量の違いを調べた。また 4℃と 20℃で培養した菌体からそれぞれ RNA を抽出して RT-PCR を行うことで、*c* 型シトクロムが転写の段階で発現の制御を受けているのかを調べた。さらに 2 種類の可溶性 *c* 型シトクロム及び 2 種類のシトクロム *c* 酸化酵素について遺伝子欠損法を用いてそれぞれの遺伝子破壊株を構築している。
【結果・考察】（還元型－酸化型）スペクトル測定の結果から 4℃で培養した時の 553nm の吸収極大が減少し、ヘム染色から 4℃で培養した時の方が Cyt c_4 と Cyt c_5 ともに発現量が減少していることが確認された。また RT-PCR からは生育温度による Cyt c_4 と Cyt c_5 の発現量の著しい変化は見られなかったため、Ac10 における Cyt c_4 と Cyt c_5 の生合成は転写後の段階で制御を受けるのではないかと考えられる。破壊株については現在構築を行っているところである。

c type cytochrome, respiratory system, growth temperature

講演番号：2A37p15
講演日時、会場：3 月 27 日 16:54～ A 校舎 37 会場

Shewanella amazonensis のシトクロム c_4 を用いた、異なる環境に生育する *Shewanella* 属細菌のシトクロム *c* 酸化酵素活性

The activity of cytochrome *c* oxidases of *Shewanella* grown under various environments using cytochrome c_4 from *Shewanella amazonensis*

○緑川 亮太[1]、加藤 千明[2]、三本木 至宏[3]、川本 純[4]、栗原 達夫[4]、為我井 秀行[1,5] ([1]日大院総合基礎科、[2]海洋機構、[3]広大院生物圏科、[4]京大化研、[5]日大文理)

○Ryota MIDORIKAWA[1], Chiaki KATO[2], Yoshihiro SAMBONGI[3], Jun KAWAMOTO[4], Tatsuo KURIHARA[4], Hideyuki TAMEGAI[1,5] ([1]Grad. Nihon Univ., [2]JAMSTEC, [3]Hiroshima Univ., [4]Kyoto Univ., [5]Nihon Univ.)

[目的] *Shewanella* 属は浅瀬から深海まで広い温度、圧力条件下において見られる細菌である。アマゾン川のデルタから単離された常温常圧性細菌である *Shewanella amazonensis*(SA)は至適生育温度が 37℃、至適生育圧力が 0.1 MPa である。*Shewanella* 属の一部の細菌ではシトクロム c_4(Cyt c_4)とシトクロム c_5 (Cyt c_5)の２種類の可溶性 *c* 型シトクロムが存在することが明らかになっている。そのうち、好冷好圧性細菌である *Shewanella violacea* DSS12(SV)では Cyt c_5 が生育圧力に関わらず常に発現するのに対し、Cyt c_4 は高圧培養時に発現が減少されていることが知られている。また、好冷常圧性細菌である *Shewanella livingstonensis* Ac10(SL)を用いた研究も進行中である。本研究では、*Shewanella* 属における Cyt c_4 とシトクロム *c* 酸化酵素の役割・機能の解明を目的とし、SA, SV, SL それぞれの膜画分による *S. amazonensis* の Cyt c_4 の酸化活性の温度依存性や耐圧性にどのような違いがあるのかを検討した。

[方法] SA Cyt c_4 発現プラスミドを組み込んだ大腸菌を培養し、集菌後、Cold Osmotic Shock 法、イオン交換クロマトグラフィー、硫安分画、ゲル濾過クロマトグラフィー、濃縮、洗浄をし、SA Cyt c_4 の精製をした。得られた SA Cyt c_4 をスペクトル測定、SDS ゲル電気泳動により精製確認を行った。次に SA , SV , SL をそれぞれ培養し、集菌後に超音波破砕、超遠心分離によって膜画分(mf)を調整した。この膜画分と SA Cyt c_4 を用いて、常圧下での Cyt c_4 酸化活性の温度依存性と、一定温度下での活性の耐圧性を測定した。また Cyt c_4 を加熱処理した後に活性測定を行うことで、その熱安定性を検討した。

［結果・考察］精製した Cyt c_4 は還元型で 553 nm に特異的なピークが検出された。ヘム染色と CBB 染色の結果から、約 20 kDa のところにバンドが確認できた。Cyt c_4 の熱安定性は熱処理をしたものと未処理のものでは差が生じなかったため、熱に不安定ではないということが確認された。常圧下での酸化活性の温度依存性では SA_mf , SV_mf では高温側での活性の上昇が高く、SL_mf は高温側での活性の上昇が低くなっていた。高圧下での一定温度下での耐圧性では、SL が 125 MPa 以降で失活しているのに対し、他の２種では失活が見られなかった。温度依存性・耐圧性の結果から、高圧や比較的温度の高い環境下に生息する菌のシトクロム *c* 酸化酵素は構造が強いのではないかということが示唆される。

Shewanella, cytochrome c_4, cytochrome *c* oxidase

講演番号：2A37p16
講演日時、会場：3 月 27 日 17:15～ A 校舎 37 会場

ユーグレナのワックスエステル生合成の駆動に必須の無機炭素固定経路

Inorganic carbon fixation into wax esters in *Euglena gracilis*

○西尾 和樹[1]、小川 拓水[1]、パデルムショーク アチャラ[1]、岡澤 敦司[1]、古橋 剛[2]、中澤 昌美[1]、有田 正規[3]、太田 大策[1]([1]阪府大院生命環境、[2]理研 CSRS、[3]国立遺伝研)
○ Kazuki Nishio[1], Takumi Ogawa[1], Adchara Padermshoke[1], Atsushi Okazawa[1], Takeshi Furuhashi[2], Masami Nakazawa[1], Masanori Arita[3], Daisaku Ohta[1] ([1]Grad. Sch. Life & Env. Sci., Osaka Pref. Univ., [2]RIKEN CSRS, [3]NIG)

ユーグレナ（*Euglena gracilis*）は，細胞内に緑藻類の二次共生に由来するとされる三重膜の葉緑体を持つ，光合成能を有する鞭毛虫の一種である．好気条件下では，光合成によって大気中の二酸化炭素を固定し，パラミロン（β-1,3-グルカン）を貯蔵多糖として細胞内に蓄積する．嫌気条件下，パラミロンは脂肪酸と脂肪族アルコールのモノエステル体であるワックスエステル（WE）生合成の主要炭素源となる．ユーグレナの WE は，不飽和結合を含まないこと，myristyl myristate（14:0-14:0）を主成分とすること，奇数鎖の脂肪酸と脂肪族アルコールを含むことが知られている．これらの特徴から，より長い鎖長の脂肪酸を主成分とする植物や動物由来のバイオディーゼルとは異なる用途での利用が期待されている．

我々はこれまでに，光照射下で培地中に二酸化炭素が存在しない条件では，嫌気条件であっても WE がほとんど蓄積しないことを明らかにした．この時，培地への二酸化炭素供給は WE 生合成を回復させたことから， WE 生合成には培地からの二酸化炭素供給が必須であると考えられた．^{13}C 安定同位体標識した二酸化炭素を添加して培養したところ，WE を構成する脂肪酸への ^{13}C の取り込みが確認できた．次に，WE の構成成分である脂肪酸と脂肪族アルコールを網羅的に分析し，個々の脂質分子への ^{13}C の取り込みを解析したところ，偶数鎖と比較して，奇数鎖の脂肪酸と脂肪族アルコールに ^{13}C が優先して取り込まれていた．この結果は，培地に添加した二酸化炭素は主に奇数鎖脂肪酸の合成経路から固定され，WE 生合成に直接利用される事を示している．WE を構成する奇数鎖脂肪酸は，解糖によって生成したホスホエノールピルビン酸から逆クエン酸回路の一部（オキサロ酢酸→リンゴ酸→フマル酸→コハク酸）を経由して合成されるプロピオニル CoA が脂肪酸生合成のプライマーとして利用されると考えられている．そこで，リンゴ酸とコハク酸への ^{13}C 取り込みを精査したところ，リンゴ酸とコハク酸への ^{13}C 取り込みは二酸化炭素添加後 5 分以内に確認された．これらの結果から，二酸化炭素取り込みに関与する主要酵素は，ホスホエノールピルビン酸をオキサロ酢酸へ変換するホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ（PEPCK）であると推察した．

Euglena gracilis, Wax ester, Inorganic carbon fixation

講演番号：2A37p17
講演日時、会場：3 月 27 日 17:26～ A 校舎 37 会場

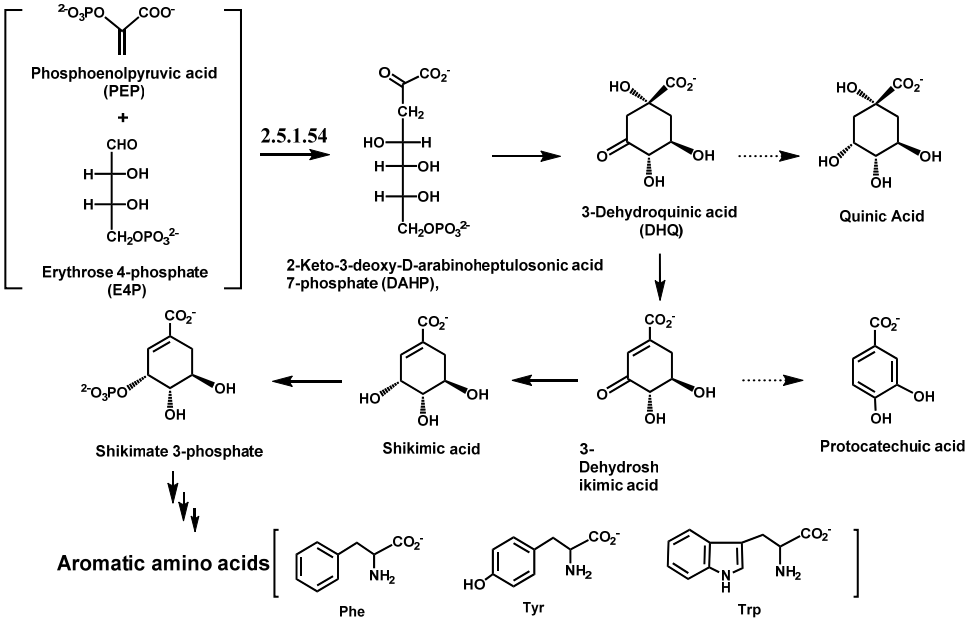
キノコ菌糸のシキミ酸経路を青色光刺激で制御する
Regulation of Shikimic Acid Pathway in Mushroom Mycelia by Blue Light Stimulation

○小嶋 政信[1]、木村 仁奈子[2]、三浦 竜平[1] ([1]信州大院農、[2]信州大農)
○Masanobu KOJIMA[1], Ninako KIMURA[2], Ryuhei MIURA[1] ([1]Grad. Sch. of Agri., Shinshu Univ., [2]Fac. of Agri., Shinshu Univ.)

キノコの生長速度や形態形成の制御、並びに含有機能性栄養成分の生合成には、光刺激が重要な役割を演じていると推察されているが、キノコの光応答メカニズムはほとんど解明されていない。

我々は、発光ダイオード（LED）が持つ光源特性を利用して、ヒラタケ菌糸の生長に及ぼす単色可視光の光質と光強度の影響について研究したところ、菌糸に青色光刺激を与えると菌糸生長が完全に抑制される現象を見出した。青色光刺激による菌糸の生長抑制現象を詳細に検討するため，青色光刺激を与えた菌糸の一次代謝産物を網羅的に解析した結果、鳥インフルエンザ特効薬として知られるタミフルの製造原料となるシキミ酸が、暗所培養菌糸と比較して飛躍的に増加していることを見出した。しかし緑色光、赤色光、遠赤色光を菌糸に照射してもシキミ酸は全く増加しなかった。

シキミ酸は、解糖系で生合成されるホスホエノールピルビン酸（PEP）と、ペントースリン酸経路で生合成されるエリトロース-4-リン酸(E4P)との縮合反応による 7 - ホスホ-2-デヒドロ-3-デオキシアラビノヘプトン酸（DAHP）を経由して生合成されることから、ヒラタケ菌糸への青色光刺激によるシキミ酸の蓄積は、解糖系の律速反応酵素である 6-ホスホフルクトキナーゼ（PFK)、ペントースリン酸経路の律速反応酵素であるグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ（G6DP）及びシキミ酸経路の律速反応酵素である DAHP 合成酵素の各発現量が増加したことに起因すると推定した。そこでこれら３つの酵素をコードする遺伝子の発現量と、３つの酵素の発現量を解析したところ、青色光刺激による遺伝子発現量と酵素発現量は、いずれも時系列的に増加することを見出した。本新知見は、糸状菌から有用物質を生産する新規技術としても大変重要であり、今後の応用が期待される。



blue light stimulation, mushroom mycelia, shikimic acid

講演番号：2A37p18
講演日時、会場：3 月 27 日 17:37～ A 校舎 37 会場

青色光刺激によるシキミ酸蓄積能の高いキノコ菌糸のスクリーニング

Screening of Mushroom Mycelia with High Accumulation Capacity of Shikimic Acid by Blue Light Stimulation

○木村 仁奈子[1]、小嶋 政信[2]、市村 昌紀[3]、三原 聡[3]([1]信州大農、[2]信州大院農、[3]JA 中野市)
○Ninako KIMURA[1], Masanobu KOJIMA[2], Masaki ICHIMURA[3], Satoshi MIHARA[3] ([1]Fac. Agri., Shinshu Univ., [2]Grad. Sch. of Agri., Shinshu Univ., [3]JA Nakanoshi)

[序]発光ダイオード(LED)が持つ光源特性を利用して、ヒラタケ菌糸の生長に及ぼす単色可視光の光質と光強度の影響を検討したところ、菌糸に青色光刺激を与えると新型インフルエンザ治療薬の製造原料として用いられるシキミ酸が飛躍的に増加することを見出し、本新規技術を「糸状菌から有用代謝産物を生産する方法（国際出願番号：PCT/JP2012/070017）；国際公開番号：W02013/035473」として、日本・米国・加国・中国・韓国・印国・欧州に権利化を移行した。本研究では、上記特許技術の実用化を目指す上で、ヒラタケ菌糸よりもよりシキミ酸蓄積能の高いキノコ菌糸を探索することを目的として、14 種類のキノコ菌糸を用いてシキミ酸蓄積量を比較したところ、ヒラタケよりもシキミ酸蓄積能の高い菌糸を見出したので報告する。

[実験]供試菌は、パイレックス製シャーレを用いて、グルコース／ポリペプトン／イースト抽出物（GPY）を栄養分として含む寒天培地上、暗所 20℃で直径約 7cm に生長するまで培養した後、青色 LED（470nm、PFD=150 μmol m^{-2} s^{-1}）を 48 時間照射した。光照射した菌糸 50mg をスクレーバーで掻き取り、液体窒素温度下で破砕した後、水-メタノール-クロロホルムで水層中にシキミ酸を抽出し、HPLC で定量した。

[結果と考察]図 1 に示すように、ウスヒラタケのキノコ菌糸では菌糸 1kg あたり最大で 0.95g のシキミ酸蓄積が見られた。これは本特許の技術をウスヒラタケに用いれば、菌糸 1kg あたり 173g/年(0.95g×(365 日/2 日))のシキミ酸が得られることになり、主なシキミ酸供給原料であるトウシキミから得られるシキミ酸 30～80g/年を大きく上回る。

現在、さらにシキミ酸蓄積能の高いキノコ菌糸を探索するとともに、キノコ菌糸のシキミ酸生合成に関与する遺伝子発現量の違いについて解析を進めている。

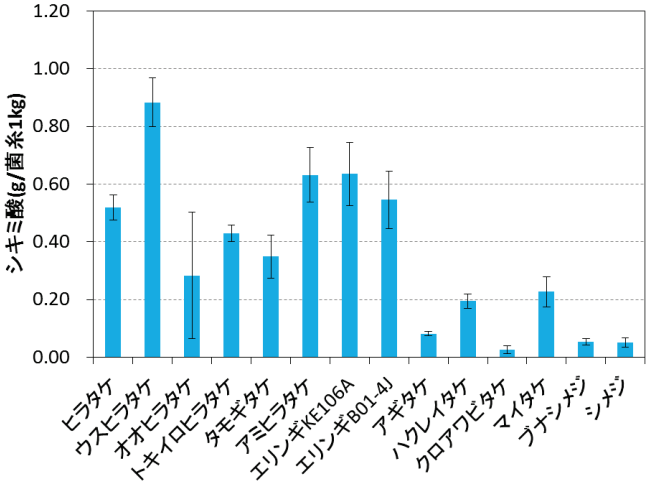


図1. 青色光刺激によるキノコ菌糸のシキミ酸蓄積能
(菌糸1kgあたりのシキミ酸蓄積量)
照射条件: 470nm、PFD=150μmol m^{-2} s^{-1}、48時間

blue light stimulation, shikimic acid, mushroom mycelia

講演番号：2A37p19
講演日時、会場：3 月 27 日 17:48～ A 校舎 37 会場

キノコ菌糸含有抗腫瘍活性物質並びに癌関連転移遺伝子発現抑制物質の探索

Screening of substances with antitumor activity and repression of cancer metastasis associated gene in mushroom mycelia

○三浦 竜平、小嶋 政信、藤井 博（信州大院農）
○Ryuhei Miura, Masanobu Kojima, Hiroshi Fujii (Grad. Sch. of Agri ., Shinshu Univ.)

［序］食用キノコとして世界第二位の栽培量を誇るヒラタケ（*Pleurotus ostreatus*）の菌糸を、グルコース-ポリペプトン-イースト抽出物（GPY）を含む寒天培地上で暗所培養した。この菌糸からの水層粗抽出物並びに有機層粗抽出物を、ヒト悪性前立腺細胞株 PC-3 の培養液に添加し 48 時間培養したところ、有機層粗抽出物を添加した場合には、癌細胞増殖抑制効果と癌転移関連遺伝子 FABP5（Faty Acid Binding Protein 5）の発現抑制効果が確認されたので報告する。

［実験］PC-3 細胞株を、RPMI 1640 培地を栄養分とする培養液で前培養した。この培養液中に、キノコ菌糸から水-メタノール-クロロホルムで処理して得られた有機層粗抽出物をエタノールに溶解して 0.5%～2.0%添加し、さらに 48 時間培養した。有機層粗抽出物の代わりにエタノールだけを添加したサンプルを対照とした。また、各サンプルから市販の RNA 抽出キットを用いて全 RNA を抽出し、FABP5 の発現量を 18S リボソーム RNA を内在性コントロールとして定量した。

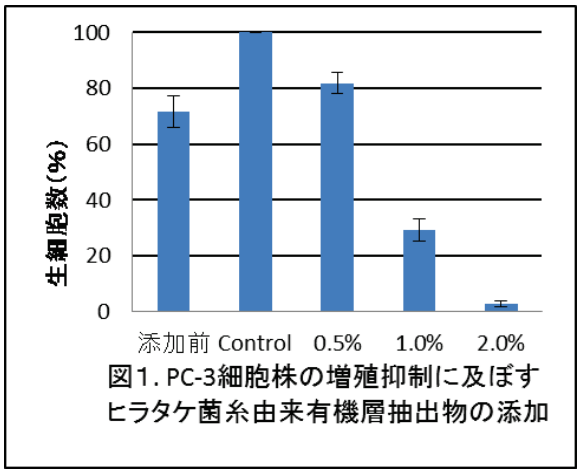


図1. PC-3細胞株の増殖抑制に及ぼすヒラタケ菌糸由来有機層抽出物の添加

［結果と考察］有機層粗抽出物の PC-3 細胞増殖抑制効果を図 1 に、FABP5 の発現量抑制効果を図 2 に示す。有機層粗粗抽出物 0.5%添加で約 20%、1.0%添加で約 70%の細胞増殖抑制効果が確認された。

一方、水層粗抽出物には、癌細胞増殖抑制と FABP5 発現抑制効果はなかった。GL サイエンス製 C18 スピンカラムを用いて有機層粗抽出物を 70%エタノール水溶液画分とクロロホルム溶出画分に分離し、各溶出画分の PC-3 細胞増殖抑制効果並びに FABP5 発現抑制効果を検討するとともに、HPLC を用いて各画分の含有成分を分析した。これらの結果を含めて、含有抗癌活性物質の候補物質について議論する。

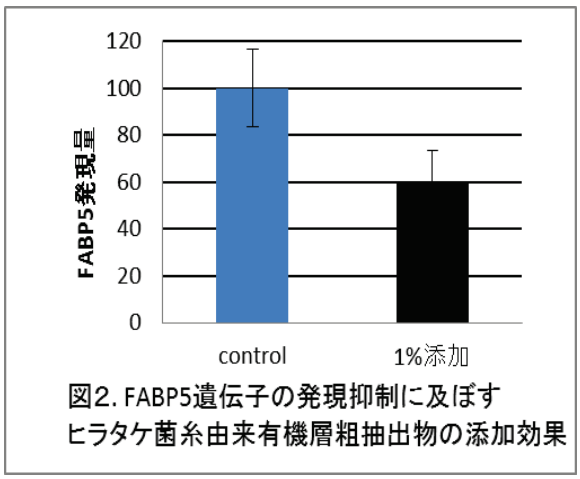


図2. FABP5遺伝子の発現抑制に及ぼすヒラタケ菌糸由来有機層粗抽出物の添加効果

mushroom mycelia, antitumor activity

講演番号：2A41a02
講演日時、会場：3 月 27 日 09:11～ A 校舎 41 会場

ブドウ滓サイレージからの乳酸菌の分離と性質

Isolation and characterization of lactic acid bacteria from marc silage

○小西 啓太[1]、乙黒 美彩[1]、岸本 宗和[1]、古屋 元宏[2]、柳田 藤寿[1] ([1]山梨大院.ワイン研、[2]山梨県畜産試験場)
○KEITA KONISHI[1], MISA OTOGURO[1], MUNEKAZU KISHIMOTO[1], MOTOHIRO FURUYA[2], FUJITOSHI YANAGIDA[1] ([1]The Institute of Enology and Viticulture, University of Yamanashi, [2]Yamanashi Prefectural Livestock Experimental Station)

【目的】　畜産業においては、糞尿等から発生する揮発性脂肪酸(VFA)を主体とする悪臭が大きな問題の一つであり、その抑制が求められている。山梨県の牧場では、ワイン醸造工程から生じるブドウ滓を発酵したサイレージを家畜に与えたところ、経験的に悪臭の軽減が認められることから、乳酸菌などの微生物の作用が推測される。本研究ではブドウ滓サイレージから乳酸菌の分離を試み、その性質を調査することを目的とする。

【方法】　山梨県甲斐市の牧場において 2013 年にバンカーサイロで発酵したブドウ滓サイレージを上層(表層～10cm)、中層(10cm～30cm)、下層(30cm～)の 3 箇所からサンプリングした。DNA の抽出は PowerSoil® DNA Isolation Kit を用い、乳酸菌に特異的な Lac1、Lac2 をプライマーとした、DGGE 多型解析を行った。乳酸菌の分離は炭酸カルシウムを加えた MRS、BCP、GYP の各培地で嫌気条件下にて 30℃、35℃、40℃の温度で行った。分離株について乳酸生成能、16S rRNA 遺伝子の塩基配列解析、*Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* JCM1157^T を指示菌に用いた抗菌活性、および VFA 分解能の性質を調べた。

【結果】　ブドウ滓サイレージから抽出した DNA の DGGE 解析から、上層、中層、下層のすべてに多様な乳酸菌が存在し、それぞれの層で菌叢が異なることが示された。次に各層から乳酸菌の分離を試みたところ、上層から 22 株、中層から 67 株、下層から 75 株の計 164 株が分離された。培養温度が 35℃の場合においては分離された株が最も多かったが、40℃においても中層から 7 株、下層から 12 株が分離され、これらの 19 株はいずれも乳酸生成能が高い株であった。下層には *Lactobacillus* 属、*Weisslla* 属、*Enterococcus* 属などが認められ、特に *Lactobacillus* 属の中には牧草サイレージに一般的に認められる *Lb. coryniformis* のほか、ワインの汚染菌である *Lb. hilgardii* も見出された。一方、分離株 164 株の抗菌活性試験において 13 株が高い活性を示し、これらはすべて下層から見出された株であった。このことから下層から分離された乳酸菌は、悪臭の原因菌の一種とされる黄色ブドウ球菌などの生育抑制が期待される。現在、分離株の VFA 分解能について調査するとともに、分離株を用いた効果的な悪臭抑制方法の検討を進めている。

lactic acid bacteria, volatile fatty acid, bacteriocin

講演番号：2A41a03
講演日時、会場：3 月 27 日 09:22～ A 校舎 41 会場

共培養による乳酸菌の新規分離法の開発（酵母エンハンス法）

Development of new isolation method of lactic acid bacteria by co-culture

○前田 康太郎、乙黒 美彩、岸本 宗和、柳田 藤寿（山梨大院. ワイン研）
○KOTARO MAEDA, MISA OTOGURO, MUNEKAZU KISHIMOTO, FUJITOSHI YANAGIDA (The Institute of Ecology and Viticulture,University of Yamanashi)

【目的】

乳酸菌の分離において、現在確立されている方法では非優先種である乳酸菌を分離することが困難である。新しい分離方法の開発ができれば、未だ報告されていない有用な乳酸菌の発見が期待される。本研究では古来より発酵食品において乳酸菌と酵母が共存するものがあることに着目した。酵母が存在することによる乳酸菌の生育への影響を、共培養を用いて解明し、優先種の除去、非優先種の増加による希少乳酸菌分離方法の開発を目指した。

【方法・結果】

本研究には山梨大学ワイン科学研究センターが所有する酵母バンクの中から、MRS 培地で生育することが確認されている *Saccharomyces cerevisiae* RIFY1001、*Cryptococcus albidus* RIFY2036、*Zygosaccharomyces rouxii* RIFY 2078、*Schizosaccharomyces pombe* RIFY 4021、*Kluyveromyces marxianus* RIFY 4040、*Pichia fermentans* RIFY 4078 の計 6 種類を用いた。また、乳酸菌は *Enterococcus* 属 1 種、*Kandleria* 属 1 種、*Lactobacillus* 属 8 種、*Lactococcus* 属 1 種、*Leuconostoc* 属 1 種、*Pediococcus* 属 2 種、*Streptococcus* 属 2 種、*Weissella* 属 4 種の計 20 種を用いた。各乳酸菌、酵母を MRS 液体培地にて 30℃で 48 h 培養後、各ウェルに MRS 液体培地 2ml を入れた 12 ウェルプレートに乳酸菌・酵母のそれぞれ 30μl ずつを接種した。乳酸菌のみを 60μl 接種したものをコントロールとした。 30℃で 24 h 共培養後、シクロヘキシミド（50mg/l）を含む MRS プレートに培養液を塗布し、48 h 培養後のコロニー数を計測した。乳酸菌と酵母の共培養の全 120 組の中で 10 倍以上のコロニー数を示した組み合わせは 3 組存在し、その中でも *L. alimentarius* と *P. fermentans* の組み合わせは約 55 倍のコロニー数を示した。逆に 1/10 以下のコロニー数を示した組み合わせは 6 組存在し、その中でも *S. salivarius* subsp. *Salivariuc* と *S. cerevisiae* の組み合わせは約 1/30 以下のコロニー数を示した。この結果から、酵母との共培養によって生育が大幅に増加する場合と大幅に減少する場合があることが明らかになった。

lactic acid bacteria, co-culture

講演番号：2A41a04
講演日時、会場：3 月 27 日 09:33～ A 校舎 41 会場

モンゴル国産発酵食品及び花から分離した酵母と *Metschnikowia* 属の 2 新種について
Yeasts isolated from Mongolian fermented foods and flowers and two novel species of the genus *Metschnikowia*

○Jambaldorj Ulziichimeg、山崎 敦史、鶴海 泰久、安藤 勝彦（製品評価技術基盤機構（NITE））
○Ulziichimeg Jambaldorj, Atsushi Yamazaki, Yasuhisa Tsurumi, Katsuhiko Ando (National Institute of Technology and Evaluation (NITE))

目的　NITE バイオテクノロジーセンター（NBRC）では、産業支援のため、アジア諸国において多様な微生物の探索を行っている。本研究では、モンゴル国において様々な発酵食品及び花から酵母菌を分離して傾向を調べ、また、分類学的新規性が認められた酵母についてはその諸性質を調査した。
方法　2013 年にモンゴル国 Arkhangai 県、Uvurkhangai 県、Selenge 県、Darkhan 県及び Tuv 県に赴き、馬乳酒等の乳製品 27、花 21 及び漬け物 3 を収集した。取得した試料から YM20 培地（20% Glucose, 0.3% Malt extract, 0.3% Yeast extract, 0.5% Peptone, 1.5% Agar）を用いて 28℃と 37℃で 3 日間集積培養した後、希釈平板培養法により酵母 138 株を分離した。分離酵母株は 26S rRNA D1/D2 領域塩基配列（以下、26S rRNA）の解析による簡易同定を行った。新規性が認められた酵母株については、分子系統解析、発酵能、資化性能、キノン側鎖及び GC 含量等の分類学的評価を行った。
結果と考察　26S rRNA 解析の結果、乳製品試料の内、馬乳酒から *Dekkera anomala*、*Saccharomyces cerevisiae* 及び *Kluyveromyces marxianus* が高頻度で分離された。酸生産能を有す *D. anomala* は、馬乳酒の酸味に寄与していると考えられた。また *S. cerevisiae* 及び *K. marxianus* は馬乳酒中に含まれるエタノールの生産に関与していると考えられた。
花試料からは *Saccharomyces* 属、*Metschnikowia* 属及び *Meyerozyma* 属が多く分離された。このうち 2 株（MN13-F0057 及び MN13-F0074）はそれぞれシソ科の植物（*Dracocephalum foetidum* 及び *Phlomis tuberosa*）由来であり *Metschnikowia* 属の新種であると考えられた。MN13-F0057 株の最も近縁な種は *M. lachancei* であり、分類学的基準株 NRRL Y-27242^T との相同性は 96.02%であった。また、MN13-F0074 株の最も近縁な種は *M. lunata* であり、基準株 NBRC 1605^T との相同性は 96.52%だった。26S rRNA 塩基配列を用いた分子系統解析を行ったところ、2 株は *Metschnikowia* 属のクレードに位置した。
MN13-F0057 株は紡錘糸（スピンドル）状の胞子形成が認められ、最近縁種のものと類似した形状であった。また、生理性状試験の結果、Treharose、D-Mannitol、D-Sorbitol、Succinate 及び D-Glucosamine の資化性能が異なった。さらに、本菌株を Nile Red 染色し蛍光顕微鏡観察すると、細胞内に油滴を蓄積する性質を有すことが明らかになった。一方、MN13-F0074 株は近縁種とは、Citrate の資化性能が異なったが、胞子形成が認められなかった。以上の解析結果より、今後当該 2 株を *Metschnikowia* 属の新種として提案する予定である。

Mongolian yeast isolation, Flowers and fermented foods, *Metschnikowia* sp. nov.

講演番号：2A41a05
講演日時、会場：3 月 27 日 09:44～ A 校舎 41 会場

Debaryomycetaceae 科に属するインドネシア産新種酵母
Novel yeast species belonging to *Debaryomycetaceae* family from Indonesia.
○小林 隆一[1]、Atit Kanti[2]、川崎 浩子[1] ([1]製品評価技術基盤機構・NBRC、[2]LIPI, Indonesia)
○Ryuichi Kobayashi[1], Atit Kanti[2], Hiroko Kawasaki[1] ([1]NITE-NBRC, [2]LIPI, Indonesia)

木質系バイオマスからのエネルギー生産及び有用物質生産を念頭に、五単糖を資化するインドネシア産酵母の探索を行ってきた。朽木を中心として試料を採取し、得られた酵母の 26S rRNA D1/D2 領域に基づく分子系統学的解析を行ったところ、単離された株の半数以上が *Debaryomycetaceae* 科ならび *Wickerhamomycetaceae* 科に属する酵母である事がわかった。*Debaryomycetaceae* 科は、*Scheffersomyces* 属や *Spathaspora* 属など五単糖からのエタノール発酵能を持つ株が知られている。

本研究において、3 種の新規酵母を見出し、すでに 1 種は前回の農芸化学会で発表し論文を投稿中である。本発表では 2 種について分類学的研究を行ったので報告する。分子系統樹よりそれぞれ *Lodderomyces* 属、*Yamadazyma* 属に属することが確認され、一方はヘキサデカンの資化という *Lodderomyces* 属の特徴を有し、イヌリンを資化する点で他種と異なる。*Yamadazyma* 属新種酵母もイヌリンの資化性で他の種と違いが見られた。これらの差異と、いくつかの炭素源・窒素源の資化を初めとする諸性質の違いにより本酵母を新種であると断定した。

本発表では分子系統解析ならびに化学・生化学的各種解析結果を基に新種酵母の提案を行い、本酵母のキシロース分解に関わる性質について報告する。

本研究は地球規模課題対応国際科学技術協力事業(SATREPS)におけるインドネシア･LIPI との共同事業の下で実施されたものである。

Debaryomycetaceae, Xylose utilization, Novel species

講演番号：2A41a06
講演日時、会場：3 月 27 日 10:05～ A 校舎 41 会場

MALDI-TOF MS を用いた *S10*-GERMS 法に基づく *Alicyclobacillus acidoterrestris* および *A.acidocaldarius* の識別

Discrimination of the *Alicyclobacillus acidoterrestris* and *A.acidocaldarius* by MALDI-TOF MS Based on the *S10*-GERMS Method

○鈴木 真弓、細田 晃文、田村 廣人（名城大学）
○Mayumi SUZUKI, Akihumi HOSODA, Hiroto TAMURA (Meijo Univ.)

【背景・目的】

細菌の同定は、主に 16S rRNA 遺伝子の塩基配列を利用した方法が多く用いられている。しかし、この遺伝子を用いた方法では解析までに時間とコストがかかる。そこで近年、正確で簡便、迅速に細菌を識別する方法としてマトリックス支援レーザー脱離イオン化-飛行時間型質量分析法(MALDI-TOF MS)を用いた方法が登場した。この方法は MALDI-TOF MS によって得られる細菌のマススペクトルをデータベースと比較することで細菌を同定する(マスフィンガープリント法)。しかし、このマスフィンガープリント法は培養条件などの違いによってスペクトルに違いが出るなどの解決しなければならない課題がある。

よって、本研究室ではこれらの課題を解決するためには遺伝情報に基づいた理論的な質量の裏付けが必要であると考え、25 種以上のリボソームタンパク質をコードする *S10-spc-alpha* オペロンに着目した。*S10*-GERMS 法は主に本オペロン上にコードされるリボソームタンパク質をバイオマーカーとして細菌を識別する方法である。本研究ではこの *S10*-GERMS 法を用いて、飲料水の変敗に関わるグアイアコール産生細菌である *Alicyclobacillusacidoterrestris*(AAT) とその近縁種である *A. acidocaldarius*(AAC)の識別を試みた。

【方法】

ゲノム解読されている *Alicyclobacillus* 属細菌の理論質量はリボソームタンパク質の塩基配列から計算した。一方、ゲノム解読されていない *Alicyclobacillus* 属細菌は *S10-spc-alpha* オペロンを解読することで理論質量を求めた。得られた理論質量は MALDI-TOF MS の実測値により校正した。質量を校正したリボソームタンパク質をバイオマーカーとして野生株の識別を行った。

マトリックス剤にはシナピン酸を用いた。測定用プレートに菌体およびマトリックス溶液を直接塗布し、風乾後、ポジティブイオンのリニアーモードで、m/z が 2,000 - 40,000 の範囲を測定した。

【結果・考察】

本研究で使用した AAT と AAC は性状が異なるため､飲料メーカーでは迅速な識別が求められている。本 *S10*-GERMS 法を用いることで 2 種は極めて迅速･簡便に同定･識別できることが明らかとなった。また、同種間で変異しているタンパク質をバイオマーカーとして用いることでさらに詳細な識別が可能であることが示唆されたので報告する。

S10-GERMS method, Ribosomal protein, MALDI-TOF MS

講演番号：2A41a07
講演日時、会場：3 月 27 日 10:16～ A 校舎 41 会場

分離源抽出液培地を用いた高温コンポストからの新規細菌の分離
Isolation of novel bacteria from a high temperature compost, using the compost extract-containing media.
○三浦 ちはや、湯本 勲（北大農）
○Chihaya MIURA, Isao YUMOTO (Hokkaido Univ.)

多様な環境から微生物を分離し有用な遺伝子を探索することは、生物資源の新たな利用の検討に有効である。熱水噴出孔、地熱地帯、温泉などの高温環境から分離された細菌は耐熱性酵素生産など様々な産業に利用されている。このことから新規好熱菌を分離することは有用な生物資源の発見につながり、産業利用に寄与することが期待される。

60～90℃以上に高温化するコンポストはその作製法や運用法によって多様なものが存在する可能性がある。本研究で用いたコンポストは最高温度が 90℃～100℃以上になる。また、分離時に分離源のエキスを用いる研究例は未だそれほど多くない。分離源のコンポスト抽出液には通常の培地の成分に含まれていない成分が含まれている可能性がある。そのため分離源コンポストの抽出液を用いて新規微生物分離の可能性を確かめた。

本研究の目的は高温コンポストから様々な培地を用いて新規微生物を分離することである。

本研究では 6 種類の培地を用い、60、75℃で分離を行うという方法をとった。培地には蒸留水を使用したものと、分離源であるコンポストの抽出液またはその希釈液を用いた。そのほかの培地組成には①ペプトンとカツオエキスの寒天培地　②ペプトンとカツオエキスのゲランガム培地　③ペプトン・酵母エキス・デンプンと微量の金属塩を添加したゲランガム培地の 3 種類を用いた。それぞれの培地で分離した菌株の部分的 16S rRNA 配列を解析、系統樹を作成し、既知種と相同性が低かったものを選抜して全 16S rRNA 解析を行い、分類学的検討を行った。また、それらの菌株について生育可能・至適温度/pH を測定し、APi20E/20NE、50CH、APIZYM や高分子分解実験による性状試験を行った。

結果として 69 株単離し、そのうち 53 株について部分的 16S rRNA 配列解析を行った。そのうち既知種と相同性が低かった菌株について全 16S rRNA 配列解析を行った。その結果これら 6 株は既知種との相同性が 97%以上 98%未満が 3 株、95%未満が 3 株を示した。また、コンポスト抽出液を使用した培地と蒸留水培地では分離される属が異なっていた。6 株はすべてコンポスト抽出液使用培地から分離された。

本研究では好熱性新規細菌 6 株の分離に成功した。また、分離源のエキスを培地に用いることで、新規の菌株を含めた様々な微生物が分離できることが示唆された。

novel bacteria, high temperature, compost

講演番号：2A41a08
講演日時、会場：3 月 27 日 10:27～ A 校舎 41 会場

日本の高山マメ科植物から単離した根粒菌の系統と宿主特異性

Phylogeny and host specificity of rhizobia isolated from Japanese alpine legumes

○瀬尾 直登、高梨 功次郎、矢崎 一史（京都大学生存圏研究所）
○ NAOTO SEO, KOJIRO TAKANASHI, KAZUFUMI YAZAKI (Research Institute for Sustainable Humanosphere, Kyoto Univ.)

【緒論】マメ科植物は、その根において根粒菌との共生による窒素固定を行う。そのため、マメ科植物は他科の植物が生育できないような貧栄養土壌においても生育することが可能である。この貧栄養土壌での生存を支える窒素固定能は、植物の窒素獲得戦略上はもちろん、作物の収量増加という観点から見ても利点が大きい。実際の圃場においても、窒素固定能の高い根粒菌を石灰コートでコーティングした種子を農業利用するなど、収量の増加を図る応用展開が進められている。このマメ科植物－根粒菌の共生関係はある程度厳密な宿主特異性を持つが、その特異性の決定機構の多くは未解明のままである。本研究では、生物の進出・減退が少なく隔離された環境である高山帯におけるマメ科植物－根粒菌共生系に着目し、野生集団における宿主特異性を生育地域や宿主植物の違いから調べることを目的とした。
【結果】日本の高山帯 5 地点より 2 種のマメ科植物、オヤマノエンドウ（*Oxytropis japonica*）および、イワオウギ（*Hedysarum vicioides*）を採取し、それぞれから共生根粒菌を単離した。単離した根粒菌について複数のバーコード遺伝子を用いて系統樹解析を行ったところ、全ての根粒菌が *Mesorhizobium* 属であり、採取地域ごとにゆるいクラスターを形成することが分かった。さらに共生窒素固定関連遺伝子群に着目して系統樹解析を行ったところ、調べたほとんどの遺伝子が宿主植物ごとにクラスターを形成した。続いて各根粒菌の宿主特異性を調べたところ、採取したほとんどの根粒菌が異なる地域および宿主のマメ科植物に対して共生能を有することが分かった。本大会ではこれらの実験結果および根粒菌の競合実験の結果を基に、根粒菌の系統と宿主特異性ついて報告する。

rhizobia-legume symbiosis, host specificity, phylogeny

講演番号：2A41a09
講演日時、会場：3 月 27 日 10:38～ A 校舎 41 会場

超好熱好酸性アーキア *Sulfolobus* に感染する新規ウィルスの単離と性状解析
Isolation and characterization of novel virus of the hyperthermophilic andacidophilic infecting extremely archaea,*Sulfolobus*.
○酒井 紀利人[1,2]、永吉 佑子[1,2]、藤野 泰寛[2,3]、土居 克実[1,2] ([1]九大院生資環、[2]日本農芸化学会、[3]九大基幹教育院)
○ Kirito SAKAI[1,2], Yuko NAGAYOSHI[1,2], Yasuhiro FUJINO[2,3], Katsumi DOI[1,2] ([1]Fac. Agr. ,Kyushu Univ., [2]JSBBA, [3]Fac. ArtSci. ,Kyushu Univ.)

【目的】ウイルスは様々な環境中に存在し、地球上のほとんどすべての生態系に分布している。これまでに、アーキアに感染するウイルスが約 50 種発見されているが、それらは宿主であるアーキア同様、極限環境下で生育するものが多く、特徴的なゲノム構造や形態、極限環境下での感染メカニズムなどは興味深い研究対象である。同時に耐熱性、pH 安定性など優れた性質を持つ極限環境ウイルス由来のタンパク質は産業応用が期待できる。しかしながら、真正細菌ウイルスに比べてアーキアウイルスの知見は少ない。そこで本研究では、超好熱好酸性アーキアに感染する新規ウイルスの単離とその性状解析を目的とした。
【方法】超好熱好酸性アーキア *Sulfolobus shibatae* を宿主とし、大分県小松地獄熱水(80ºC, pH 3-4)より、二重寒天法を用いてウイルスの分離と純化を行った。純化したウイルスは、ネガティブ染色法を用いて透過型電子顕微鏡による形態観察を行った。また、*S. solfataricus* 及び *S. tokodaii* への感染性を二重寒天法により確認した。次に、ウイルスゲノムを抽出して各種制限酵素による消化を行い、切断パターンを既知の *Sulfolobus* ウイルスと比較した。さらに、*Sulfolobus* ウイルスの保存配列を基にプライマーを設計し、分離ウイルスゲノムを鋳型に PCR 増幅を行い、得られた配列を解析した。
【結果と考察】小松地獄熱水サンプルを用いた二重寒天法によりウイルスを分離し純化した。本ウイルスは直径 1 mm のクリアープラークを形成し、形態観察の結果、長さ約 100 nm、幅約 60 nm のレモン型ウイルスであったため、*Fuselloviridae* 科に属すると考えられた。また、本ウイルスは *S. shibatae* にのみ感染性を示し、*S. solfataricus* 及び *S. tokodaii* には感染性を示さなかった。既存の *Sulfolobus* ウイルスで *S. shibatae* のみに感染し、プラークを形成するウイルスは存在しない[1)]。さらに、抽出したウイルス DNA を、*Kpn* I, *Bam*HI, *Eco*RI 等で処理して得られた切断パターンは、既存の *Fuselloviridae* 科に属する *Sulfolobus* ウイルス DNA のものとは全く異なっていた。また、増幅したゲノム DNA の塩基配列解析から、構造タンパク質である VP1 から VP3 までをコードする ORF が推定され、それらは SSV1 と同一であった。以上の結果より、分離したウイルスは、新規 *Sulfolobus* ウイルスの可能性が示唆された。現在、完全長ゲノムのシークエンス解析を行うと共に、熱・pH 安定性の検討や一段増殖曲線の作成等の表現型解析を進めている。
1) Schleper, C. *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA,* **89**, 7645-7649(1992)

Sulfolobus, *Fuselloviridae*, genome

講演番号：2A41a10
講演日時、会場：3 月 27 日 10:49～ A 校舎 41 会場

PHA (polyhydroxyalakanoate)合成耐熱性 Bacillus 属の分離と解析
Isolation and Characterization of Thermotolerant PHA-producing Bacillus Species
○田中 優、水野 康平 (北九州高専)
○masaru TANAKA, kouhei MIZUNO (KCT)

【目　的】ポリヒドロキシアルカン酸（PHA）は生分解性、生体適合性、熱可塑性などの機能性をもち、微生物によって様々な炭素源から合成されるバイオポリマーの一種である。PHA の産業利用では製造コストが高いことから、医療分野での活躍が期待されている。そこで、LPS 非生産のグラム陽性菌である *Bacillus* 属に着目した。*Bacillus* 属の PHA 生産では様々な PHA 共重合体が報告されている。また、耐熱性や耐アルカリ性の細菌を含む *Bacillus* 属がもつ酵素は安定性に優れており、広い分野で産業利用されている。本研究では、PHA 生産の実用化を目指すため、耐熱性 *Bacillus* 属の菌体および酵素に注目し研究を行った。これまでの PHA 合成耐熱性細菌は 55℃まで報告されている。よって、耐熱性の目標温度を 55℃とし、PHA 合成耐熱性 *Bacillus* 属の探索を行った。
【方　法】大分県の酸性（pH 3.5)、中性（pH 7.0)、弱アルカリ性（pH 8.5）の温泉、福岡県のカルスト台地の土壌を取得し、サンプルとした。PHA 簡易検出用脂溶性蛍光物質 Nile red を添加した寒天培地を用いて、取得したサンプルを 50～65℃で培養、生育したコロニーに紫外灯を照射し、蛍光発色するコロニーを Nile red 陽性株とした。PHA 合成能の評価方法として、取得した Nile red 陽性株を熱濃硫酸処理し、PHB をクロトン酸に変換後 HPLC 測定を行った。また、PHA の構造解析のために、乾燥菌体からクロロホルム、メタノールを用いて PHA の抽出を行い、400 MHz ^{1}H-NMR を用いて測定を行った。PHA 合成耐熱性菌に関して、16S rRNA 遺伝子よる菌種同定を行い、近縁種の PHA 合成酵素遺伝子 *phaC* を元にプライマーを作成し、*phaC* をクローニングした。
【結　果】温泉、土壌から分離した 600 株のうち 50～65℃で生育する Nile red 陽性株を 55 株分離した。HPLC を用いた 16S rRNA 遺伝子による菌種同定及び PHA 合成の検出を行った結果、*Bacillus* sp. Ha が 37℃で PHA 合成量が最大の 25 dcw(dry cell weight)%になり、40～50℃で 5 dcw%の PHA を合成することが確認できた。また、^{1}H-NMR によりグルコースを炭素源とした PHA の構造解析を行った結果、37℃、50℃で P(3HB)を合成することが確認できた。次に、*Bacillus* sp. Ha の *phaC*(1,086 bp）の取得、解析を行った結果、推定アミノ酸配列中にリパーゼボックス様配列であると示唆される［GYCMG］配列を確認した。BLAST による *phaC* のホモローグを検索した結果、*Bacillus weihenstephanensis* KBAB4 由来 *phaC* と相同性が 97%だった。

polyhydroxyalkanoate, Bacillus, thermotolerant bacteria

講演番号：2A41a11
講演日時、会場：3 月 27 日 11:10～ A 校舎 41 会場

汽水湖における孔径 0.22 μm のメンブレンフィルターを通過可能な細菌の探索と解析

Phylogenetic analyses of filterable bacteria through 0.22-μm-pore-sized filter membrane in a brackish lake.

○久志本 晃弥[1]、福田 洸平[3]、山村 杏子[1]、石堂 真輝[1]、金原 和秀[1,2]、新谷 政己[1,2]（[1]静大工、[2]静大院工、[3]静大創造科技院）
○koya kushimoto[1], kohei fukuda[3], kyoko yamamura[1], masaki ishido[1], kazuhide kimbara[1,2], masaki shintani[1,2] ([1]Fac. Eng., Shizuoka Univ., [2]Grad. Sch. Eng., Shizuoka Univ., [3]Grad. Sch. Sci.Technol., Shizuoka Univ.)

【背景と目的】静岡県浜松市にある佐鳴湖は，水深が浅く，川で連結した下流の浜名湖（ほぼ海水）から，海の潮汐の影響で塩濃度の高い水が遡上するため、滞留時間の長い（40 日前後）汽水湖である．この自然条件から本湖は富栄養化の進んだ，化学的酸素要求量（COD）の高い汽水湖として知られている（2013 年は 7-8 mg/L）．我々は，佐鳴湖のこのような特徴から，新奇の微生物生態系が存在する可能性が高いと考え，佐鳴湖を単離源として微生物の探索を行ってきた．その結果，佐鳴湖より，孔径 0.22 μm のメンブレンフィルターを通過できる小さな細菌の単離に成功した[1)]．このような細菌は，極小細菌（ultramicrobacteria：UMB）として報告されているが，その多くは外洋や極地など，低栄養環境より見出されており，佐鳴湖のような富栄養の環境から得られた例は珍しい．そこで本研究では，佐鳴湖内のどこにどのような UMB が生息するのか，その生態・生理学的性質を理解することを目的とし，孔径 0.22 μm のフィルターを通過できる細菌の種類や，季節ごとの地理的分布を調べた．
【実験方法】2014 年 4 月，5 月，6 月，11 月に佐鳴湖周辺の 6 地点において採取した水を，孔径 0.22 μm のメンブレンフィルターで濾過し，栄養源やその濃度の異なる培地に塗布した．コロニー形成が認められた菌株については単離を試み，単離が完了した菌株については，16S rRNA 遺伝子を PCR によって増幅して配列を解読した．その後，系統分類学的解析を行い，佐鳴湖周辺にどのような UMB が生息するのかを調べた．
【結果と考察】これまでに 125 株の細菌の単離に成功し，その 46 株の 16S rRNA 遺伝子の部分配列を解読した．得られた菌株はそのコロニーの色によって大きく 4 種類に分類することができた．サンプリング地点，日時，コロニーの色の間に明確な規則性はみられなかったものの，赤色のコロニーを形成する株については，佐鳴湖内の湖水からのみ見出された．16S rRNA 遺伝子配列に基づく系統分類学解析を行った結果，赤色のコロニーを形成する菌株は *Bacteroidetes* 門に属すること，また *Firmicutes*，*Bacteroidetes*，*Proteobacteria*，門に属する 26 株については新属または新種である可能性が示された．
現在も引き続きサンプリング，単離を試みており，それらの菌株についても報告する．
本研究は，公益財団法人発酵研究所（IFO）の平成 26 年度一般研究助成を受けて行った．
[1)]福田ら，日本農芸化学会 2014 年度大会

brackish lake, ultramicrobacteria(UMB), phylogeny

講演番号：2A41a12
講演日時、会場：3 月 27 日 11:21～ A 校舎 41 会場

汽水湖における孔径 0.22 μm のメンブレンフィルターを通過可能な微生物群の菌叢解析

Comparisons in the community of filterable bacteria through 0.22-μm-pore-sized membrane filter in a brackish lake and its surrounding regions

○福田 洸平[1]、沼田 充[2]、三浦 隆匡[2]、久志本 晃弥[3]、山副 敦司[2]、藤田 信之[2]、金原 和秀[1,3]、新谷 政己[1,3] ([1]静大・創造科技院、[2]NITE、[3]静大・工)
○Kohei FUKUDA[1], Mitsuru NUMATA[2], Takamasa MIURA[2], Koya KUSHIMOTO[3], Atsushi YAMAZOE[2], Nobuyuki FUJITA[2], Kazuhide KIMBARA[1,3], Masaki SHINTANI[1,3] ([1]Grad. Shc. Sci. Technol., Shizuoka Univ., [2]NITE, [3]Fac. Eng., Shizuoaka Univ.)

【背景と目的】静岡県浜松市にある佐鳴湖は，富栄養化の進んだ，化学的酸素要求量（COD）の高い汽水湖として知られている．我々は佐鳴湖のこのような特徴から，新規の微生物生態系が存在する可能性が高いと考え，佐鳴湖と上流および下流の河川を含む周辺環境を単離源として，微生物の探索を行ってきた．その結果，孔径 0.22 μm のフィルターを通過可能な極小細菌（ultramicrobacteria : UMB）125 株の単離に成功し，そのうち 46 株については 16S rRNA 遺伝子による同定が完了している[1)]．本研究では，佐鳴湖とその周辺における UMB の地理的分布を明らかにすることを目指し，佐鳴湖水・周辺の河川水の 16S rRNA 遺伝子のアンプリコンシークエンス解析を行い，単離した UMB の 16S rRNA 遺伝子配列を比較することで，どこにどのような UMB が生息しているのかを調べることとした．
【実験方法】2014 年 2 月に，佐鳴湖周辺の 6 地点より湖水を採取した．湖水中の細菌を孔径 0.22 μm フィルターにトラップしたものを通常サイズの微生物を含む試料，孔径 0.22 μm フィルターでろ過した湖水を孔径 0.1 μm フィルター上にトラップしたものを，UMB を含む試料として，それぞれ全 DNA を抽出・PCR 後，次世代シークエンサー（MiSeq）を用いて 16S rRNA 遺伝子配列を網羅的に解読した．得られた配列の解析は，微生物集団解析用パイプラインツール QIIME と，データベースとして Greengenes_13_8 を用いて行った．
【結果と考察】通常のサイズの微生物を含む試料の細菌叢と比較して，UMB を含むサンプル中の細菌叢は，サンプリング地点にかかわらず *Bacteroidetes* 門および *Proteobacteria* 門が優占しており，両者を足し合わせた割合は UMB を含む試料の細菌叢の 90%以上を占めた．上流域では *Bacteroidetes* 門の占める割合がより高く，佐鳴湖下流の新川との接続地点を境に *Proteobacteria* 門の割合が高くなっていた．どの地点においても，*Bacteroidetes* 門の 90%以上を *Flavobacterium* 綱が占めており，特に *Flavobacterium* 綱の未同定株が顕著にフィルターを通過していることが示唆された．*Proteobacteria* 門については，上流域では *Alphaproteobacteria* および *Betaproteobacteria* 綱が，中流では *Gammaproteobacteria* 綱が，下流域では *Alphaproteobacteria* 綱の細菌が優占化しており，上流・中流・下流域で異なる UMB が生息する可能性が示唆された．これまでに単離した UMB は，*Flavobacterium* 綱に属すると考えられる新奇性の高い菌株や，*Proteobacteria* 門に属する菌株が多かったことを考慮すると，佐鳴湖周辺に生息するこれらの種類の細菌が，孔径 0.22 μm フィルターを通過しやすい可能性が示唆された．
本研究は公益財団法人発酵研究所（IFO）の平成 26 年度一般研究助成を受けて行った．
1）久志本ら，日本農芸化学会 2015 年度大会

brackish lake, ultramicrobactria, microbial community

講演番号：2A41a13
講演日時、会場：3 月 27 日 11:32～ A 校舎 41 会場

深部地下油層環境における未培養細菌の機能解明
Functional characterization of uncultured bacteria in deep subsurface oil reservoirs
○原 英里[1]、眞弓 大介[1]、玉澤 聡[1]、玉木 秀幸[1]、前田 治男[2]、若山 樹[2]、五十嵐 雅之[2]、西川 向一[3]、押部 洋[3]、白井 良和[3]、坂田 将[1]、鎌形 洋一[1] ([1]産総研、[2]国際石油開発帝石（株)、[3]東京ガス（株））
○Eri HARA[1], Daisuke MAYUMI[1], Satoshi TAMAZAWA[1], Hideyuki TAMAKI[1], Haruo MAEDA[2], Tatsuki WAKAYAMA[2], Masayuki IKARASHI[2], Koichi NISHIKAWA[3], Hiroshi OSHIBE[3], Yoshikazu SHIRAI[3], Susumu SAKATA[1], Yoichi KAMAGATA[1] ([1]AIST, [2]INPEX Corporation, [3]TOKYO GAS CO.,Ltd)

【背景および目的】
現在の技術で油田から回収可能な原油は全体の半分程度であり、残りの半分は油田に取り残されているのが現状である。本研究では、原油の回収が不可能になった枯渇油田の残留原油を回収する技術として、油田に生息する微生物を活用した原油増進回収技術（Microbial Enhanced Oil Recovery: MEOR）に着目している。本技術は、微生物による原油分解・メタン生成反応を利用するもので、枯渇油田の残留原油を天然ガス（メタン）に変換し回収することが可能である。しかし、その技術の鍵となる原油分解・メタン生成反応のメカニズムについてはほとんど解明されておらず、どのような微生物が原油分解に関与しているかは明らかでない。そこで本研究では、MEOR 技術の開発を目指し、原油分解・メタン生成反応に関与する油層微生物の機能を明らかにすることを目的とした。
【実験方法】
枯渇油田における原油分解・メタン生成反応に関与する微生物を明らかにするため、国内油田の 7 坑井から油層水をサンプリングし、原油分解・メタン生成反応の過程において重要な中間産物である高級脂肪酸および安息香酸、酢酸、水素/二酸化炭素、メタノール等を基質とした集積培養を行った。得られた各々の集積培養系について微生物群集構造解析を行い、原油分解・メタン生成反応に関与する微生物の同定および機能の推定を行った。
【結果および考察】
酢酸を基質に用いた集積培養系では、*Methanosaeta* が優占種として集積された培養系①や *Methanoculleus* が優占種として集積された培養系②が得られた。*Methanosaeta* は酢酸資化性メタン生成菌として知られており、培養系①では *Methanosaeta* によって酢酸が直接メタンに変換されていることが推測された。一方で、培養系②の *Methanoculleus* が優占した培養系においては、*Firmicutes* 門に属する *Thermacetogenium phaeum* や多数の未培養細菌が優占した。*Thermacetogenium phaeum* は水素資化性メタン生成菌と共生する酢酸酸化細菌として知られている。従って、当集積培養系では酢酸酸化-水素資化性メタン生成反応が起こっていることが推測された。その他に優占していた未培養細菌についても、現在、分離培養を進めており、これらの酢酸酸化能について検証を行う予定である。その他の集積培養系においても、既知の細菌と相同性が 90%以下の未培養細菌が多数得られており、これらの細菌についても分離培養を進めている。

oil field, methane production, uncultured bacteria

講演番号：2A41a14
講演日時、会場：3 月 27 日 11:43～ A 校舎 41 会場

深部地下油層環境から分離した新規 *Deferribacteres* 門鉄還元細菌の機能解析
Isolation and characterization of a novel Fe(III)-reducing bacterium in the phylum *Deferribacteres* from deep subsurface oil reservoir

○玉澤 聡[1]、眞弓 大介[1]、持丸 華子[1]、坂田 将[1]、前田 治男[2]、若山 樹[2]、五十嵐 雅之[2]、鎌形 洋一[1]、玉木 秀幸[1] ([1]産業技術総合研究所、[2]国際石油開発帝石株式会社)
○Satoshi TAMAZAWA[1], Daisuke MAYUMI[1], Hanako MOCHIMARU[1], Susumu SAKATA[1], Haruo MAEDA[2], Tatsuki WAKAYAMA[2], Masayuki IKARASHI[2], Yoichi KAMAGATA[1], Hideyuki TAMAKI[1] ([1]AIST, [2]INPEX Corporation)

鉄は地球構成元素の第四位を占めており、地球上に普遍的に存在している。これまでに鉄を利用可能と推定される微生物が地球環境に広く生息していることが明らかにされてきており、微生物による鉄の取り込みや酸化還元といった代謝活動が、地球の鉄、炭素及びエネルギーフラックスに大きく関与している可能性が示唆されている。深部地下油層環境は、鉄が蓄積している環境の一つである。微生物群集構造解析によって、鉄に依存したエネルギー獲得様式を有すると推測される微生物群のクローン配列が多数検出されていることから、鉄は深部地下油層環境において重要な物質と考えられている。国内油田の深部地下油層環境（地下 1000 m 付近）は、50℃以上の高温で高圧な嫌気環境である。同環境から採取される油層水は、塩濃度が比較的高く、河川や海水等と比べて鉄含有量が数オーダー高い（全鉄濃度 1.7 mg/L)。過去に実施された油層水の微生物群集構造解析により、鉄還元細菌の存在が強く示唆されていたものの、現在まで分離培養されておらずその実態は不明であった。そこで本研究では、深部地下油層環境に生息する鉄還元細菌の分離培養化を試みた。

深部地下油層環境は、固く浸透性の低い帽岩により数万から数百万年単位で地表から隔絶されているため、炭素・エネルギー源の流出入がほとんど起こらない。一方、原油（炭化水素）や原油の生物・熱分解に由来する脂肪酸（主に酢酸）やメタンが蓄積しており、特に酢酸は数 mM から十数 mM のオーダーに達する。そこで、井戸元から採取した油層水を接種源に、酢酸を電子供与体に用いて 55℃で静置培養を行った。少なくとも 4 回以上は継代培養した後にクローン解析を行ったところ、鉄還元細菌と推定されるクローンの配列が検出された。そこで、三価の鉄（NTA 鉄）を電子受容体に酢酸を添加して継代培養を重ね、最終的にアガーシェイク法により新規鉄還元細菌 ANA 株の純粋分離に成功した。ANA 株は 25-60℃、pH 7.0-8.0、0-6%の NaCl 濃度で生育可能であり、現場環境に適応した生理学的特徴を有していた。16S rRNA 遺伝子に基づく分子系統学的解析の結果、ANA 株は記載された既存の鉄還元細菌 *Deferribacteres* 門の *Deferribacteraceae* 科に属するが、最近縁種である *Calditerrivibrio nitroreducens* に 90%程度の相同性しか示さない極めて新規な系統に属することが明らかとなった。また ANA 株に高い相同性を示す近縁なクローンの配列が同油層水から検出されており、現場に確かに存在することがわかった。既往の研究において、この最近縁クローンは、原油分解メタン生成が実証された高温の集積培養系でも優占種として検出されていることから、今回純粋分離に成功した ANA 株が、深部地下油層環境における鉄や炭素フラックスに重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

Deep subsurface oil reservior, Fe(III)-reducing bacteria, Isolation and characterization

講演番号：2A41a15
講演日時、会場：3 月 27 日 11:54～ A 校舎 41 会場

好酸性の鉄酸化細菌 *Acidithiobacillus* sp. NU-1 株の生理学的特徴とゲノム解析
Physiological characterization and genomic analysis of the iron-oxidizing acidophile *Acidithiobacillus* sp. strain NU-1
○上岡 永佳、高妻 篤史、渡邉 一哉（東京薬科大生命科学）
○Nagayoshi UEOKA, Atsushi KOUZUMA, Kazuya WATANABE (Tokyo Univ. Pharm. Life Sci.)

【背景・目的】

Acidithiobacillus 属の好酸性鉄酸化細菌は、極めて低い pH（3 以下）で独立栄養的に増殖する微生物学的に興味深い細菌である。これら細菌は鉱物中の有価金属（銅や金など）を回収するプロセス（バイオリーチング）に利用されるなど、産業的にも重要なものである。また近年、大気中の CO_2 を固定することによる物質生産への応用も検討され始めているが、一般的にこのような微生物は生育が遅く、効率的な物質生産は困難という指摘もされている。一方、電気培養（3 価鉄を電気化学的に再還元し、エネルギー源となる 2 価鉄を供給する培養法）によりこれら鉄酸化細菌の増殖が飛躍的に向上するという興味深い知見も得られている。本発表では、このような *Acidithiobacillus* 属細菌の特性に着目した研究の過程における新しい株の単離、その増殖特性の調査、およびドラフトゲノム解析について報告する。

【方法・結果】

A.ferrooxidans ATCC23270 株をカルチャーコレクションより取り寄せ、2 価鉄を電子供与体として含む無機液体培地 (9K 培地, pH 2.0) において継代培養を行ったところ, 植え継ぎの回数を重ねると共に鉄酸化速度が上昇した。約 4 ヶ月間の継代培養後、平板培養によるコロニー単離を行い、得られた株の 16S rRNA 遺伝子配列に基づく分子系統解析を行った。その結果、単離株は *A.ferrooxidans* よりも, *A.ferrivorans* に近縁であることが判明した。そこで本単離株を *Acidithiobacillus* sp. NU-1 株と命名し、生理学的諸性質の解析を行った。2 価鉄を含む 9K 培地 (pH 2.0) における増殖能を近縁株と比較した結果、NU-1 株は *A.ferrooxidans* ATCC23270 株 ($0.026\ h^{-1}$) および *A.ferrivorans* DSM22755 株 ($0.010\ h^{-1}$) より高い比増殖速度 ($0.030\ h^{-1}$) を示した。最も近縁の *A. ferrivorans* の至適 pH は 2.5 付近であることが報告されているが、NU-1 株は pH 2.0 においても良好な生育を示し、低 pH 条件下においても高い増殖能力を有することが明らかとなった。また電極電位を 0 V (vs Ag/AgCl) に設定した電気化学セルにおいて本株の電気培養を行った結果, 通常の液体培養と比較して 19 倍の菌体量を得ることができた。ドラフトゲノム解析の結果、rusticyanin 等の鉄酸化に関与すると考えられる遺伝子群は NU-1 株においても保存されており、*A.ferrivorans* のものと高い相同性 (アミノ酸レベルで 94%～96%) を示した。現在 NU-1 株の生理学的特性の調査および近縁株との比較ゲノム解析を進めている。

Acidithiobacillus, iron oxidizing bacteria, genomic analysis

講演番号：2A41p01
講演日時、会場：3 月 27 日 14:00～ A 校舎 41 会場

食品腐敗原因 *Bacillus coagulans* における菌株識別法の評価
Evaluation of typing methods of *Bacillus coagulans* strains as food spoilage bacteria.
○佐藤 惇[1]、堀内 あゆみ[1]、富山 大輔[1]、中山 素一[1]、湯井 幸治[1]、宮本 敬久[2] ([1]花王(株)安全性科学研、[2]九州大農)
○Jun SATO[1], Ayumi Horiuchi[1], Daisuke Tomiyama[1], Motokazu Nakayama[1], Kouji Yui[1], Takahisa Miyamoto[2] ([1]Kao Corp. Safety Science Research, [2]Kyushu Univ.)

【目的】*Bacillus coagulans* は容器包装詰加圧加熱殺菌食品におけるフラットサワー型変敗を引き起こす原因菌としてよく知られており、形成する芽胞の高い耐熱性に加え、高カテキン耐性を示すなど各種ストレス耐性を有していることから最も重要な制御対象細菌の 1 つである。*B. coagulans* は菌株間で芽胞の耐熱性が異なること等が報告されているが、様々な表現型について菌株間で詳細に比較した研究例は非常に少ない。そこで、我々は *B. coagulans* の各菌株を種々の菌株識別技術により分類し、制御対象菌としての重要性評価へ応用可能かどうかについて検討したので報告する。
【方法および結果】現在入手可能な *B. coagulans* を NBRC、DSM、日本缶詰びん詰レトルト食品協会から計 14 株購入し、試験に供した。菌株識別は Repetitive(Rep)-PCR と MALDI-TOF-MS、リボタイピングにより行い、これらの結果から菌株のグルーピングを行った。16SrRNA（約 1500bp）と DNA gyrase（*gyrB*, 約 1200bp）の塩基配列による系統樹解析および各種糖の資化能を指標としてグルーピング結果の確からしさを評価した。16SrRNA および *gyrB* の塩基配列から系統樹を作製した結果、試験した 14 株は 16SrRNA 遺伝子では 2 つ、*gyrB* 遺伝子では 3 つのクラスターに大きく分類された。Rep-PCR および MALDI-TOF-MS による解析の結果、遺伝子解析よりも詳細に分類され、各々10 および 13 のグループに細分化された。各手法における同一性の指標（Similarity: Rep-PCR >95%、MALDI-TOF-MS >80%）は異なるが、Rep-PCR および MALDI-TOF-MS において DSM2350 および DSM2356 の 2 菌株は類縁性が非常に高いことが示された。これ以外にも Rep-PCR により DSM2308 および DSM2385 の 2 菌株と NBRC12583, 缶詰 1108, 缶詰 1109 の 3 菌株の類縁性が高いことが示され、MALDI-TOF-MS 解析でも同様に近縁であると判定された。両手法で類縁性が非常に高かった DSM2350, DSM2356 の 2 菌株間で生化学性状を比較した結果、50 種類の糖の資化性が完全に一致し、芽胞の耐熱性やカテキン耐性も類似していた。また、他の類縁性が高かった菌株に関しても表現型は類似していた。一方、リボタイピングでは同一性の指標（Similarity：>0.85）を満たす菌株が無く、更に、生化学的性状に基づく分類とも一致しなかった。これは、*B. coagulans* がリボソーム DNA の ITS 領域に多型性を有することが原因と考えられた。
　今回の結果から、*B. coagulans* において MALDI-TOF-MS と Rep-PCR の異なる原理に基づいた解析を組み合わせる事で、より正確な菌株識別と類縁性の高い菌株のグルーピングが可能であり、耐熱性やカテキン耐性等の表現型とも一致することが示された。

Bacillus coagulans, MALDI-TOF-MS, Repetitive PCR

講演番号：2A41p02
講演日時、会場：3 月 27 日 14:11～ A 校舎 41 会場

タイ由来アルコール飲料用スターターの微生物叢解析
Analysis of microbial community in traditional alcohol fermenting starter in Thailand
○村越 美穂[1]、三澤 涼太[1]、米田 英伸[1,2]、Aran H-Kittikun[3]、浅野 泰久[1,2]([1]富山県大工・生工研セ、[2]JST, ERATO、[3]Prince of Songkla University)
○Miho MURAKOSHI[1], Ryouta MISAWA[1], Hidenobu KOMEDA[1,2], H-Kittikun Aran[3], Yasuhisa ASANO[1,2] ([1]Toyama Pref. Univ., [2]ERATO, JST, [3]Prince of Songkla University)

【目的】アジア各国で伝統的な酒造りに使用されているスターターとしてタイの‘*loog pang*’、ベトナムの‘*banh men*’、中国の‘*chu*’などが挙げられる。このようなスターター中には多糖の分解やエタノール発酵に関わる微生物が存在していると考えられ、微生物叢の解析によりエタノール生産に有用な微生物の発見につながることが期待できる。日本農芸化学会 2014 年度大会において、7 種類のタイ及びラオス由来スターターの微生物叢の解析結果について示した[1)]。今回、タイ由来スターター16 種類についてのさらなる微生物叢の解析を目指した。まず、培養法に依存しない方法として、各スターターより直接 DNA を抽出し、微生物叢の解析を行った。さらに平面寒天培養法により各種微生物株を単離し、そのアミラーゼ活性及びエタノール生産性を調べた。
【方法と結果】21 種類のスターターサンプルを蒸米に加えて一定期間保温した結果、全てのサンプルでエタノールが生産されていた。これより、これらのスターター中にはアミラーゼ生産菌とエタノール発酵菌が存在していると予測できる。次いで、スターターより直接 DNA を抽出後、細菌に対しては 16S rDNA 配列、酵母や糸状菌に対しては LSU rDNA の D1/D2 領域を PCR により増幅し、微生物叢の解析を行った。また、これらスターターより種々の培地を用いて、各種微生物株を単離した。その結果 250 株以上の細菌、酵母及び糸状菌が得られた。これらの菌株を各種糖源存在下で好気的及び嫌気的条件下で培養し、エタノール生産量を調べた。D-グルコース存在下では多くの菌株が 4g/L 以上のエタノール生産を示した。特に、D-グルコースからのエタノール生産性の高い菌株は、糸状菌の *Rhizopus microsporus*、*Mucor indicus*、及び *Mucor pilosus*、酵母の *Meyerozyma caribbica* と同定された。さらに、単離した菌株のうち、数種類のサンプルから単離された *Wickerhamomyces anomalus* は強いアミラーゼ活性を示した。

[1)] Miho Murakoshi, Hidenobu Komeda, Aran H-Kittikun, Yasuhisa Asano, The diversity of traditional starters from alcoholic fermentation in Thailand and Laos, 日本農芸化学会 2014 年度大会

alcohol fermentation starter, microbial diversity, Thailand

講演番号：2A41p03
講演日時、会場：3 月 27 日 14:22～ A 校舎 41 会場

外生菌根性オオサビハリタケ（*Hydnellum ferrugineum*）菌糸マットが直下の北方針葉樹林土壌微生物群集構造に与える影響

The effects of an ectomycorrhizal fungus *Hydnellum ferrugineum* on soil microbial community structure in Swedish coniferous forest bed

○礒田 玲華[1]、宮本 敏澄[1]、原 新太郎[2]、Zackrisson Olle[3]、橋床 泰之[1]（[1]北大院農、[2]東北大院農、[3]Swedish University of Agricultural Sciences）
○Reika Isoda[1], Toshizumi Miyamoto[1], Shintaro Hara[2], Olle Zackrisson[3], Yasuyuki Hashidoko[1]（[1]Hokkaido Univ., [2]Tohoku Univ., [3]Swedish University of Agricultural Sciences）

【背景】スカンジナビア北方林ではフェアリーリングを形成する外生菌根性のオオサビハリタケ（*Hydnellum ferrugineum*）が広く分布している．1967 年 Hintikka らは，オオサビハリタケ菌糸マット直下の土壌特性を調査し，オオサビハリタケがポドゾル形成に関与していることを明らかにしている．しかしこれ以降オオサビハリタケと森林生態系との詳細な関係を示す報告はほとんどない．1997 年には Jongmans らが同じく外生菌根性の *Suillus granulatus* や *Piloderma croceum* が岩石を溶かす強力な有機酸を産生することを報告している．我々の調査からも菌糸マットの進出によって林床の植生は大きく変化することが確認されたため，菌糸マットの遷移と近傍の土壌微生物群集および森林土壌生態系への影響を検証するため，菌糸マット直下および周辺土壌の微生物群集構造解析を行った．
【方法】ヨーロッパアカマツ（*Pinus sylvestris*）およびヨーロッパトウヒ（*Picea abies*）が優占するスウェーデン北部 Ruttjeheden（N65°43' E18°44'）付近の研究用森林をサンプリングサイトとした．リング上にオオサビハリタケの子実体が確認される菌糸マットにおいて，菌糸の分解が始まっている中心（CP），菌糸の活動が活発な先端（MP），菌糸の侵入がない 50 cm 外周（OP）の 3 地点から L（リター）層，F（分解）層，H（腐植化）層，E（溶脱）層，B（無機質）層土壌をそれぞれ採取した．各土壌から ISOIL を用いて DNA を回収し，真正細菌および古細菌 16S rRNA 遺伝子を標的とした変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法（DGGE 法）による菌叢解析を行った．
【結果・考察】真正細菌 16S rRNA 遺伝子配列を標的とした PCR-DGGE 解析により，微生物群集構造は 3 地点とも L 層で最も多様性が高く，その他の土壌層の微生物群集は菌糸マットの中心から外周方向へ多様性が高くなる傾向が観察された．菌糸マット直下は土壌 pH が低下することで溶脱の進行が著しいため，この環境圧を受けて多様性が低下している可能性がある．MP-H 層からは，*Burkholderia* 属細菌が主要な真正細菌として検出された．一方，古細菌 16S rRNA 遺伝子を標的とした DGGE 解析では，菌糸マットの状態に関わらず，B 層土壌古細菌群集は一貫して高い多様性を保持しているが，その群集構造は大きく異なっていた．OP-B 層から回収した DNA には Thaumarchaeota 門古細菌に近縁な配列を検出でき，また菌糸シロの先端部にあたる MP-B 層からは Euryarchaeota 門 Archaeogloaceae 網古細菌に近縁な配列が検出されている．一部の菌種は，健全なミネラル供給の一端を担うかもしれないオオサビハリタケの分布，活動の指標になると考えられる．真正細菌叢，古細菌叢ともに，現在，より詳細な解析を遂行中である．

Hyphal mat, DGGE, Spodosol

講演番号：2A41p04
講演日時、会場：3 月 27 日 14:33～ A 校舎 41 会場

ゴリラ特異的と考えられる新規乳酸菌 *Lactobacillus gorillae* の分離
Isolation of novel gorilla-specific *Lactobacillus gorillae*

○牛田 一成[1]、土田 さやか[1]、北原 真樹[2]、大熊 盛也[2]、ピエールフィリップ ベアングギマ[3]、藤田 志歩[4]、山極 寿一[5] ([1]京都府立大学院生命環境、[2]理研微生物材料開発室、[3]ガボン熱帯生態研究所、[4]鹿児島大学共同獣医、[5]京都大学院理)
○Kazunari Ushida[1], Sayaka Tsuchida[1], Maki Kitahara[2], Moriya Okuma[2], Mbehang Nguema Pierre-Philippe[3], Shiho Fujita[4], Juichi Yamagiwa[5] ([1]Kyoto Prefectural University, [2]BRC-Riken, [3]Research Institute of Tropical Ecology, [4]Kagoshima University, [5]Kyoto University)

野生および動物園で飼育下のニシローランドゴリラに共通して存在する新規な乳酸菌を分離したので報告する。ガボン共和国ムカラバ・ドゥドゥ国立公園内の熱帯雨林に生息する野生ニシローランドゴリラ個体群を追跡することで新鮮糞便を採取した。ただちに滅菌ループで LBS 寒天平板に接種し、キャンプ地に戻ってから画線後、アナエロパウチを用いて嫌気培養を行った。比較対象として、京都市動物園で飼育されているニシローランドゴリラ個体より、新鮮糞便を採取し、同様に LBS 平板を用いて分離培養した。グラム染色陽性通性嫌気性桿菌を野生ゴリラ糞便から 12 株、飼育下ゴリラから 3 株を単離した。これらの菌株は、16S rRNA 遺伝子の配列ではいずれも同じクラスターに配分され、既存種から明瞭に区分されたため同一種であるとともに新菌種であることが予想された。そこで、これらのうち京都市動物園で飼育されている個体から単離された 3 株 KZ01, KZ02 および KZ03 とガボン共和国野生個体から単離された GG02 株を用いて分類学的な検討を実施した。16S rRNA 遺伝子配列に加えて *pheS* 遺伝子の配列による系統分類によっても、これらの単離株は単一系統のクラスターを形成し、既存種から区分されたので系統学的に新菌種であることが示された。本新菌種は、系統分類解析および API 50 CH and API ZYM による表現型解析結果から *Lactobacillus reuteri* 分類群に属しており、*Lactobacillus fermentum* を最近縁種とすると判定された。*L. fermentum* の基準株との 16S rRNA 遺伝子配列の類似度は 98.7%であったが、*L. fermentum* JCM 1173^T との DNA-DNA ハイブリダイゼーションの結果は、KZ01^T, KZ02, KZ03, GG02 のいずれも 11%–22%と極めて低値を示した。KZ01 を基準株として登録し JCM 19575^T および DSM 28356^T の登録番号を得た。この菌群の検出は、PCR 産物の配列のみが登録されている例も含め、マウンテンゴリラとローランドゴリラに限られていることから、ゴリラに特異的な *Lactobacillus* であると予想される。野生ゴリラが固有に保持する乳酸菌が、飼育下でも失われずに維持されていることから、ゴリラと特異的関係を確立した *Lactobacillus* 属細菌と考えられ、ヒトから検出される *Lactobacillus reuteri* 分類群の起源と進化を解明するために大きな手がかりを提供すると期待される。RiboPrinter を用いてこれら 4 株のリボタイプを解析すると、野生型と飼育型に分類されることがわかった。この両型は、表現系が一部異なっており、野生型に備わるキシロースやセロビオースおよびアルブチン資化能が飼育型では喪失されているのに対し、耐塩性は野生個体からの単離株が劣っていた。リボタイプと表現系の差異我対応することは飼育下の条件に対する適応がすでに始まっていることを示唆しており、腸内細菌の適応の方向性を示すものとして興味深い。

Novel Lactobacillus, Gorilla-specific

講演番号：2A41p05
講演日時、会場：3 月 27 日 14:44～ A 校舎 41 会場

ヒト皮膚常在細菌の多様性：健常者とアトピー性皮膚炎患者の比較
The diversity of human skin microbiome: the comparison between healthy volunteer and atopic dermatitis patients

○佐藤 綾子[1]、稲垣 瑞穂[2]、澤野 博之[1]、坪内 芙美香[1]、林 将大[3]、田中 香お里[3]、兼崎 友[4]、吉川 博文[4]、鈴木 徹[2] ([1]岐阜大応用生物、[2]岐阜大連農、[3]岐阜大生命科学総合研究支援センター、[4]東農大応用生物)
○Ayako SATO[1], Mizuho INAGAKI[2], Hiroyuki SAWANO[1], Humika TSUBOUCHI[1], Masahiro HAYASHI[3], Kaori TANAKA[3], Yu KANESAKI[4], Hirofumi YOSHIKAWA[4], Tohru SUZUKI[2] ([1]Dpt.Appl.Life Sci.,Gifu Univ., [2]United Grad.Sch.,Gifu Univ., [3]Life Sci.Res.Center,Gifu Univ., [4]Tokyo Univ.Agric.)

ヒト皮膚には多種多様な細菌や真菌が生息している。この菌種や存在割合（＝微生物叢）は、個人ごとに、また同じ個人でも部位によって異なると考えられている。近年、皮膚微生物叢と皮膚疾患との関係が注目されている。*Staphylococcus aureus* はアトピー性皮膚炎（ＡＤ）の炎症部に高頻度で検出され、多数の炎症性外毒素遺伝子を持つ株が多い。このことから、ＡＤの発生や増悪と *S. aureus* に何らかの関連があると仮説が立てられている。一方、ヒト皮膚に常在し、外毒素を産生しない *S. epidermidis* は、*S. aureus* の定着・増殖を抑制するメカニズムを持つことが報告されている。また、思春期になってニキビができはじめるとＡＤが寛解・治癒に向かうことが多いため、*Propionibacterium acnes* がＡＤに関わっている可能性も考えられている。これらのことから、本研究では個々人に常在する菌種を同定し、皮膚常在細菌叢の構成を明らかにすることで、ＡＤと皮膚常在細菌との関係を解明することを目的とした。

まず、ＡＤ患者を含むボランティアを 100 人募り、左右いずれかの肘の裏側を生理食塩水に浸した綿棒で拭き取り皮膚常在細菌を採取した。同時にアンケートを実施し、ボランティアを健常者、ＡＤ回復群、ＡＤ軽症、ＡＤ中等症、ＡＤ重症の５つに分類した。サンプルは標準寒天培地とヒツジ血液寒天培地に塗布し、前者は好気的に、後者は嫌気的に培養した。生育した菌は MALDI-TOF MS を用いて菌種を同定した。

健常者およびＡＤ回復群には、*S. epidermidis* をはじめ、*Staphylococcus* 属の *S. hominis* や *S. capitis* などが多く検出されたが、*S. aureus* については検出されないことが多かった。他に *Moraxella osloensis* や *Candida parapsilosis* が検出されることもあった。また、嫌気培養では *P. acnes* が優占して検出された。一方、ＡＤ患者では、重症化するほど *S. aureus* の数が圧倒的に増加した。*P. acnes* は検出されたが、健常者やＡＤ回復群に比べると格段にその数は少なかった。これらのことから、ＡＤ患者と健常者では、皮膚の菌叢バランスが大きく異なっており、それがＡＤの発症や悪化に関わっている可能性が示された。

更に、３人の被験者（ＡＤ患者２人、ＡＤ回復者１人）それぞれから得られた *S. aureus* について比較ゲノム解析したところ、新規毒素遺伝子の獲得のようなゲノム自身の変化も関与している可能性が示唆された。今回得られた皮膚常在細菌のうち特徴的なものについては、今後、同様に比較ゲノム解析をしていく予定である。

human skin microbiome, atopic dermatitis, *Staphylococcus aureus*

講演番号：2A41p06
講演日時、会場：3 月 27 日 15:05～ A 校舎 41 会場

セルロースプレートと寒天培地の併用による土壌糸状菌の分離効果

Combination cellulose plate (non-agar solid support) and agar plate method improves isolation of fungi from soil

○野中 健一[1,2]、戸高 眠[3]、大村 智[1]、増間 碌郎[1,2] ([1]北里大生命研、[2]北里大院感染制御、[3]極東製薬工業)
○Kenichi NONAKA[1,2], Nemuri TODAKA[3], Satoshi OMURA[1], Rokuro MASUMA[1,2] ([1]Kitasato Inst. Life Sci., Kitasato Univ., [2]Grad. Sch. Infect. Cont. Sci., Kitasato Univ., [3]Kyokuto Pham.)

【背景・目的】
１９世紀に寒天培地が開発されて以来、微生物の培養には寒天培地を用いるのが一般的である。そのため、有用物質の探索源となる微生物の分離に用いる培地は寒天以外の組成について検討がなされてきた。近年になり、寒天に代わる新しい固化剤が開発されてきており、セルロースプレートもその一つである。セルロースプレートは寒天培地と比べ、熱や酸・塩基に対して非常に強く、好熱菌や好酸菌の培養に非常に効果を発揮している。さらに、セルロースを唯一の炭素源とする事でセルロース分解菌の分離も容易に行なえる。これまで中温域で生育する一般的な細菌や酵母の培養例はあるが、一般的な糸状菌の培養に使用された例はない。そこで、セルロースプレートを土壌糸状菌の分離に用いる事で、一般的な糸状菌の培養および分離に利用が可能か検証を行うことを目的とした。
【方法・結果】
ポテト・デキストロースを基本組成とし、セルロースプレートと寒天培地で土壌糸状菌の分離を行い、比較を行なった。その結果、土壌糸状菌はセルロースプレート上で寒天培地上と同様に生育し、土壌からの糸状菌の分離にも利用可能であった。その上、セルロースプレートと寒天培地では共通して出現した糸状菌が全体の約半数と重複が少ないため、これらを併用すると個々の培地で分離を行なったときと比べ、１つの土壌から分離出来る種数が大幅に向上した。逆に細菌の出現数は寒天培地と比べ少ないため、コンタミを防ぐ効果もあった。しかし、セルロースプレート上では多様な糸状菌が出現したが、コロニーの色調が全て白色または黄色であり、種の判別が困難となる問題点も見受けられた。この点は、培地に硫酸銅を添加する事で分生子形成・着色を促進し、克服した。本検証を行う過程で、新種糸状菌を２種、新規化合物２成分の発見に至った。

cellulose plate, fungi, isolation method

講演番号：2A41p07
講演日時、会場：3 月 27 日 15:16～ A 校舎 41 会場

深海由来糸状菌の分離および抗真菌活性物質の探索

Isolation of fungi from deep-sea sediments and search for antifungal compounds.

○志鷹 和奈[1]、野中 健一[2]、長野 由梨子[3]、岩月 正人[2]、丸山 正[1,3]、大村 智[2] ([1]北里大院海洋、[2]北里大生命研、[3]海洋研究開発機構)
○Kazuna SHITAKA[1], Kenichi NONAKA[2], Yuriko NAGANO[3], Masato IWATSUKI[2], Tadashi MARUYAMA[1,3], Satoshi OHMURA[2] ([1]Kitasato Univ., [2]Kitasato Inst., [3]JAMSTEC)

【背景・目的】

抗真菌薬における薬剤耐性菌の出現や重篤な副作用は世界中で問題となっており、新たな抗真菌薬の開発が求められている。既存の抗真菌活性物質の約 6 割が糸状菌由来であることから、糸状菌は抗真菌活性物質の探索源として非常に有用である。近年では、海洋糸状菌から数多くの新規化合物が発見され、新たな創薬資源として注目されている。さらに、海洋の大部分を占める水深 200m 以深の深海環境には、光の全く届かない暗黒、高水圧、低水温、貧栄養といった過酷な環境が広がっており、陸上・浅海とは菌類相が異なることが予測される。しかしながら、深海環境に生息する糸状菌をターゲットにした化合物の探索はもちろん、その多様性に関する知見は乏しい。そこで、本研究では、深海バイオ資源を利用した新たな創薬資源の探索を目的として、深海堆積物から糸状菌の分離・分類を行い、抗真菌活性物質の探索を行った。

【方法・結果】

相模湾初島沖深海（水深 857m～967m）から採取した堆積物試料から 4 種の培養条件で菌類の分離培養を行い、130 株を分離した。これらの形態的特徴及び ITS 配列を用いて分類を行った結果、酵母が 28 株で 4 属 6 種に、糸状菌が 97 株で 24 属 54 種に分類された（5 株は未同定）。

分離した糸状菌 97 株を 6 種の液体培地および 2 種の固体培地で調整した培養液を用いて、Paper-disc 法による抗菌活性試験を行った。*Candida albicans* または *Mucor racemosus* に抗菌活性を示し、細菌 4 種に対して抗菌活性を示さなかった 10 サンプルを活性物質精製候補とした。このなかで最も強い活性を示した *Arthrinium phaeospermum* NT13-07-M4-21 株を培養後、各種クロマトグラフィーを用いて抗真菌活性物質の単離・精製を行った。

Antifungal compounds, Deep-sea, Fungi

講演番号：2A41p08
講演日時、会場：3 月 27 日 15:27～ A 校舎 41 会場

Arabidopsis thaliana と *Nicotiana benthamiana* の根からの放線菌の分離とその抗生物質生産能の評価

Isolation and characterization of actinomycetes from *Arabidopsis thaliana* and *Nicotiana benthamiana* roots

○石垣 祐二、白須 賢（理研 CSRS）
○Yuji Ishigaki, Ken Shirasu (RIKEN CSRS)

【背景と目的】

放線菌は抗生物質を含む多種多様な二次代謝産物を生産することが知られている。いくつかの放線菌は植物の成長促進と生産性向上に関与するものや、病原菌の防除などに効果を示すものがあるが、植物に対する放線菌の役割はまだよくわかっていない。そこで、モデル植物のシロイヌナズナ *Arabidopsis thaliana* とタバコの近縁種 *Nicotiana benthamiana* の根から放線菌を分離し、これらの放線菌と植物の相互作用を調べることを目的とした。その最初のステップとして、今回は放線菌の分離について発表する。

【方法と結果】

東京、千葉、群馬から天然の土壌を採集し、この土壌を用いて *A. thaliana* と *N. benthamiana* を実験室環境下で生育させた。これらの根を回収し、選択培地を用いて放線菌を分離後、16S rDNA 配列解析によって 74 種の放線菌を同定した。同定した分離株は Micromonosporaceae 科に属する種が最も多く、46 種存在していた。他には Streptosporangiaceae 科（16 種）、Streptomycetaceae 科（8 種）、Thermomonosporaceae 科（4 種）などが存在していた。興味深いことに、いくつかの株はアブラナ科の *A. thaliana* またはナス科の *N. benthamiana* でのみ同定され、*N. benthamiana* と比較して *A. thaliana* の根には *Sphaerisporangium* 属、*Streptomyces* 属、*Streptosporangium* 属の放線菌が多く存在していた。

次に、これらの分離株と 16S rDNA 配列の類似度や形態が異なった 13 株を加えた 87 株の抗生物質生産能を調べた。検定菌としてグラム陽性細菌の *Kocuria rhizophila*、グラム陰性細菌の *Escherichia coli*、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae*、植物病原菌のトマト斑葉細菌病菌 *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000、青枯病菌 *Ralstonia solanacearum*、イチゴ炭疽病菌 *Colletotrichum fructicola* を用いた。その結果、35 株がいずれかの検定菌に対して抗菌活性を示し、そのうちの 12 株は *P. syringae* pv. *tomato* DC3000, 14 株は *R. solanacearum*, 5 株は *C. fructicola* に対する抗菌活性を示した。今後、これらの分離株と植物の関係を調べる予定である。

actinomycetes, plant, isolation

講演番号：2A41p09
講演日時、会場：3 月 27 日 15:38～ A 校舎 41 会場

Micromonosporaceae 科放線菌の細胞壁ペプチドグリカンの構造解析
Structural analysis of cell-wall peptidoglycan contained in actinomycetes belonging to the family *Micromonosporaceae*

○武 晃[1]、中島 琢自[2]、稲橋 佑起[2]、大村 智[2]、塩見 和朗[1,2]、高橋 洋子[2]、松本 厚子[1,2] ([1]北里大院・感染制御、[2]北里大・生命研)
○Akira TAKE[1], Takuji NAKASHIMA[2], Yuki INAHASHI[2], Satoshi OMURA[2], Kazuro SHIOMI[1,2], Yoko TAKAHASHI[2], Atsuko MATSUMOTO[1,2] ([1]Grad. Sch. Infection Control Sci., Kitasato Univ., [2]Kitasato Inst. Life Sci.)

【目的】グラム陽性細菌である放線菌の細胞壁は厚いペプチドグリカン構造を有しており、そのアミノ酸組成が分類の重要な指標として用いられている。また多くの場合、Schleifer & Kandler によるペプチドグリカン構造の分類[1)] に基づきアミノ酸組成からその構造を推定し、分類に応用している。しかし、ペプチドグリカンの構造解析については *Streptomyces roseochromogenes* IAM 53[2)] など、一部の分類群の菌株についての報告例のみで解析はほとんど進んでいない。希少放線菌の一分類群であり、ペプチドグリカンのムラミン酸の *N*-アシル基がグリコリル基であることを特徴とする *Micromonosporaceae* 科の菌株は、29 属に分類されているが、ペプチドグリカン構造は明らかになっていない。そこで、*Micromonosporaceae* 科の *Micromonospora aurantiaca* ATCC 27029^T のペプチドグリカンの一次構造を決定するとともに、本科に属し、ジアミノ酸として ジアミノピメリン酸 (DAP) およびリシンを有する *Phytohabitans suffuscus* K07-0523^T のペプチドグリカン構造を解明することを目的とした。
【方法】対象菌株を yeast extract-dextrose 培地で数週間培養後、集菌した菌体より常法に基づき細胞壁ペプチドグリカンを精製した。精製ペプチドグリカンを 4 M HCl に懸濁し、100ºC, 10 分間の処理で部分加水分解物を得た。HCl を除去した後、アミノ酸誘導体化試薬 N^{α}-(5-fluoro-2,4-dinitrophenyl)-D-leucinamide (FDLA) あるいは糖誘導体化試薬 3-methyl-1-phenyl-5-pyrazolone (PMP) で部分加水分解物を誘導体化し、それぞれのサンプルを LC/MS で解析した。
【結果および考察】*M. aurantiaca* ATCC 27029^T の細胞壁ペプチドグリカンの FDLA 誘導体化サンプルから Gly-Glu, Glu-DAP, DAP-Ala, Gly-Glu-DAP および Glu-DAP-Ala のペプチドが、PMP 誘導体化サンプルからはムラミン酸に Gly-Glu が結合した糖ペプチドが確認できた。このことからムラミン酸に Gly-Glu-DAP-Ala のテトラペプチドが結合した A1γ[1)] タイプの構造であることが確認された。さらに、*P. suffuscus* K07-0523^T についても構造解析を行なったので報告する。
本方法の確立により、既存の分類指標だけでは分類が困難となった放線菌群に、新たな指標を提供できると考えている。

1) K. H. Schleifer & O. Kandler, *Bacteriol. Rev.*, **36**, 407-477, 1972.
2) T. Nakamura *et al*., *Agric. Biol. Chem.*, **41**, 763-768, 1977.

actinomycetes, *Micromonosporaceae*, peptidoglycan

講演番号：2A41p10
講演日時、会場：3 月 27 日 15:49～ A 校舎 41 会場

宿主の状態がプラスミドの接合伝達に及ぼす影響の解析

Effects of host cell condition on conjugation of plasmids

○柳田 晃輔[1]、松井 一泰[1]、新谷 政己[2]、水口(鈴木) 千穂[1]、岡田 憲典[1]、野尻 秀昭[1] ([1]東大生物工学セ、[2]静大院・工)
○Kosuke YANAGIDA[1], Kazuhiro MATSUI[1], Masaki SHINTANI[2], Chiho SUZUKI-MINAKUCHI[1], Kazunori OKADA[1], Hideaki NOJIRI[1] ([1]The Univ. of Tokyo, [2]Shizuoka Univ.)

【背景・目的】細菌間での遺伝子の水平伝播においてプラスミドの接合伝達は最も重要なイベントであるが、実環境中でプラスミドの伝達に影響を与える要因についての検証は未だ不十分である。プラスミドの伝達現象は接合伝達頻度を指標に評価がなされているが、過去の研究報告では個々の接合方法や接合伝達頻度の計算方法などが論文ごとに異なっており、結果を直接比較するのに困難なことが多い。そこで当研究室では、特徴の異なるプラスミドを同じ方法で接合させ、接合伝達頻度を比較することで、各プラスミドの接合伝達に関わる因子の探索を行っている。
【方法・結果】接合実験には異なる不和合性（Inc）群に属している pCAR1(IncP-7)，pB10(IncP-1)，R388(IncW)，NAH7(IncP-7)の 4 種のモデルプラスミドを用い、供与菌・受容菌ともに *Pseudomonas putida* KT2440 株を用いた。昨年度本大会では静置状態での LB 液体培地中での接合（3 時間）において、菌密度を変化（10^9～10^5 CFU/ml）させた際の接合伝達頻度（接合伝達体数／供与菌数）の比較を発表したが、本年は、この条件に加えてフィルター(固体表面)上での接合実験も行って結果を比較した。pCAR1(図 1. 青)はフィルター接合において菌密度低下に伴い接合伝達頻度も約 100 倍低下したが、液体接合においては菌密度低下の影響を受けにくかった。一方 pB10(図 1. 赤)，R388，NAH7 については pCAR1 とは逆の傾向が見られた。接合橋構成タンパク質遺伝子群の保存性から pCAR1 は長く柔らかい性線毛、残りの 3 種は短く硬い性線毛と異なる形状の性線毛を形成すると考えられており、この違いが上記の傾向の原因であると予想した。そこで、長い性線毛を形成することが顕微鏡観察により確認されている F プラスミド(黄)を用いて同様の接合実験を行ったが、傾向は pB10 と同様であった。プラスミド間の比較により、F プラスミドの液体接合での接合伝達頻度の低下や pCAR1 のフィルター接合における接合伝達頻度の低下は物理的な影響では無い可能性が示唆された。

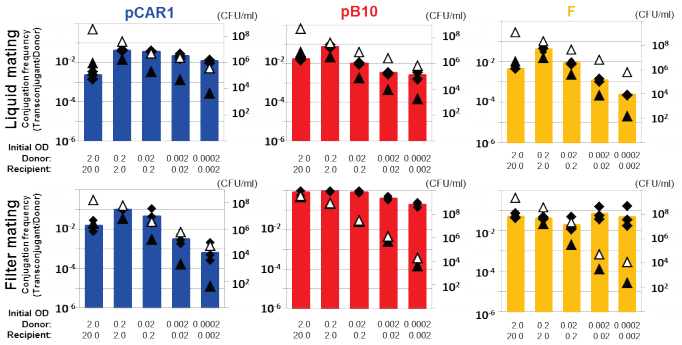


図 1. 菌密度を変化させた際の接合伝達頻度の比較
pCAR1(青)、pB10(赤)、F プラスミド(黄)について、上段は静置条件での液体中での、下段は固体培地に置いたフィルター上での接合実験の結果を示している。横軸は混合時の供与菌・受容菌の OD_{600}、左軸は接合伝達頻度、右軸は供与菌(△)および接合伝達体(▲)の CFU/ml を表している。

plasmid, conjugation, cell density

講演番号：2A41p11
講演日時、会場：3 月 27 日 16:10～ A 校舎 41 会場

循環型浄化槽内における細菌共生関係の探索

Search of symbiotic bacteria in Lab-scale wastewater treatment system

○川西 賢吾、鈴木 智順（東理大・応用生物）
○Kengo KAWANISHI, Tomonori SUZUKI (Tokyo University of Science)

【目的】 自然環境中には、微生物の働きにより有機物が分解されるメカニズムがある。当研究室では、そのモデルとして循環型汚水浄化装置を構築し、有機物分解に関わる微生物群集構造やその機能の解明を目指している。これまでの研究により、有機物の分解過程で微生物群に変化が見られることが分かってきた。これは他者の代謝産物を栄養源として生育する生物がいるためと考えることができる。ところが、これまでの微生物の純粋分離には、微生物の代謝産物を活用することがほとんどなかった。

そこで本研究では、他の微生物の代謝産物を生育に必須とする細菌（代謝産物要求株）の単離・同定を行った。次に、共培養系の構築と培養濾液の成分性状や分析を行い、代謝産物要求株がどのような細菌と共生関係を結ぶのかを明らかにしていくことで、モデル浄化槽内における有機物分解のさらなる解明を本研究の目的とした。

【方法】 代謝産物要求株の純粋分離には、人工汚水培地を循環型浄化装置に投入し、装置内を 1 週間循環した汚水（処理水）を培地として使用した（処理水培地）。この際、処理水の滅菌は熱の影響を考慮して濾過滅菌を行った。純粋分離した菌株を人工汚水培地に植菌し、コロニーの形成が確認できなかったものを代謝産物要求株とし、SY1～SY11 まで 11 株を得た。その後、生育に pH など代謝産物以外のものが関与している可能性を考慮して試験した結果、6 株（SY2、5、6、7、8、9）を本実験に使用する菌株として採用した。これらの株の同定は 16S rDNA の塩基配列に基づいて行った。

さらに、以前に本研究室で人工汚水培地を用いて循環型浄化装置から単離された分離株 57 株との共生関係の有無を解析した。代謝産物要求株と分離株 57 株との共生関係の解析は、57 株培養濾液培地を用いて行った。この培地は、57 株の分離株を個別に培養し、それらの培養液を混ぜ合わせた後、処理水培地の作成方法と同様に濾過滅菌を行うことで作成した。

【結果】 本研究で単離し、供試した 6 株の代謝産物要求株は *Luteimonas* 属、*Campylobacter* 属、*Sphingobacterium* 属、*Sulfurospirillum* 属に含まれる細菌であることが明らかになった。これら代謝産物要求株は 57 株培養濾液培地においても処理水培地と同様に良好な生育が見られ、これまで本研究室で単離した株との共生関係が示唆された。まだ単離に成功していない細菌や、古細菌および真菌などによる代謝産物要求株の生育への関与や複数株が存在するときに代謝産物要求株の生育が促進される可能性がある。これらの他にも HPLC での成分分析や熱処理の有無、人工汚水の透析などによって代謝産物要求株の生育に必要となる因子の性質などについても発表する予定である。

Symbiosis of bacteria, metabolic products, wastewater

講演番号：2A41p12
講演日時、会場：3 月 27 日 16:21～ A 校舎 41 会場

循環型汚水浄化槽内で高い有機物分解能をもつ主要細菌群の特定へ向けた検討

Study for determination of major bacteria decomposing organic substances in the lab-scale wastewater treatment system

○榊原 健太、鈴木 智順（東理大・応用生物）
○Kenta SAKAKIBARA, Tomonori SUZUKI (Tokyo univercity of science)

【目的】 環境浄化技術の開発や排水処理における生物学的処理プロセスの制御を進めていく上で、微生物の挙動や相互作用を解析し、微生物の生態について十分に研究していく必要がある。そこで当研究室では、循環型汚水浄化槽を構築し、その微生物生態学的研究を行っている。

本研究では、細菌・真菌・原生生物など様々な生物が定着し、種々の代謝を行っている循環型汚水浄化槽の細菌に着目し、循環型汚水浄化槽から単離された細菌を用い、それらを各種組み合わせて有機物分解反応を継時的に測定して行くことで、有機物分解に関与する細菌叢や、それら細菌の相互作用が有機物分解にどのような影響を与えるかを解明することを目的としている。

【方法】 循環型汚水浄化槽から細菌株を単離した。単離した株については、16S rRNA遺伝子のシークエンスに基づいて同定を行った。循環型汚水浄化槽から単離した細菌株を各種組み合わせて坂口フラスコ内の人工汚水培地に接種し、ミクロ生態系を構築した。単離株の組み合わせを考える上で、前任者の研究で優占株もしくは代謝活性の高い細菌株と示唆されたFamilyまたはPhylumを抜いた再構成系を作成し、浄化槽から単離した全ての細菌株を入れた再構成系と比較した。

単離した全ての株で構成した「再構成群」、再構成群からPhylum *Firmicutes*を抜いた「Non-*Firmicutes* 群」、Phylum *Bacteroidetes*を抜いた「Non-*Bacteroidetes* 群」、Family *Alcaligenaceae* を抜いた「Non-*Alcaligenaceae* 群」の計4種類のミクロ生態系を作成し、これらを人工汚水培地で振盪培養し、COD, TOC, pHを継時的に測定する方法で、それぞれの有機物分解能を比較した。微生物の代謝活性の高さは16S rRNA を抽出し、RT-PCR-DGGE のバンドの濃さにより比較した。

【結果】 4 種類のミクロ生態系について測定を行った結果、COD、TOC の挙動から見る有機物分解能は、「再構成群」＞「Non-*Bacteroidetes* 群」＞「Non-*Firmicutes* 群」＞「Non-*Alcaligenaceae* 群」の順に高い事が分かった。 また、RT-PCR-DGGEのバンド解析は継続中であるが、*Providencia* sp.、*Alcaligenes* sp.、*Alcaligenes faecalis* subsp. *faecalis*、*Sphingbacterium* sp.、*Arthrobacter* sp.、*Proteus* sp.のバンドが同定された。

これらの結果と解析中のバンドも含めて、高い代謝活性をもつと示唆された株のみの再構成系と、代謝活性をあまり示さなかった株も加えた各種再構成系との有機物分解能を比較し、高い代謝活性を示した株のみでその代謝活性を維持できるのか、それとも低い代謝活性を示すが他の株の代謝活性を上げることに関わる株がいるのかについての考察も発表する予定である。

lab-scale wastewater treatment system, TOC, PCR-DGGE

講演番号：2A41p13
講演日時、会場：3 月 27 日 16:32～ A 校舎 41 会場

循環型浄化槽における脱窒菌の細菌叢解析と脱窒過程に与える環境要因の影響

Analyses of denitrifiers flora and the effect of environmental factors on denitrifying activity in the lab-scale wastewater treatment system

○岩井 正幸、鈴木 智順（東理大・応用生物）
○Masayuki Iwai, Tomonori Suzuki (Tokyo University of Science)

[目的] 当研究室では、窒素をはじめとする物質循環を細菌叢や水質でモニタリングするために循環型の汚水処理装置を構築している。本浄化槽は好気槽と嫌気槽からなり、脱窒過程はこの嫌気槽で細菌や真菌が行っていると考えられている。本浄化槽の嫌気槽は脱窒が起こる条件は整っているにも関わらず、活発な脱窒反応が確認できていなかった。そこで、何らかの環境要因が脱窒の律速要因になっていると考え、脱窒に影響を及ぼすそれらの要因を明らかにすることで、より効率的な汚水中の窒素除去を目指した。

[方法] 循環型汚水浄化槽での脱窒過程を担っている細菌を明らかにするため、嫌気的アンモニア酸化（Anammox）細菌を含めた細菌叢の解析を行った。Anammox 細菌の解析には、rRNA に基づいた PCR-DGGE 法と培養法を用いた。また、培養法により浄化槽由来の脱窒細菌の単離を試みた。浄化槽から細菌群を採取し、そのまま培養した複合培養系と、細菌群から純粋分離した分離株を単一で培養した純粋培養系とで、脱窒能にどのような違いがあるのかを評価した。この際、脱窒の指標として硝酸態窒素量、亜硝酸態窒素量および *nosZ* 遺伝子発現量を経時的にモニタリングした。*nosZ* の mRNA の定量には RT-qPCR 法を用いた。また、環境要因により複合培養系、純粋培養系で脱窒反応に変化があるのかを明らかにするため、培養の際に pH や温度などを変化させ、上記の指標がどのように変化するかモニタリングした。

[結果] 本研究で培養法により単離できた細菌は *Alcaligenes* sp. 2 株、*Pseudomonas* sp., *Sphingobacterium* sp.であった。一方、PCR-DGGE 法による解析により、本浄化槽内の脱窒において Anammox 細菌はほとんど働いていないことが示唆された。複合培養系と純粋培養系における脱窒能を比較する実験では、硝酸態窒素量、亜硝酸態窒素の減少が複合培養系よりも純粋培養系の方が早いという結果が得られた。この原因として考えられるのは、複合微生物系では脱窒菌よりも増殖能に優れる他の微生物が優占となり、脱窒能を低下させている可能性である。

環境要因による影響は pH8、40℃付近で最も脱窒能が高いことが示唆され、他の環境要因による影響も併せて報告する予定である。*nosZ* の発現については、環境要因に関わらず発現していることが示された。また発現量も環境要因に依存することはなかったことから、亜酸化窒素還元酵素遺伝子の発現と脱窒能には必ずしも相関があるとは言えないことが示唆された。

Denitrification, environmental factor, wastewater

講演番号：2A41p14
講演日時、会場：3 月 27 日 16:43～ A 校舎 41 会場

循環型浄化槽における真核生物および細菌の有機物分解メカニズム解析

Organic substances decomposition mechanism analyses of eukaryotes and bacteria in Lab-scale wastewater treatment system

○永井 茜、鈴木 智順（東理大・応用生物）
○Akane NAGAI, Tomonori SUZUKI (Tokyo Univ. of Science Dept. of Applied Biological Science)

【目的】 本研究室では、循環型モデル浄化槽を構築して、その浄化槽内での有機物分解について、微生物生態学的に研究を行っている。循環型モデル浄化槽では、細菌・真核微生物・原生生物などのさまざまな微生物が定着しているが、それらの相互作用については未だ大部分が解明されていない。本研究では、その中でも特に細菌と真核微生物に着目し、その相互作用が好気槽、嫌気槽それぞれにおいて有機物分解にどの様な影響を与えるのかを明らかにする事を目的としている。

【方法】 好気条件・嫌気条件それぞれにおいて、細菌と真核微生物の共生（「浄化槽微生物群」）・細菌のみ（「細菌群」）・真核微生物のみ（「真核微生物群」）の計6つの条件のミクロ生態系を構築した。「細菌群」については、メンブレンフィルターで真核微生物を除去し、「真核微生物群」については、循環型モデル浄化槽から単離した純粋分離株を用いることにより実現した。有機物分解能の評価は経時的に測定された TOC・アンモニア態窒素・pH・細胞数を比較することで行った。また、代謝活性量の高い微生物叢を推定するため、それぞれのミクロ生態系から抽出された rRNA の RT－PCR－DGGE を行った。

【結果】 TOC の挙動から、有機物分解能は好気条件、嫌気条件共に「浄化槽微生物群」 ＞ 「細菌群」 ＞ 「真核微生物群」の順に高くなった。ただし、「浄化槽微生物群」と「細菌群」との差はほとんどなかった。このことから循環型モデル浄化槽においての有機物分解の主役は細菌であり、真核微生物はあまり有機物分解には関与していないということが示唆される。また、RT－PCR－DGGE の結果から、好気条件、嫌気条件共に「浄化槽微生物群」の方が「細菌群」よりもバンド数が多くなったことが示された。このことから、真核微生物群との相互作用により微生物叢に変化が起きている可能性が示唆される。それぞれのミクロ生態系で代謝活性の高い微生物を推定し、その特定を行い、併せて報告する予定である。

microcosmos, waste water, RT-PCR-DGGE

講演番号：2A41p15
講演日時、会場：3 月 27 日 16:54～ A 校舎 41 会場

循環型汚水浄化装置内の細菌叢遷移とタンパク質代謝系の解析

Dynamics of the bacterial community composition and analyses of protein metabolism system in the lab-scale wastewater treatment system

○有見 芳樹、小柳 芽衣、鈴木 智順（東理大　応用生物）
○Yoshiki Arimi, Mei Oyanagi, Tomonori Suzuki (Tokyo University of Science)

【目的】 水質浄化において窒素やリンの挙動、難分解性物質などの分解機構は盛んに研究されているが、普遍的な微生物活動である易分解性有機物の分解に関わる細菌群の種類や分解機構は十分に解明されていない。本研究では、易分解性有機物の分解に関わる細菌群の種類とタンパク質の代謝系を解析し、それらの関連性を考察することで、普遍的な有機物分解反応の解明を目的としている。
【方法】 有機物分解過程を細菌叢、水質の両面でモニタリングが可能なラボスケールの循環型汚水浄化装置を構築した。これはスポンジを担体とした好気層、嫌気層からなり、好気・嫌気的な逐次的反応系を持つ装置である。この装置に生活排水を模した人工汚水を循環させ、装置内の担体に定着させた微生物群により有機物の分解を行っている。人工汚水を投入した時点から経過時間毎に細菌叢と水質の変化を追った。細菌群集構造解析のため、16S rDNA-PCR-DGGE 法を行った。また、代謝活性の高い細菌叢を解析するため、16S rRNA-RT-PCR-DGGE 法を行った。さらに、タンパク質分解反応の過程を解析するため、各種プロテアーゼ活性（Aminopeptidase、Trypsin、Chymotrypsin 型の計 3 種類）の測定、水質項目として TOC、COD、BOD、pH、タンパク質量、アンモニア態窒素量、細菌数をそれぞれ測定した。
【結果】 一度目のモニタリング実験の結果、総プロテアーゼ活性で二度のピークが見られ、また各種プロテアーゼ活性にも経過時間毎に異なったピークを確認した。同時に測定した TOC は 6 h でピークがみられた後に減少傾向を示した。これらの結果から、有機物の分解過程は合成と分解による顕著なタンパク質の増減が繰り返されて進行すると考えられる。また、TOC の変化が小さくなった測定経過時間後半にもプロテアーゼ活性には変動が見られ、総有機物量に変化がなくてもタンパク質を分解し続けるのではないかと予想される。二度目のモニタリング実験では、TOC に加えて、COD・BOD の測定を同時に行った。COD・TOC が始めに大きなピークを迎えた後に減少傾向を示し、BOD は初めに大きなピークを迎えた後に、再び小さなピークが確認された。プロテアーゼ活性は高分子のタンパク質を分解する Trypsin 型、Chymotrypsin 型の酵素が始めに高い活性を示した一方で、低分子のタンパク質を分解する Aminopeptidase 型は徐々に活性が高くなった。各種プロテアーゼ活性が高くなった時間は BOD のピークが確認された時間と関連が見られた。また、タンパク質量に関しても、後半の変化が小さくなったにも関わらず、Aminopeptidase 型の活性が上昇したことから、タンパク質の分解と合成が並行で行われていると考えられる。タンパク質のより細かな変化を見るためには、プロテアーゼ活性の挙動を追うことが有用である。それらの各反応に伴った細菌叢の変化と代謝活性の高い細菌叢の変化については PCR-DGGE 法と RT-PCR-DGGE 法によって解析し、報告する予定である。

PCR-DGGE, Bacterial flora, protein degradation

講演番号：2A41p16
講演日時、会場：3 月 27 日 17:15～ A 校舎 41 会場

異なる土壌環境におけるアンモニア酸化細菌およびアンモニア酸化古細菌の比較解析

Comparison analys of ammonia oxidizing bacteria and archaea in different soil environments

○中俣 慶彦、鈴木 智順（東理大・応用生物）
○Yoshihiko Nakamata, Tomonori Suzuki (Tokyo University of Science)

［目的］ アンモニア酸化反応とは、硝化反応の一部であり、窒素循環において重要な反応経路である。その反応を担うと考えられているアンモニア酸化細菌（Ammonia oxidizing bacteria ： AOB）とアンモニア酸化古細菌（Ammonia oxidizing archaea ： AOA）は培養が困難であり、生理学的・生態学的特徴や、生育環境の違いによる菌叢の変化などについて未知の部分が多い。本研究では、土壌中の pH、水分量、窒素成分や炭素成分の違いが AOB 叢や AOA 叢に与える影響を解明するために、土壌パラメーターとして温度、pH、水分量、各種無機態窒素量、タンパク質量、糖量、鉄、有機物量を測定すると共に、PCR-DGGE 法により各土壌環境における AOB・AOA 叢の解析を行った。

［方法］ 環境の異なる 7 地点で、深さ 15 cm 程度から土壌を採取し、DNA 抽出および各種土壌成分測定を行った。また、季節ごとの変化を解析するため、3 か月ごとのサンプリングを行い、DNA 抽出および各種成分測定を行った。抽出した DNA は AOA もしくは AOB 特異的プライマーを用いて PCR を行い、DGGE によって菌叢を確認し、クラスター解析を行った。

［結果］ PCR-DGGE 法による菌叢解析の結果、AOA は AOB よりも多様性に富んでいた。また、それぞれの菌叢の季節ごとの変化を見た結果、AOA 叢は季節による変動は見られず、クラスター解析を行ったところ、場所ごとにクラスターを形成した。AOB 叢は花壇やクリーンセンター裏では季節による変動は見られなかったが、フットサル場脇では冬に菌叢が変化し、異なるクラスターに含まれた。場所による比較では、AOA、AOB の両方で、多様性の低いクラスターと高いクラスターに分かれた。AOA では、蓮池水際、花壇、危険物屋内貯蔵室裏が多様性の低いクラスターに含まれ、蓮池土手、フットサル場脇、グラウンド脇、クリーンセンター裏が多様性の高いクラスターに含まれた。また、AOB では、フットサル場脇、花壇、クリーンセンター裏が多様性の低いクラスターに含まれ、蓮池の土手と水際、グラウンド脇、危険物屋内貯蔵室裏が多様性の高いクラスターに含まれた。各種土壌成分と菌叢のクラスター解析の結果についても併せて発表する予定である。

ammonia oxidizing, PCR-DGGE, soil environments

講演番号：2A41p17
講演日時、会場：3 月 27 日 17:26～ A 校舎 41 会場

水稲根圏より分離したタイプⅠメタン酸化細菌 *Methylomagnum ishizawai* gen. nov., sp. nov.
Methylomagnum ishizawai gen. nov., sp. nov., a type Ⅰ methanotroph isolated from rice rhizosphere

カァリファ アシュラフ[1,2]、李 哲揆[1]、小木曾 拓也[1]、上野 千穂子[1]、ディアノウ ディエリ[1,3]、出町 豊子[4]、片山 新太[4]、○浅川 晋[1] ([1]名古屋大院生命農、[2]エジプト ベニ・スエフ大、[3]ブルキナファソ 国立科学技術研究センター、[4]名古屋大エコトピア科学研究所)
Ashraf Khalifa[1,2], Chol Gyu Lee[1], Takuya Ogiso[1], Chihoko Ueno[1], Dayeri Dianou[1,3], Toyoko Demachi[4], Arata Katayama[4], ○Susumu ASAKAWA[1] ([1]Grad. Sch. Bioagric. Sci., Nagoya Univ., [2]Beni-Suef Univ., Egypt, [3]CNRST, Burkina Faso, [4]EcoTopia Sci. Inst., Nagoya Univ.)

［目的］メタン酸化細菌は水田からのメタン放出に大きな影響を及ぼすため、その生態解明は重要である。好気性のメタン酸化細菌は、メタンを唯一のエネルギー源および炭素源として生育する微生物である。主として、γおよびαサブクラスのプロテオバクテリアに属する細菌であり、それぞれタイプⅠ、タイプⅡと呼ばれる。これまでに水田生態系から分離されたメタン酸化細菌の多くがタイプⅡに属する菌であった。本報告では、水田に生息するタイプⅠのメタン酸化細菌の生態解明を目的に、水稲根圏より分離したタイプⅠの菌株について、形態や生理的、化学分類学的、遺伝的および系統遺伝的特徴を明らかにし、分類学的検討を行った。
［方法］気相のメタン濃度を 25%とした硝酸塩無機塩培地に、愛知県安城農業技術センター内の水田圃場より採取した水稲根圏土壌の懸濁液を接種後、30℃で集積培養を行った。菌株は、集積培養液より、斜面および平板培地によるコロニー単離と液体培養による植え継ぎを繰り返し、純化し分離した。得られた RS11D-Pr 株について、細胞形態、生理的性質、DNA の G+C 含量の調査、脂肪酸およびキノンの分析、16S rRNA、*pmoA*、*mmoX*遺伝子の塩基配列の解析を行った。
［結果と考察］RS11D-Pr 株は 2.0～4.0×1.5～2.0μm のグラム陰性の桿菌で運動性を有した。極鞭毛を有し、タイプⅠに特徴的な細胞内膜構造が認められた。生育基質としてメタンとメタノールのみを利用した。最適生育温度、pH、NaCl 濃度はそれぞれ 31～33℃、6.8～7.4、0～0.2%であった。DNA の G+C 含量は 64.1 mol%、主要な脂肪酸は $C_{16:1}\omega7$、$C_{16:0}$ と $C_{14:0}$ であり、主要なキノンは MQ-8 であった。これらの形態的・生理的・化学分類学的性質および *pmoA* と *mmoX*遺伝子の系統解析結果は、RS11D-Pr 株が *Methylococcaceae* 科に属することを示唆した。16S rRNA 遺伝子の系統解析によっても、RS11D-Pr 株は *Methylococcus*、*Methylocaldum*、 *Methyloparacoccus*、*Methylogaea* 属に近縁であることが示されたが、最近縁の *Methyloparacoccus murrelli* の基準株との間の 16S rRNA 遺伝子の塩基配列の相同性は 94.6%と低かった。大きい桿状の細胞形態で運動性を有すること、中温性･好中性であること、0.5%の NaCl 濃度で生育しないことなどの表現型に関し、*Methylococcus, Methylocaldum, Methyloparacoccus, Methylogaea* の各属とは異なる特徴が見られた。以上の表現形質、遺伝的および系統遺伝的性質の特徴に基づき、RS11D-Pr 株は *Methylococcaceae* 科の新属新種であると考えられ、新属新種名 *Methylomagnum ishizawai* を提案する。

methane-oxidizing bacteria, paddy field, rice rhizosphere

講演番号：2A41p18
講演日時、会場：3 月 27 日 17:37～ A 校舎 41 会場

Comparation of N_2O-emitting bacteria and bacterial community between *Sphagnum fuscum* and *Sphagnum capilifolium* in the boreal peat

○ Yanxia NIE[1], Teemu Tahvanainen[2], Mengcen Wang[1,3], Yasuyuki Hashidoko[1] ([1]Hokkaido University, [2]University of Eastern Finland, [3]Zhejiang University)

Background: Nitrous oxide (N_2O) is a potent greenhouse gas involved in the depletion of stratospheric ozone. Boreal sphagnum moss peat is a carbon sink and often becomes an active source of N_2O. The objective of our study is to compare the capacity of N_2O emission and search for major N_2O emitters in *Sphagnum capilifolium* and *Sphagnum fuscum*, both of which are a ground *Sphagnum* moss which collected from Kilpisjärvi National Park (69°02′N; 20°82′E) in Finland.

Methods: For the N_2O emission assay, an amount of 1 g L^{-1} KNO_3 was added as the substrate for N_2O production to Winogradsky's mineral solution gelled with 3 g L^{-1} gellan gum (10 mL, pH 5.0) in gas-chromatography vials. The medium was inoculated with an aliquot (100 μL) of the grounded sphagnum moss suspension (10 mg fresh weight in 10 ml of sterilized MiliQ water) or directly 0.1 g moss tissues. After incubation at 15°C for 7 days, N_2O gas in each headspace (22.6 ml) was monitored using an ECD-gas chromatography. Cultured media that produced significant amounts of N_2O were spread on a PDA plate to isolate N_2O-emitting eubacteria. Using sequence homology of each 16S rRNA gene, N_2O-emitting bacteria were identified and characterized respectively. Detection of functional genes associated with denitrification, *narG* and *nosZ* were performed by using PCR assay. In addition, 16S rRNA gene-targeted PCR-DGGE was carried out for the analysis of the bacterial community on *S. capilifolium* and *S. fuscum* phyllosphere.

Results and Discussion: Compared with phyllosphere bacteria of *S. fuscum*, those of *S. capilifolium* showed relatively higher capacity of N_2O emission. Regarding of N_2O-emitting bacterium, *Burkholderia* sp. as N_2O emitters was isolated from *S. fuscum*, while *Burkholderia* sp. and an Enterobacteriaceae bacterium were isolated from *S. capilifolium*. All the N_2O emitters harbor *narG* gene, indicating that they belong to the denitrifiers, but all of them are missing *nosZ* gene. It suggested that the reduction process from N_2O to N_2 was inhibited because of lacking the pivotal enzyme activity of N_2O reductase encoded by *nosZ*. PCR-DGGE analysis showed that both of the *Sphagnum* mosses possess a similar bacterial microflora, such as *Mucilaginibacter* sp., *Janthinobacterium* sp., *Burkholderia* sp., *Leptothrix* sp., *Rhodanobacter* sp., and *Luteibacter* sp., with some differences between them. For example, an Enterobacteriaceae bacterium only inhabited *S. capilifolium* phyllosphere. Conversely, a Xanthomonadaceae bacterium of *Dyella* sp. was only found in *S. fuscum*. Moreover, the abundance of *Luteibacter* sp. in *S. capilifolium* is higher than that in *S. capilifolium*. It would be further investigated whether these *Sphagnum* moss species-specific epiphytic bacteria assist N_2O production directly or indirectly.

Sphagnum moss, nitrous oxide (N_2O) emitters, boreal peat bog

講演番号：2A41p19
講演日時、会場：3 月 27 日 17:48～ A 校舎 41 会場

Isolation of polyphosphate-accumulating organisms through single cell analysis of microbial communities using fluorescence-activated cell sorting

○Mia Terashima[1,2], Kato Souichiro[1,2], Yoichi Kamagata[1,2] ([1]Hokkaido Univ., [2]Bioproduction Research Institute AIST)

With their immense genetic and ecological diversity, microbial species make up the largest group of organisms on this planet. However, it is estimated that only a small fraction of microbes have been isolated and cultivated. Advances in methods such as next-generation sequencing have allowed identification of yet-to-be cultured species in a community. However, high-throughput methods to analyze phenotypes of individual cells from a community are still limited. Fluorescence-activated cell sorting (FACS) can analyze and isolate single cells at rates far over 5,000 cells per second using a range of fluorescence probes. In addition to the speed of analysis, one of the major advantages of FACS is the ability to analyze and isolate living cells.

In order establish a method for microbial community FACS analysis, we first targeted polyphosphate-accumulating organisms (PAOs) in wastewater sludge samples using 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), which stains both DNA and polyphosphates, but with distinct fluorescence emission profiles. Previous 16S rRNA community analyses on wastewater sludge samples have indicated the presence of PAOs, including some remaining to be isolated. Through our FACS analysis, we aimed to target novel or uncultivated PAOs. We confirmed polyphosphate staining of sludge community with DAPI by microscopy and also found that most cells remain viable after staining. DAPI-stained sludge community was analyzed by FACS, and cells with increased yellow polyphosphate fluorescence were collected. Those cells were recovered on plates, followed by colony picking and 16S rRNA gene identification. Follow-up work on isolates confirmed that many accumulate intracellular polyphosphate granules and some had low 16S rRNA gene identity to known species. FACS of DAPI-stained sludge microbial community enabled the simultaneous monitoring of DNA and polyphosphate contents at the single cell level, leading to successful isolation of PAOs.

FACS, Polyphosphate, Microbial community

講演番号：2A41p20
講演日時、会場：3 月 27 日 17:59～ A 校舎 41 会場

希土類元素含有磁性粒子を形成する磁性細菌の探索

Isolation of magnetotactic bacteria formed rare earth metals doping of magnetosomes from aquatic environments

○下重 裕一[1]、水木 徹[1]、中島 義賢[1]、小林 英城[2]、島村 繁[2]、井上 明[1]、前川 透[1] ([1]東洋大学、[2]海洋研究開発機構)

○Hirokazu SHIMOSHIGE[1], Toru MIZUKI[1], Yoshikata NAKAJIMA[1], Hideki KOBAYASHI[2], Shigeru SHIMAMURA[2], Akira INOUE[1], Toru MAEKAWA[1] ([1]Toyo Univ., [2]JAMSTEC)

磁性細菌は鉄イオンを菌体内に取り込み、マグネトソームと呼ばれる細胞内小器官で種特異的な形状のマグネタイト結晶（Fe_3O_4）またはグレイガイド結晶（Fe_3S_4）から成る磁性粒子を合成する。近年、鉄イオン以外の遷移金属イオンを磁性粒子に含有させた報告例がある。Staniland らは、*Magnetospirillum* 属 3 株にコバルトを磁性粒子に含有させて保磁力を増加させた（1)。また、*M. magneticum* AMB-1 株を用いてコバルト以外にもマンガンおよび銅を磁性粒子に含有させた報告例がある（2)。本研究では、強力な永久磁石材料として知られるレアアースメタル（希土類元素）に着目し、磁気特性に大きな影響が期待される希土類元素を含有可能な磁性粒子を形成する磁性細菌の探索を行った。

分離源は主に池、湖沼、河川および海洋などの泥とした。希土類元素を含む磁性細菌用培地に分離源から磁気回収操作で濃縮した磁性細菌を植菌し、28℃、暗所にて 1-2 週間培養を行った。培養後、磁気回収装置で磁性細菌を回収し限界希釈法にて単離を行った。単離株から磁性粒子を抽出･精製し、エネルギー分散型 X 線分析装置（EDS）による磁性粒子の元素分析を行い、希土類元素の含有の有無を確認した。希土類元素の含有が確認された菌株を候補株とし、16S rRNA 遺伝子塩基配列に基づく系統解析による近縁種の推定を行った。また候補株の磁性粒子の構造を明らかにするために、X 線光電子分光装置（XPS）による表面元素分析および X 線回折装置（XRD）による結晶構造解析を行った。

埼玉県内の農業用水路からサマリウムを含有可能な磁性粒子を形成する MWK-29 株の取得に成功した。その候補株である MWK-29 株は、既知近縁種と 99％の相同性を示し、*Magnetospirillum magneticum* の近縁種であることが判った。EDS 分析結果からその磁性粒子のサマリウム含有率は約 1.4％であった。また XPS および XRD 分析結果から、その磁性粒子は、マグネタイト（Fe_3O_4）粒子表面を酸化サマリウム（Sm_2O_3）で覆われたコアシェル構造であることが明らかとなった。

【参考文献】

(1) S. Staniland *et al. Nature Nanotechnol*, 3, pp158-162, 2008.
(2) M. Tanaka *et al. J. Mater. Chem*, 22, pp11919-11921, 2012.

Rare earth metals, magnetotactic bacteria, aquatic environments

講演番号：2B21a02
講演日時、会場：3 月 27 日 09:11～ B 校舎 21 会場

歯周病原性細菌 *Eikenella corrodens* におけるゲノム再編による溶血活性の発現
Expression of hemolytic activity by genomic recombination in periodontopathogenic bacterium *Eikenella corrodens*

○高原 沙里[1]、下川床 愛[1]、野杁 由一郎[2]、阿座上 弘行[1] ([1]山口大農、[2]阪大歯)
○ Sari TAKAHARA[1], MEI SHIMOKAWATOKO[1], Yuichiro NOIRI[2], Hiroyuki AZAKAMI[1] ([1]Yamaguchi Univ., [2]Osaka Univ.)

歯周病原性細菌*Eikenella corrodens*の臨床分離株1073を羊血液寒天培地で培養すると、コロニーの周りが透明になるβ溶血が観察される。この溶血活性は、本菌の病原性の指標であるレクチン活性と相関が見られた。本研究では、本菌の溶血因子の精製および解析を行い、溶血と病原性との関わりを明らかにすることを目的としている。

まず、*E. corrodens* 1073 株の培養液から溶血因子の精製を試みた。1073 株を定常期まで培養後、培養上清、細胞外被(Cell envelope)画分、細胞質画分に分け、溶血アッセイを行ったところ、細胞外被画分に活性が見られた。そこで、細胞外被画分を n-オクチル-β-D-グルコシドで可溶化し、DEAE-Toyopearl および Q-Sepharose を使って陰イオン交換クロマトグラフィーにかけ、強い溶血活性を示すフラクションを得ることができた。さらに、この画分を Sephadex G-75 によるゲル濾過にかけたところ、溶血活性を示す単一なバンドにまで精製できた。そこで、このタンパク質の N 末端アミノ酸配列を決定したところ、*E. corrodens* 23834 株の X-プロリルジペプチジルアミノペプチダーゼの N 末配列とほぼ一致していた。このことから、X-プロリルジペプチジルアミノペプチダーゼが溶血に関与していることが示唆された。

しかし、1073 株からはアミノペプチダーゼ活性は認められなかった。また、PCR 解析から、1073 株の X-プロリルジペプチジルアミノペプチダーゼ遺伝子領域は、溶血活性を示さない 23834 株のものとは異なっていた。以前の研究により、23834 株にリコンビナーゼ遺伝子を導入すると、ゲノムの再編が起こり、レクチン活性の上昇や溶血活性の発現が見られるようになること、さらに、この再編が起こったゲノムは 1073 株のゲノム構造とほぼ同じであることが示されている。これらのことをまとめると、1073 株では X-プロリルジペプチジルアミノペプチダーゼ遺伝子内でゲノム再編が起こり、その結果溶血因子をコードする遺伝子が出現している可能性が示唆された。

Eikenella corrodens, hemolysis, genomic recombination

講演番号：2B21a03
講演日時、会場：3 月 27 日 09:22～ B 校舎 21 会場

σ E の欠失による大腸菌の致死性は TA システムトキシンの活性化により抑制される
Lethality caused by the loss of σ^E is suppressed by the activation of TA system toxins in *Escherichia coli*.
大門 康志 [1]、○成田 新一郎 [2]、秋山 芳展 [1] ([1] 京都大学、[2] 盛岡大学)
Yasushi Daimon[1], ○Shin-ichiro Narita[2], Yoshinori Akiyama[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Univ. Morioka)

大腸菌をはじめとするグラム陰性細菌の外膜は、生体分子が高度にオーガナイズされた構造体として作り上げられ、外的環境からの化学物質の侵入に対して効果的な透過障壁として機能している。外膜の構造と機能を維持する上で重要なのが表層ストレス応答機構であり、細胞表層に異常なタンパク質が蓄積すると、そのストレスに対抗して働く様々な遺伝子産物の発現が誘導される。σ^E 依存的表層ストレス応答では、通常は膜結合型のアンチ σ^E タンパク質に結合して不活性な状態に保たれている σ^E 因子が、プロテアーゼを介したストレスシグナルの伝達を経て遊離し、ストレス応答遺伝子の転写に働く。σ^E は通常の培養条件でも大腸菌の生育に必須であることが知られているが、その理由は定かでない。これまでに、σ^E が無くても生育できるようになったサプレッサー変異株が単離されており、その一つに *hicB* 遺伝子の欠失株がある。*hicB* はトキシン-アンチトキシン（TA）システムのアンチトキシンをコードし、トキシンをコードする *hicA* とオペロンを構成する。TA システムは原核生物に広く保存された遺伝子対で、通常の生育条件ではアンチトキシンが結合することでトキシンを不活化しているが、細胞が栄養飢餓などストレスに晒されると TA 遺伝子の発現が低下し、その結果不安定なアンチトキシンが優先的に分解されることでトキシンが活性化し、様々な細胞障害を引き起こす。しかし、アンチトキシンをコードする遺伝子の欠失がなぜ σ^E 欠失による致死性を抑制するかはわかっていない。

hicA と *hicB* を同時に欠失する株では、σ^E を欠失させることができなかった。しかし、この株で HicA を発現させると σ^E 欠失による致死性が抑制された。これに対して HicA の RNA 切断活性を欠く HicA(H23A)変異体を発現させた場合は抑制が見られなかった。これらの結果から、σ^E 欠失による致死性を抑制するためには、HicA トキシンの活性化が必要であることが明らかとなった。σ^E 欠失による致死性は、HicA だけでなく、他の TA システムのトキシン（HigB および YafQ）によっても抑制することができた。また我々は、上述のような遺伝子操作を行わなくても、大腸菌を低濃度の抗生物質の存在下で培養することにより、σ^E 欠失による致死性を抑制できることを見いだした。本発表では、この現象にも TA システムが関与していることを支持する実験結果を合わせて報告する。

toxin-antitoxin system, sigma factor, stress response

講演番号：2B21a04
講演日時、会場：3 月 27 日 09:33～ B 校舎 21 会場

マグネシウムによる L34 リボソームタンパク質機能の相補

Defect in the formation of 70S ribosomes caused by lack of ribosomal protein L34 can be suppressed by magnesium

○赤沼 元気[1]、小林 亜湖[1]、河村 富士夫[2]、志波 優[3]、渡辺 智[4]、吉川 博文[4]、石塚 盛雄[1]([1]中央大・理工、[2]立教大・理、[3]東農大・NGRC、[4]東農大・応生科)
○ Genki AKANUMA[1], Ako KOBAYASHI[1], Fujio KAWAMURA[2], Yuh SHIWA[3], Satoru WATANABE[4], Hirofumi YOSHIKAWA[4], Morio ISHIZUKA[1] ([1]Chuo Univ., [2]Rikkyo Univ., [3]Tokyo University of Agriculture, NGRC, [4]Tokyo University of Agriculture)

私たちはこれまでに枯草菌ゲノムにコードされている 57 種のリボソームタンパク質遺伝子のうち、22 種が実は非必須であることを見出している。50S サブユニット構成タンパク質の一つである L34 をコードする *rpmH* も非必須遺伝子であり、*rpmH* 破壊株では著しい 70S リボソーム複合体形成異常とそれに伴う生育遅延が観察される。この Δ*rpmH* 株より、生育速度の回復した 2 種のサプレッサー変異株を単離し、ゲノムシークエンスにより変異部位を同定した。その結果、Mg^{2+}の排出に関与すると予想される YhdP と、Mg^{2+}の取込みを担う MgtE をコードする遺伝子にそれぞれ変異が導入されていることが判明した。これらがサプレッサー変異であることを遺伝子破壊と高発現により検証し、*yhdP* 遺伝子破壊と *mgtE* 高発現のそれぞれが Δ*rpmH* の生育速度を回復させることを見出した。Mg^{2+}排出の抑制と Mg^{2+}取込みの促進によって効果が観察されたことから、細胞内 Mg^{2+}濃度の向上が L34 欠損による影響をサプレスしていると予想し、各変異株細胞における Mg^{2+}含有量を測定した。その結果意外にも、Δ*rpmH* 株では野生株と比較して顕著な Mg^{2+}含有量低下が観察され、*yhdP* 遺伝子破壊と *mgtE* 高発現によって Mg^{2+}含有量の回復が確認された。Mg^{2+}はリボソームサブユニット同士の会合や、rRNA とリボソームタンパク質の結合に必要であり、リボソームの構造維持には欠かせない元素である。L34 欠損により異常蓄積する 50S サブユニットには L16 リボソームタンパク質も欠落しているが、細胞内 Mg^{2+}濃度の向上によって L16 結合能が回復し、70S リボソーム複合体形成異常もサプレスされた。Mg^{2+}濃度向上による 70S 複合体形成能の回復は *in vitro* でも観察されたことから、マグネシウムが L34 機能の一部を相補することで Δ*rpmH* 株における 70S リボソーム量を回復させ、生育遅延をサプレスしたと考えられる。上記の結果に加え、なぜ L34 欠損が細胞内 Mg^{2+}含有量を低下させたのかという点に関する考察も併せて発表する。

ribosome, magnesium, Bacillus subtilis

講演番号：2B21a05
講演日時、会場：3 月 27 日 09:44～ B 校舎 21 会場

Bacteroidetes 門微生物の窒素固定に関する諸解析
Analyses for nitrogen fixation of Bacteroidetes bacteria
○井上 潤一[1,2]、本郷 裕一[3]、坂本 光央[1]、大島 健志朗[4]、服部 正平[4]、大熊 盛也[1]([1]理研 BRC-JCM、[2]シナプテック株式会社、[3]東工大院　生命理工、[4]東大院　新領域)
○Jun-ichi INOUE[1,2], Yuichi Hongoh[3], Mitsuo Sakamoto[1], Kenshiro Ohshima[4], Masahira Hattori[4], Moriya Ohkuma[1] ([1]RIKEN BRC-JCM, [2]Synaptech Inc., [3]Tokyo Tech., [4]Tokyo Univ.)

【背景と目的】Bacteroidetes 門に属する細菌はヒトやシロアリ等動物の腸内をはじめ、嫌気性の環境中に広く分布している微生物グループである。これまでに、Bacteroidetes 門に属する細菌群について窒素固定に関する証拠は得られていないが、近年の大規模なゲノム配列解読によって窒素固定に関連すると予想されるニトロゲナーゼ遺伝子（nif）群の相同配列が取得された。しかし、実際に窒素固定の機能を発現しているかどうかは証拠がなく不明である。本研究では Bacteroidetes 門細菌の nif 相同遺伝子について配列の特徴や機能についての解析を行った。
【方法と結果】Bacteroidete 門細菌の基準株を中心に新たに 62 株についてゲノム配列解読を行った。データベース上のゲノム配列情報と合わせ、全 1,346 株について窒素固定関連遺伝子群の配列取得を試みた。未培養株を含む 9 株から nif 相同遺伝子配列群が得られ、多くはクラスターとして同じコンティグ上にコードされていた。ニトロゲナーゼには活性の発現に重要な 6 つのサブユニット（H、D、K、E、N、B）が知られているが、Bacteroides reticulotermitis を除いて全て保存されていることがわかった。Paludibacter propionicigenes については nif と合わせて anf（alternative nitrogen fixation gene）と呼ばれる配列の両方が取得された。
最尤法による系統解析により、nif 相同配列の多くは Bacteroidetes 門内において単系統性を示した。また、B. reticulotermitis は nifE と nifN に相同な nifE 様、nifN 様配列と呼ばれる機能未知の相同配列を有していることがわかった。
ニトロゲナーゼが発現するもう 1 つの活性として知られるアセチレンの還元活性はガスクロマトグラフィによってエチレンを検出して測定した。培養株が得られた 5 株について測定を行い、いずれの株も強くはないが活性を検出することができた。
【考察】これまでに知られていなかった Bacteroidetes 門細菌のニトロゲナーゼについて、nif 遺伝子クラスターの構造とニトロゲナーゼに由来すると予想されるアセチレン還元活性を検出した。系統的には単系統性を示し、共通祖先によって取得されたことが推定された。Bacteroidetes 門には Bacteroides 属、Prevotella 属等病理学的に重要な系統群が多く記載されているが、nif 相同配列が得られた株のほとんどは動物とは異なる環境に由来するものだった。これらの結果から、Bacteroidetes 門細菌の共通祖先が取得したニトロゲナーゼ遺伝子が有機物が乏しい環境においてより多く保存されているのではないかと考えられた。

Bacteroidetes, nitrogen fixation, nif

講演番号：2B21a06
講演日時、会場：3 月 27 日 10:05～ B 校舎 21 会場

DNA 二重鎖切断領域の核膜近傍への移動における SWR1 および INO80 クロマチンリモデリング複合体の役割

The functional analyses of SWR1- and INO80 chromatin remodeling complexes in spatial relocation of DNA double-strand break in the nucleus

○尾間 由佳子[1]、折原 行希[2]、小西 辰紀[1]、堀籠 智洋[3]、Susan GASSER[3]、原田 昌彦[1]([1]東北大・院農、[2]東北大・農、[3]FMI)
○Yukako OMA[1], Yuki ORIHARA[2], Tatsunori KONISHI[1], Chihiro HORIGOME[3], Susan GASSER[3], Masahiko HARATA[1] ([1]Grad. Sch. Agri. Sci., Tohoku Univ., [2]Facul. Agri., Tohoku Univ., [3]FMI)

真核生物のゲノムDNAはヒストンなどのタンパク質と結合してクロマチンを形成し、この構造がDNA複製や修復、遺伝子発現制御などのゲノム機能を制御するエピジェネティクスの分子基盤となっている。クロマチン構造を変換する主要なマシナリーとして、SWR1 および INO80 クロマチンリモデリング複合体が存在する。SWR1 および INO80 複合体は酵母からヒトに至るまで進化的に保存されている。我々は、リモデリング複合体がクロマチン構造変換のみならず、クロマチンの核内配置にも関与する例として、出芽酵母 SWR1 複合体中の Arp6 が核膜孔複合体(NPC)を介して核膜近傍にクロマチンを繋留する機構に必要であることを報告した(1)。また、リモデリング複合体が DNA 複製に関与する最初の報告として、INO80 複合体が停止した複製フォークにリクルートされ、複製の進行再開を促進することで DNA 複製に関与することを明らかにした(2)。複製フォークの停止が長引くと、最も重篤な DNA 損傷である DNA 二重鎖切断(DSB)などのゲノム不安定化が引き起こされ、がんなどの疾病の原因となるため、損傷を適切に修復することが必要である。これまで出芽酵母において DSB 領域が核膜近傍へ移行して、NPC あるいは核膜タンパク質 Mps3 に結合することが報告されていたが、その分子機構や機能については不明であった。そこで我々は、DSB 領域に結合する SWR1 および INO80 複合体が、DSB 領域の核膜近傍への移行に関与する可能性を考え、蛍光顕微鏡解析とクロマチン免疫沈降法（ChIP 法）を用いた解析を行った。まず、ガラクトース添加により誘導的かつ継続的に DSB を起こすことのできる酵母株において SWR1 および INO80 複合体の機能を欠損させ、さらに DSB 領域を蛍光タンパク質で可視化することにより、DSB 領域の核内配置を蛍光顕微鏡により観察した。同時に、DSB 領域と NPC、あるいは Mps3 との結合を ChIP 法により解析した。その結果、DSB 領域と NPC との結合、および Mps3 との結合の両方に SWR1 複合体が必要であることが示された。一方で、INO80 複合体は DSB 領域と Mps3 との結合にのみ必要であった。さらに、NPC および Mps3 の変異株では、異常な組み換えの指標である uSCR の上昇が観察された。以上の結果から、修復の困難な DSB の正確な修復プロセス進行のために DSB 領域の核膜近傍への移行が必要であること、また DSB 領域の核膜移行には複数の経路が存在し、SWR1 および INO80 複合体がその経路選択に関与していることが明らかとなった(3)。

1, Yoshida *et al.*, *PLoS Genet.*, 6(4): e1000910 (2010)
2, Shimada *et al.*, *Curr. Biol.*, 18(8): 566-575 (2008)
3, Horigome *et al.*, *Mol. Cell*, 55(4): 626-639 (2014)

chromatin remodeling complex, DNA damage, DNA repair

講演番号：2B21a07
講演日時、会場：3 月 27 日 10:16～ B 校舎 21 会場

DNA 損傷依存的姉妹染色分体間接着への核膜タンパク質の関与
Involvement of nuclear membrane proteins in sister chromatid cohesion during repair of DNA double-strand break

○折原 行希[1]、尾間 由佳子[2]、小西 辰紀[2]、堀籠 智洋[3]、Susan GASSER[3]、原田 昌彦[2]（[1]東北大・農、[2]東北大・院農、[3]FMI）
○Yuki ORIHARA[1], Yukako OMA[2], Tatsunori KONISHI[2], Chihiro HORIGOME[3], Susan GASSER[3], Masahiko HARATA[2] ([1]Facul. Agri., Tohoku Univ., [2]Grad. Sch. Agri. Sci., Tohoku Univ., [3]FMI)

DNA は様々な要因による損傷を常に受けており、その修復が適切に行われないと遺伝情報の損失や突然変異の原因となる。特に DNA の二重鎖が共に切断された損傷である DNA 二重鎖切断（DSB）は最も重篤な DNA 損傷とされている。DSB の修復経路の一つとして相同組換え（HR）修復が存在する。HR 修復では、主に DNA 合成後の姉妹染色分体を損傷 DNA 修復の鋳型として利用することにより、修復による遺伝情報の欠失や変異のない正確な修復を行うことが可能となる。HR 修復の進行には、姉妹染色分体間の接着（コヒージョン）が重要な役割を果たしている。コヒージョンはコヒーシンと呼ばれるタンパク質複合体を介して行われる、タンパク質性の DNA 鎖間の架橋である。コヒージョンの形成は、通常 DNA 複製依存的に S 期に行われる。一方で、DNA 損傷依存的なコヒージョン形成も存在しており、姉妹染色分体間の HR 修復の効率的な進行に必要である。

我々は出芽酵母核内で修復困難な DSB が、SWR1 および INO80 クロマチンリモデリング複合体依存的に核膜近傍に移行し、核膜孔複合体（NPC）や核膜タンパク質 Mps3 に結合することを見出している（Horigome *et al.*, *Mol. Cell*, 2014）。そこで我々は、NPC や Mps3、および DSB の核内移行に関与する SWR1 および INO80 複合体が、DNA 損傷依存的なコヒージョン形成に関与する可能性を考え、その解析を行った。解析はガラクトース添加により人為的に単一の DSB が誘導できる出芽酵母株を使用した。この株は DSB 領域を GFP で可視化しているため、蛍光顕微鏡下でコヒージョンの形成を観察することが可能である。解析の結果、NPC 変異株および SWR1 変異株において、DNA 損傷依存的なコヒージョン形成の低下が観察された。一方で、INO80 複合体変異株と Mps3 変異株では、そのような変化は観察されなかった。INO80 複合体は DSB の Mps3 との結合に必要であることと合わせ、これらの結果は、核膜近傍に移行した DSB と NPC の相互作用が DNA 損傷依存的な姉妹染色分体間の接着に必要であることを示している。

chromatin, DNA repair, cohesion

講演番号：2B21a08
講演日時、会場：3 月 27 日 10:27～ B 校舎 21 会場

プラスミノーゲン活性化乳酸菌およびその不活性変異株のプラスミド解析
Plasmid analysis of plasminogen activation lactic acid bacteria and the inert mutant.
○野村 将、小林 美穂、萩 達朗、鈴木 チセ（農研機構畜草研）
○Masaru NOMURA, Miho KOBAYASHI, Tatsuro HAGI, Chise SUZUKI (NILGS)

【目的】牛乳中にはウシ由来のプラスミノーゲンが存在し、活性化因子の作用を受けてプラスミンに活性化され、乳タンパク質の分解に関与している。チーズから分離した乳酸菌 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar diacetylactis NIAI C59 株はプラスミノーゲン活性化能を示すが（1)、関与する成分についてはまだ明らかになっていない。本研究では、当該活性を示さない自然変異株を取得し、C59 株に特異的なプラスミドを解析した。
【方法】C59 株およびプラスミノーゲン活性化能を示さない派生株 C59MN 株から全プラスミドを調製し、各種制限酵素処理後、アガロース電気泳動像を比較した。C59 株に特異的なフラグメントを pBluescript に組み込んで大腸菌にクローニングし、その塩基配列を解析した。
【結果】C59 株を 0.5%グルコースを添加した M17 培地（GM17）を用いて継代培養を繰り返すことで、プラスミノーゲン活性化能が低下した培養が得られた。この培養物を GM17 寒天培地に塗布して形成させた単コロニーを分離し、プラスミノーゲン活性化能を示さない株（C59MN）を選択した。両者の全プラスミドを制限酵素で消化せずに 0.8%アガロース電気泳動したところ、プラスミドのバンドを各々識別することは出来なかった。そこで、両者を各種制限酵素で処理したところ、C59 株に特異的な PstI 断片（>10 kb）および EcoRI 断片（約 8 kb）を見出した。両断片の塩基配列を部分的に決定したところ、両断片は同一プラスミド由来であり、さらに PstI 断片は該プラスミドの全長から成ることが明らかとなった。また、この PstI 断片には *L. lactis* subsp. *lactis* IL594 由来の既知プラスミド pIL2（8,277 bp）と高い相同性を示す領域が存在していた。現在、PstI 断片の全塩基配列を解読中である。本研究は JSPS 科研費 25450414 の助成を受け実施した。

1) Nomura M, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **76**, 1459-1462 (2012).

lactic acid bacteria, plasminogen, milk

講演番号：2B21a09
講演日時、会場：3 月 27 日 10:38～ B 校舎 21 会場

新規 m5C MTase を発現する *Lactococcus* の各生育ステージにおける DNA メチル化割合の解析

Effect of Lactococcal novel m5C MTase on percentage of methylated DNA at different growth phase

○小林 美穂、萩 達朗、鈴木 チセ、木元（新良） 広実、守谷 直子、野村 将（農研機構・畜草研）
○Miho Kobayashi, Tatsuro Hagi, Chise Suzuki, Hiromi Kimoto-Nira, Naoko Moriya, Masaru Nomura (NILGS)

［背景・目的］細菌の制限・修飾系を構成する DNA メチル化酵素（MTase）は、制限酵素による分解から自己 DNA を保護するだけでなく、DNA のメチル化により、発現調節に関わる場合もある。制限酵素データベース（REBASE）には、乳酸菌 *Lactococcus lactis* 由来の多様な推定 C(5)-シトシン MTase（m5C MTase）が登録されているが、これまでのところ実際の同定報告は少ない。我々は *L. lactis* における m5C MTase の多様性と遺伝子発現調節について調べている。昨年度までに大腸菌に *L. lactis* 由来の 4 種類の推定 m5C MTase 遺伝子を導入することにより、大腸菌 DNA のメチル化割合が上昇することを確認している。本年は *L. lactis* ssp. *lactis* S1 株が生産する m5C MTase （M.LlaS1ORF1157P）を他の *L. lactis* 株に導入し、対数期初期、中期および後期における発現と DNA メチル化頻度について明らかにする。

［方法］*L. lactis* S1 株の推定 m5C MTase 遺伝子 *llaS1ORF1157MP* を *L. lactis-E. coli* シャトルベクターに組込み、組換え plasmid (pMCS1312)を作出した。*L.lactis* のプラスミドフリー株 MG1363 および IL1403 に pMCS1312 を導入し、形質転換株を作出した。S1 株および形質転換株を TYG リシス培地で培養し、OD 620 = 0.2, 0.5, 0.9 まで増殖した菌体から DNA を抽出し、各 DNA 試料について、全 DNA 当たりのメチル化 DNA の割合（重量%）を算出した。

［結果］*llaS1ORF1157MP* 導入株では、ゲノム DNA 上の一部の MspI サイトが制限分解されないことを確認した。このことは、M.LlaS1ORF1157P は S1 株だけでなく MG1363 および IL1403 株においても DNA メチル化活性を発現することを示唆する。

S1 株の DNA メチル化割合は、対数期初期に対して中期と後期には各々約 4 倍および 18 倍に上昇した。一方 MG1363 および IL1403 株由来のメチル化変異株から抽出した DNA は、OD = 0.5 における DNA メチル化割合の上昇は検出されなかった。また S1 株の結果と同様に、OD = 0.9 においてメチル化 DNA 割合は最大となるが、その値は S1 株の結果よりも有意に低かった。菌株によって異なるメチル化割合およびメチル化開始時期を決定する要因について *llaS1ORF1157MP* の発現解析結果と合わせ考察する。本研究は JSPS 科研費 24580400 の助成を受け実施した。

lactic acid bacteria, DNA methylation, bacterial growth phase

講演番号：2B21a10
講演日時、会場：3 月 27 日 10:49～ B 校舎 21 会場

酵母 *Yarrowia lipolytica* セントロメア領域への Cbf1 転写因子結合部位の同定

Identification of binding sites for transcription factor Cbf1 to centromeric region from the yeast *Yarrowia lipolytica*

○松岡 正佳、廣重 美咲、宮川 あい、藤川 義章、長濱 一弘（崇城大生物生命）
○Masayoshi MATSUOKA, Misaki HIROSHIGE, Ai MIYAGAWA, Yoshiaki FUJIKAWA, Kazuhiro NAGAHAMA (Sojo Univ., Fac. Biotech. Life Sci.)

【目的】*Yarrowia lipolytica* は単相体当たり 6 本の染色体をもつ二形性を示す出芽酵母である。*Y. lipolytica* からクローン化された自律複製配列中にはセントロメア(*CEN*)と複製起点(ori)の両方が必ず含まれていたことより、プラスミドの分配に *CEN* が必須である。第 1 、3、5 番染色体の *CEN* 配列は約 200bp に限定され､その中には出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の CBF3 複合体の結合配列(CDEIII)と似た配列が存在する。 しかし、*S. cerevisiae* の *CEN* に共通して見られる CDEI（転写因子 Cbf1 の結合部位）配列はまだ *Y. lipolytica CEN* には見つかっていないので、CDEI 様の結合部位が存在するか検証を行った。

【方法および結果】*Y .lipolytica* の Cbf1 をコードする遺伝子を PCR で増幅し、N-末端側に histag を付加した後、Arg レアコドンの修正を施して発現量の増加を図った。この histag-Cbf1(Arg) 遺伝子を低温発現ベクターpCold にクローン化し、大腸菌 BL21 を形質転換した。組換え大腸菌 BL21/pCold-histag-Cbf1(Arg)より部分精製した Cbf1 タンパク質はプロテアーゼによる分解の可能性が考えられた。そこで 1mM EDTA 存在下で粗酵素液を調製し、脱塩した後、Ni-キレートアフィニティークロマトグラフィーで Cbf1 を精製した。^{32}P−ラベルした *CEN*DNA のゲル移動度シフト分析を行った結果、9 kb の *CEN1* DNA 中の約 400bp の制限酵素断片(HpaI+AluI+HpyCH4V)がシフトした。この 400 bp 断片は BglII-HpaI 間の 409 bp(A 断片)と AluI-AluI 間の 419 bp(B 断片)の可能性が考えられたため、各 DNA 断片をゲルシフト分析した結果、A,B 両断片ともにシフトした。さらに A,B 断片を約 200 bp に 2 分割してゲルシフト分析した結果、少なくとも 4 箇所の Cbf1 結合部位があることが示された。現在、Cbf1 タンパク質と予測されるターゲット dsDNA の結合を解析中である。

centromere, transcription factor, *Yarrowia lipolytica*

講演番号：2B21a11
講演日時、会場：3 月 27 日 11:10～ B 校舎 21 会場

テロメアでの組換中間体の蓄積がスピンドルチェックポイントを活性化する機構
The mechanism of the spindle assembly checkpoint activation caused by the accumulation of recombination intermediates at telomeres
○横尾 悠希、中野 明美、上野 勝 (広島大学)
○Yuki Yokoo, Akemi Nakano, Masaru Ueno (Hiroshima Univ.)

テロメアとは真核生物の線状染色体の末端に存在する繰り返し配列で、多様な因子と相互作用することにより染色体末端を保護する特別な機能を持つ。当研究室では、テロメアの 3’突出に結合し、DNA 分解酵素からテロメアを保護する Pot1 および DNA 組換を抑制し、組換中間体を解消する Rqh1 のヘリカーゼ活性を欠損した *pot1Δ rqh1-hd* 二重変異株ではテロメアでの組換中間体が蓄積しやすいことを発見している(1)。さらに、テロメアでの組換中間体の蓄積がキネトコアトとスピンドルの相互作用を監視するスピンドルチェックポイント(the spindle assembly checkpoint, SAC)の活性化および微小管阻害剤チアベンダゾール(TBZ)への感受性を引き起こすことや SAC 活性化と TBZ 感受性の連係が示唆されることも発見している(1,2)。しかし、これらの機構は未だ分かっていない。そこで、テロメアでの組換中間体蓄積による SAC 活性化の機構を解明するため以下の実験を行った。

テロメアでの組換中間体による SAC 活性化因子を見つけるため「SAC 活性化が抑圧したサプレッサーミュータントの探索」を行った。目的となるミュータントはテロメアでの組換中間体は蓄積しているが SAC 活性化が抑圧されたものである。そこで、*pot1Δ rqh1-hd* 二重変異株に突然変異処理を行い、組換中間体は蓄積しているが SAC 活性化が抑圧された変異株を取得する。さらに、そのような変異株での変異箇所を同定することによりこの株の SAC 活性化に関係する因子を見つける。目的の変異株をスクリーニングする方法として、テロメアでの組換中間体による SAC 活性化と TBZ 感受性の増大に強い相関があることから、突然変異によって TBZ 感受性が抑圧された株を SAC 活性化抑圧の候補株として取得する。現段階で、突然変異処理を行ったものを約 1200 株取得し、そのうち TBZ 感受性が抑圧された候補株を複数株取得した。

今後は、TBZ 感受性が抑圧された株の変異箇所同定のため、候補株と *pot1Δ rqh1-hd* 二重変異株をバッククロスさせ、得られた胞子由来の株の塩基配列についてシークエンス解析を行うことで、原因遺伝子の同定を行う予定である。

参考文献
1. K. Takahashi, et al. Mol. Cell. Biol. 31, 495-506. (2011).
2. A. Nakano, et al. Mol. Cell. Biol. 34, 1389-1397(2014)

fission yeast, telomere, spindle assembly checkpoint

講演番号：2B21a12
講演日時、会場：3 月 27 日 11:21～ B 校舎 21 会場

rDNA での複製中間体の蓄積が SAC を活性化する機構の解明

Investigation of mechanism which activates SAC caused by accumulation of replication intermediates at rDNA

○ン ワイイー、中野 明美、上野 勝（広島大学）
○WAI YEE NG, Akemi Nakano, Masaru Ueno (Hiroshima Univ.)

テロメアとは染色体末端を保護する繰り返し遺伝子配列である。細胞分裂につれてテロメアの長さは短くなり、一定の長さになると DNA ダメージとして認識されて、細胞老化あるいは細胞死が起こる。テロメアでの組み換え中間体は何らかの機構で微小管がキネトコアへの結合を抑制することで Spindle Assembly Check Point(SAC)が活性化される(1, 2) 。Rqh1 は RecQ ヘリケースファミリーに属するタンパク質で、*rqh1-hd* 株はヘリケース活性を持っていない変異株である。我々は Hydroxyurea(HU) アレストからのリリースで *rqh1-hd* 株の SAC が活性化されることを発見している(2)。リボソーム DNA(rDNA)で複製フォークの片方を停止させる Reb1 を破壊した *rqh1-hd reb1Δ* 株では SAC が活性化されなくなるので、この SAC の活性化は rDNA での複製フォーク停止に依存していると考えられる(2)。したがって *rqh1-hd* 株を HU アレストからリリースすると rDNA にできる複製中間体が SAC を活性化していると考えられる。HU アレストからのリリースで rDNA で蓄積している複製中間体はどのように SAC を活性化しているのかまだ分かっていないため、その機構を調べることにした。そのために HU アレストからのリリースで rDNA で複製中間体を持っているが、SAC が活性化されない *rqh1-hd* 株の変異株を見つけることにした。

本研究では、*rqh1-hd* 変異株は HU の存在下で Thiabendazole(TBZ)のような微小管阻害剤に感受性を示し、*rqh1-hd reb1Δ* 株は同じ条件下で微小管感受性がやわらぐことを発見した。このことは、SAC の活性化と TBZ 感受性の増大が関係していること示唆する。そこで、rDNA で複製中間体を持つが、SAC が活性化されない変異株候補として、HU 存在下で TBZ 感受性がやわらぐ変異株を取得することを試みた。*rqh1-hd* 株を 2% W/V Ethyl Methyl Sulfonate (EMS) 処理して、ランダムに点突然変異させた。生えてきたコロニーを 3mM HU + 15μg/ml TBZ の条件でスクリーニングして候補株の数を減らした。得られた候補株の微小管感受性の正確さを確認するためにスポットアッセイした。720 株をスクリーニングし、スポットアッセイをした後、目的の候補株が２つ得られた。

現在は得られた２つの候補株は rDNA で複製中間体を持っているかどうかを確認している。また、候補株の変異箇所を同定するために親株と backcross して、次世代シークエンシングを行っている。

参考文献

1. K.Takahashi, *et al*. ***Mol. Cell. Biol.*** 31, 495-506. (2011).
2. A.Nakano, *et al.* ***Mol. Cell. Biol.*** 34, 1389-1397. (2014).

ribosome DNA, Spindle Assembly Checkpoint, fission yeast

講演番号：2B21a13
講演日時、会場：3 月 27 日 11:32～ B 校舎 21 会場

環状染色体の形成および維持に必要な遺伝子

Genes required for the formation or maintenance of circular chromosome

○上野 勝、田中 大樹、杉原 あさみ (広島大院)
○Masaru UENO, Daiki Takana, Asami Sugihara (Hiroshima Univ.)

分裂酵母のテロメア結合蛋白質 Pot1 は、テロメラーゼのリクルートとテロメアの保護の両方に必要である。*pot1* を破壊するとテロメラーゼによるテロメア伸長ができなくなると同時にテロメアの 5’末端が分解される(1)。その後染色体内で末端融合が起こった環状染色体を持った株が生き残る(2)。しかしこの過程にどのような因子が関係するのかは、十分には解明されていない。環状染色体の形成および維持に必要な遺伝子は、*pot1* と合成致死になることが予想される。これまでに当研究室では、pot1 と RecQ ヘリケース rqh1 との二重破壊株が合成致死になる原因を解析した結果、Rqh1 が環状染色体の維持に必要であることを発見している (3)。

今回は、DNA ダメージチェックポイントの活性化に必要な 9-1-1 複合体の一つである *rad9* が *pot1* と合成致死になることを発見した。一方、DNA ダメージチェックポイントの上流で機能する *rad3* は *pot1* と合成致死にならないことから (2)、*rad9 pot1* 二重破壊株が合成致死になる原因は、DNA ダメージチェックポイント機能の欠損によるものではなく、Rad9 の DNA ダメージチェックポイント以外の機能の欠損によることが予想される。*rad9 pot1* 二重破壊株の合成致死の機構を解明するために、致死を抑圧する変異株の探索を行った結果、致死を抑圧する変異株を二種類取得した。現在はこれらの変異株の変異箇所の同定を行っており、本発表ではこれらの結果について紹介したい。

さらに我々は、*pot1* と合成致死になる新規遺伝子を発見するために、ランダムミュータジェネシスによる変異株ライブラリーのスクリーニングを行った結果、1-ホスファチジルイノシトール-4-キナーゼ酵素をコードした *pik1* の変異株が pot1 と合成致死になることを発見した。現在この原因についても解析中で、この解析結果についても紹介したい。

参考文献

(1) Baumann P, Cech TR. Science. 2001.
(2) Wang X, Baumann P. Mol Cell. 2008.
(3) Nanbu T, et al. Mol Cell Biol. 2013.

fission yeast, telomere, circular chromosome

講演番号：2B21a14
講演日時、会場：3 月 27 日 11:43～ B 校舎 21 会場

Aspergillus nidulans におけるガラクトフラノース転移酵素の機能解析
Functional analysis of galactofuranose transferase in *Aspergillus nidulans*

○片渕 由佳子[1]、篠塚 早紀[2]、泉 実[2]、浴野 圭輔[1]、竹川 薫[3]、後藤 正利[3]、野村 善幸[1]、岡 拓二[1] ([1]崇城大・生物生命、[2]岡山大院・環境生命、[3]九大院・農)
○ Yukako KATAFUCHI[1], Saki SHINOZUKA[2], Minoru IZUMI[2], Keisuke EKINO[1], Kaoru TAKEGAWA[3], Masatoshi GOTO[3], Yoshiyuki NOMURA[1], Takuji OKA[1] ([1]Sojo Univ., [2]Okayama Univ., [3]Kyushu Univ.)

糸状菌 *Aspergillus nidulans* におけるガラクトフラノース（Gal$_f$）転移酵素 GfsA は、本研究室により同定された。これまでに GfsA は、ゴルジ体に局在する糖転移酵素で、UDP-Gal$_f$を糖供与体として *O*-グリカン修飾タンパク質に Gal$_f$ を転移する活性を有することが明らかとなっている。しかしながら GfsA の正確な受容基質や、合成される Gal$_f$糖鎖の結合部位および結合様式は明らかとなっていない。そこで、本研究では化学構造の明確な受容基質として *p*NP-β-Gal$_f$を用いた GfsA 活性測定系の開発を試みた。

糖供与体として UDP-Gal$_f$を用い、精製した GfsA と 37℃で 24 時間反応させ、反応産物を HPLC に供与したところ、受容基質とは異なる新規なピークが 2 つ認められた。そこで得られた各ピークを分取し LC-MS および LC-MS/MS による質量分析を行った。その結果、2 つのピークはそれぞれ *p*NP-β-Gal$_f$-Gal$_f$、*p*NP-β-Gal$_f$-Gal$_f$-Gal$_f$の分子量と一致した。また、*p*NP-β-Gal$_p$ 及び *p*NP-α-マンノースを受容基質として反応を行ったところ、酵素産物は認められなかった。以上のことより GfsA は *p*NP-β-Gal$_f$ を受容基質として認識し、Gal$_f$残基に Gal$_f$残基を少なくとも 2 つまで転移する活性を有することが明らかとなった。

一方、GfsA にはアミノ酸レベルでそれぞれ 27.5%と 26.0%の相同性を有する GfsB と GfsC が存在しているが、酵素機能は不明である。そこで、*gfsB* および *gfsC* の C 末端側に 3xFLAG-6xHIS タグを挿入した株、GfsB-3xFLAG 株および GfsC-3xFLAG 株を構築した。抗-FLAG 抗体を用いてウェスタンブロットを行ったところ、GfsB および GfsC の発現量は GfsA の発現量と比較して非常に低いことが明らかになった。そこで、プロモーターを構成的発現プロモーターである GAP プロモーターに置き換えた株、GAP-GfsB-3xFLAG 株および GAP-GfsC-3xFLAG 株を構築した。その結果、抗-FLAG 抗体を用いたウェスタンブロットにより GfsB の高発現を確認することができた。そこで GAP-GfsB-3xFLAG 株より FLAG アガロースを用いて GfsB を精製し、*p*NP-β-Gal$_f$を受容基質に反応させた。しかしながら、酵素反応産物を確認することはできなかった。この反応系において GfsB の活性が見られなかった結果は、*gfsB* 遺伝子破壊株のコロニー表現型に顕著な異常が認められないことと一致しており、GfsB の酵素活性が失われていることが強く示唆された。また、GfsB が GfsA とは異なる酵素活性を持つ可能性も推定された。

galactofuranose, sugar chain, cell wall

講演番号：2B21p01
講演日時、会場：3 月 27 日 14:00～ B 校舎 21 会場

麹菌 *Aspergillus oryzae* の持つ 2 つの分泌型ホスホリパーゼ A_2 オルソログの酵素学的性質
Enzymatic properties of two secretory phospholipase A_2 orthologs in *Aspergillus oryzae*

○高柳 亜由美[1]、宮川 拓也[2]、大塚 淳[2]、田之倉 優[2]、北本 勝ひこ[1]、有岡 学[1]（[1]東大院・農生科・応生工、[2]東大院・農生科・応生化）
○ Ayumi TAKAYANAGI[1], Takuya MIYAKAWA[2], Jun OHTSUKA[2], Masaru TANOKURA[2], Katsuhiko KITAMOTO[1], Manabu ARIOKA[1] ([1]Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo, [2]Dept. of Appl. Biol. Chem., The Univ. of Tokyo)

【背景】ホスホリパーゼ A_2 (PLA_2) はグリセロリン脂質の *sn*-2 位のエステル結合を加水分解する酵素であり、その局在やカルシウム依存性などから分泌型 (secretory PLA_2; $sPLA_2$)、細胞質型、カルシウム非依存型などに大別される。PLA_2 の研究は動物においては盛んに行われているが、微生物においては酵母が PLA_2 遺伝子を持たないため知見が乏しく、その酵素学的性質や生理機能はほとんどわかっていない。我々は以前麹菌 *Aspergillus oryzae* のゲノム中に 2 つの $sPLA_2$ オルソログ sPlaA と sPlaB を見出し、それぞれの異なる局在性や発現条件などを明らかにしている。本発表では、sPlaA と sPlaB の酵素学的性質の解析を行い、sPlaB が予想外にも PLA_1 活性を持つことを明らかにした。
【結果と考察】大腸菌で生産した組換え sPlaA および sPlaB について、Triton X-100 ミセル中に可溶化した 1-パルミトイル-2-[^{14}C]オレオイル-ホスファチジルコリン ([^{14}C]POPC) を基質として用いたアッセイを行った。その結果、sPlaA については PLA_2 活性に由来する[^{14}C]オレイン酸の生成が認められたが、sPlaB では予想外にも PLA_1 活性に由来する 2-[^{14}C]オレオイルリゾ PC と考えられるスポットが検出された。この点を確認するため、POPC および 1-パルミトイル-2-オレオイル-ホスファチジルエタノールアミン (POPE) を基質として用いたマススペクトロメトリー (MS) による測定を行った。その結果、上述の結果と一致したピークが検出された。これらの結果から、sPlaA は配列から予測された通り PLA_2 活性を持つのに対し、sPlaB は PLA_2 のオルソログであるにも関わらず PLA_1 活性を示すことがわかった。また、$sPLA_2$ において保存された活性中心残基であるヒスチジンをアラニンに置換した変異 sPlaB タンパク質を作製し、[^{3}H]オレイン酸標識した大腸菌膜画分を基質としたアッセイを行ったところ、活性が見られなくなった。このことから、sPlaB が他の $sPLA_2$ と同様にヒスチジンを活性中心残基としてもつことが示唆された。
続いて、より生体膜の状態に近いリポソームを基質に用いて MS による測定を行った。その結果、sPlaA では POPC のみ、および POPC:POPE=1:1, 2:1 のリポソームにおいて POPC および POPE に対する活性が確認された。一方、sPlaB については、いずれの組成のリポソームにおいても POPC および POPE に対する活性は確認されなかった。sPlaB については、今後酵素濃度などの条件を変化させ、リポソームでの POPC および POPE に対する活性の有無をさらに確認すると共に、ホスファチジルセリンやホスファチジルグリセロールなどのリポソームも用いて、基質特異性およびアシル鎖特異性を確認する予定である。

phospholipid, filamentous fungi, mass spectrometry

講演番号：2B21p02
講演日時、会場：3 月 27 日 14:11～ B 校舎 21 会場

麹菌 *Aspergillus oryzae* の持つ細胞質型ホスホリパーゼ A_2 様タンパク質 AoPlaA の機能解析

Functional analysis of cytosolic phospholipase A_2-like protein AoPlaA in *Aspergillus oryzae*

○伊澤 翔、高柳 亜由美、駒井 紀之、小谷 昌平、北本 勝ひこ、有岡 学（東大院・農生科・応生工）
○Sho IZAWA, Ayumi TAKAYANAGI, Noriyuki KOMAI, Shohei KOTANI, Katsuhiko KITAMOTO, Manabu ARIOKA (Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo)

【背景と目的】グリセロリン脂質の *sn*-2 位のエステル結合を加水分解し、脂肪酸と 1-アシルリゾリン脂質を生成する酵素はホスホリパーゼ A_2 (PLA_2) と総称される。PLA_2 のうち細胞質型 PLA_2 ($cPLA_2$) と呼ばれる一群の酵素は、哺乳類においてはアラキドン酸を膜リン脂質から遊離することで脂質メディエーターであるエイコサノイド類の生成を誘起し免疫応答に関わることが知られており、活発に研究が行われている。一方、我々は以前、麹菌 *Aspergillus oryzae* のゲノム配列中に $cPLA_2$ と約 40%のアミノ酸配列上の相同性を有する唯一の $cPLA_2$ 様タンパク質をコードする遺伝子 *AoplaA* を見出し、その生理機能の解明を目指した研究を行ってきた。AoPlaA タンパク質は、予想活性中心残基等は $cPLA_2$ と類似しているが、哺乳類 $cPLA_2$ が持つ、Ca^{2+}依存的にリン脂質に結合する C2 ドメインは持たない。他方、AoPlaA は N 末端にミトコンドリア局在シグナルを有し、詳細な局在解析の結果、ミトコンドリア内膜と外膜の間の膜間スペースに局在することが示唆されている。哺乳類 $cPLA_2$ は細胞内 Ca^{2+}の上昇に伴って細胞質からゴルジ体膜などのオルガネラ膜に移行することから、AoPlaA は哺乳類 $cPLA_2$ とは異なる働きをするものと考えられる。本研究では、AoPlaA の機能に関してより詳細な検討を行った。

【方法と結果】麹菌 *AoplaA* 高発現株を作製して生育を観察したところ、15°C での培養でその生育がコントロール株に比べて遅延することを見出した。予想活性中心残基であるセリンをアラニンに置換した S266A 変異体を高発現する株ではこのような生育遅延が見られないことから、AoPlaA 活性が過剰に働くことで生育が阻害されるものと考えられた。大腸菌で組換え生産した AoPlaA の各種リン脂質に対する分解活性を調べたところ、ホスファチジルエタノールアミン (PE) に対する活性は認められたが、ホスファチジルコリンやホスファチジルイノシトールといったリン脂質に対しては作用しないことがわかった。また、高発現株において観察された結果と一致して、S266A 変異体は PE 分解活性を失っていた。続いて麹菌コントロール株および *AoplaA* 高発現株から粗ミトコンドリア画分を調製し、そのリン脂質組成をマススペクトロメトリーにより調べた。その結果、高発現株において PE が特異的に減少し、特に長鎖脂肪酸からなる PE がより大きく減少していることが明らかとなった。以上の結果から、AoPlaA はミトコンドリア膜間スペースに局在し、PE を特異的に分解するユニークな酵素であることが示唆された。

mitochondria, calcium, phosphatidylethanolamine

講演番号：2B21p03
講演日時、会場：3 月 27 日 14:22～ B 校舎 21 会場

分裂酵母 *S. pombe* の発芽に関わる遺伝子の取得と解析

Isolation and analysis of fission yeast *S. pombe* genes involved in germination.

○松崎 彩子、東谷 未来、中村 太郎（大阪市大院理）
○Ayako MATSUZAKI, Miku HIGASHITANI, Taro NAKAMURA (Osaka City Univ.)

目的

分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* の胞子は、様々な環境ストレスに対して耐性を持つ休眠細胞である。胞子は栄養源が豊富になると発芽し、栄養増殖のサイクルへと移行する。発芽は、休眠細胞である胞子が栄養細胞の状態へと変化する、細胞周期におけるきわめて重要なイベントである。発芽は暗色化、膨潤（拡大成長）、発芽管の伸張、隔壁形成という主として４つのステップで進行することが明らかになっているが、この過程にどのような遺伝子がはたらいているのかはほとんどわかっていない。本研究は、この胞子発芽の分子メカニズムを明らかにすることを目的とする。

方法および結果

我々は、胞子の発芽に必要な因子は胞子形成時に発現が上昇し、胞子に蓄積されていると考え、*mug* 遺伝子に注目した。*mug* 遺伝子は減数分裂時にその発現が上昇する遺伝子である。192 の *mug* 遺伝子変異株を胞子形成させ、マイクロマニピュレーターを用いて胞子を単離した。その結果、*mug60*$^{+}$, *mug111*$^{+}$, *mug138*$^{+}$, *mug184*$^{+}$の４つを候補遺伝子として取得した。これらの遺伝子の予想タンパク質は、それぞれ RNA 結合タンパク質、膜タンパク質、インスリナーゼ、Hsp70 タンパク質であった。これらの遺伝子破壊株では、胞子の発芽率は野生型株とほとんど変わらなかったが、発芽に遅れが生じていた。

取得した遺伝子のうち、*mug60*$^{+}$についてさらなる解析を行った。ウエスタンブロットによりタンパク質の発現の様子を調べた結果、Mug60 は胞子形成中にタンパク質量が上昇し、胞子の発芽後すぐ減少した。また、Mug60—GFP は胞子形成時に、細胞質にドット状に局在し、胞子が完成した後もこの局在が観察された。*mug60Δ* の胞子の発芽を顕微鏡下で観察したところ、発芽の過程のうち拡大成長のステップに大きな遅れを生じていた。これらの結果から、Mug60 は、拡大成長に関わる遺伝子の mRNA に結合して発芽を制御する可能性が考えられた。現在、残りの遺伝子ついて、より詳細な解析を行っている。

fission yeast, germination, spore

講演番号：2B21p04
講演日時、会場：3 月 27 日 14:33～ B 校舎 21 会場

分裂酵母 MCM 結合タンパク質 Mcb1 の機能解析

Functional analysis of fission yeast MCM-BP, Mcb1

○刈谷 真子[1]、SANTOSA Venny[1]、鐘巻 将人[2]、田中 克典[1] ([1]関西学院大・理工・生命、[2]国立遺伝研)
○Mako KARIYA[1], Venny SANTOSA[1], Masato KANEMAKI[2], Katsunori TANAKA[1] ([1]Kwansei Univ., [2]National Institute of Genetics)

【目的】

MCM(Mini-chromosome maintenance)複合体は Mcm2-7 からなる 6 量体タンパク質複合体であり、真核生物の DNA 複製機構において複製ヘリカーゼとして機能する。MCM 複合体に結合するタンパク質としてヒト細胞で hMCM-BP (Human MCM-binding protein) が同定され、分裂酵母(*S. pombe*)でもそのオルソログとして Mcb1(MCM binding protein 1)が同定された。分裂酵母では、Mcb1 の過剰発現により Mcm2 と他の MCM タンパク質間の結合が阻害され、DNA 複製の抑制や細胞周期の停止が引き起こされる。よって、Mcb1 は DNA 複製開始制御に重要な役割を果たすことが示唆された。しかし、その明確な機能はまだ明らかになっていない。興味深いことに、出芽酵母(*S. cerevisiae*)には MCM-BP は存在しないとされている。本研究では、出芽酵母と分裂酵母における MCM-BP の必要性の相違から、MCM-BP の機能の本質に迫ることを目的とする。そのために、分裂酵母 Mcb1 を出芽酵母で発現させ、DNA 複製を初めとする細胞周期の進行に与える影響を解析した。

【方法】

分裂酵母 Mcb1 タンパク質の発現が出芽酵母の DNA 複製を初めとする細胞周期の進行に及ぼす影響を解析するために、*GAL10* プロモーターの下流に *mcb1* 遺伝子を導入し、出芽酵母内で Mcb1 を発現制御可能とする株を作製した。非同調細胞、α-factor 処理により G1 期に同調した細胞、及びノコダゾール処理により M 期に同調した細胞を用い、ガラクトース誘導による Mcb1 の発現が DNA 複製を初めとする細胞周期進行に与える影響をフローサイトメーター(FACS)により解析した。

【結果】

最初に、非同調細胞を用いて Mcb1 の発現誘導を行ったところ、細胞周期の S 期の遅延が見られた。そこで、α-factor で G1 期に同調し Mcb1 の発現誘導を行った。その結果、G1 期からのリリース後約 3 時間で S 期の遅延が見られた。出芽酵母の世代時間は約 2 時間であることから、Mcb1 の発現による S 期への影響は細胞周期 2 周目に出ていることが分かった。次に、ノコダゾール処理により M 期に同調し Mcb1 の発現誘導を行ったところ、M 期からのリリース後最初の DNA 複製開始が阻害されていることが分かった。我々のこれまでの研究成果によって、分裂酵母において Mcb1 は複製前複合体である pre-RC 形成に関与することが明らかなっているが、今回の結果から分裂酵母 Mcb1 が出芽酵母の DNA 複製開始にも影響を与えうることが明らかとなった。

DNA replication, MCM, fission yeast

講演番号：2B21p05
講演日時、会場：3 月 27 日 14:44～ B 校舎 21 会場

冬虫夏草（*Cordyceps militaris* ）由来レクチンとその結合物質

A lectin from the fungus *Cordyceps militaris* and its binding molecules

○竹島 愛乃[1]、鈴木 智大[2]、崔 宰熏[1]、道羅 英夫[2]、加藤 竜也[1,2]、朴 龍洙[1,2,3]、阿部 伸一[4]、佐伯 潤[4]、小林 夕香[5]、平井 浩文[1,2]、河岸 洋和[1,2,3]（[1]静大院農・応生化、[2]静大・グリーン研、[3]静大院・創造、[4]にちはら総合研究所、[5]J-オイルミルズ）

○Yoshino Takeshima[1], Tomohiro Suzuki[2], Jae-Hoon Choi[1], Hideo Dohra[2], Tatsuya Kato[1,2], Enoch Y. Park[1,2,3], Shinichi Abe[4], Jun-David Saeki[4], Yuka Kobayashi[5], Hirofumi Hirai[1,2], Hirokazu Kawagishi[1,2,3] ([1]Grad. Sch. of Agric., Shizuoka Univ., [2]RIGST, Shizuoka Univ., [3]Grad. Sch. of Sci. and Tech., Shizuoka Univ., [4]Nichihara R&D Lab Inc., [5]J-Oil mills Inc.)

【目的】

冬虫夏草は昆虫などから生じるキノコの総称であり、世界的に約400種が確認されている。その１種*Cordyceps militaris*はサナギタケと呼ばれ、栄養補助食品や漢方として広く利用されており、東アジアにおいては、中国医学で癌患者の治療薬として古くから用いられてきた。また、サナギタケが含有する化合物としてはcordycepinや多糖類などが報告されている[1, 2]。しかし、この菌の感染から寄生そして子実体形成における詳細なメカニズムは未だ不明である。また、レクチンは糖結合能を有し、細胞間の相互作用など様々な働きを担っている。そこで本研究ではサナギタケ由来レクチンが、感染・寄生・子実体形成における菌と昆虫との相互作用に関与していると考え、(1)サナギタケ由来レクチン(CML)の精製および諸性質の決定、(2)カイコ中のCMLに結合する物質の探索を行い、サナギタケ形成メカニズムを明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】

(1)サナギタケ子実体を10 mM リン酸緩衝生理食塩水(pH7.4)で4℃、2時間抽出し粗抽出液を得た。得られた粗抽出液を各種クロマトグラフィーに供し、サナギタケレクチン(Cordyceps militaris lectin、CML)を得た。CMLのpH安定性及び温度安定性を試験した結果、CMLのレクチン活性は、pH 2.0-10.0、50℃以下で安定であった。またCMLの糖認識特異性を赤血球凝集反応阻害試験において調べた結果、単糖・オリゴ糖には結合しなかったが、糖タンパク質ではasialo-BSMに最も強い結合特異性を示し、次いでasialo-fetuinに特異性を示した。

(2)カイコの蛹をリン酸緩衝生理食塩水(pH7.4)で4℃、2時間抽出し粗抽出液を得た。得られた粗抽出液を透析により内液と外液に分け、サナギタケ粗抽出液に対する赤血球凝集試験に供したところ、内液に阻害が見られ、CMLに結合する物質は高分子であることが示唆された。更に内液を各種クロマトグラフィーに供した結果、単一のバンドを得ることができた。得られたバンドをゲルから切り出しトリプシン消化後、LC-MS/MS解析に供した結果、Sex-specific storage-protein 2である可能性が示唆された。現在、その結合能の再現性の確認と詳細な糖鎖構造解析を行っている。

1) Cunningham, KG., et al., Nature, 166, 949 (1950).
2) Yu, R., et al., Fitoterapia, 75, 465 (2004).

Cordyceps militaris, lectin, fungus

講演番号：2B21p06
講演日時、会場：3 月 27 日 15:05～ B 校舎 21 会場

Sphingobium sp. SYK-6 株のフェニルクマラン型リグニン二量体化合物代謝系遺伝子の単離と解析（第 3 報）

Characterization of the Dehydrodiconiferyl Alcohol Catabolic Genes in *Sphingobium* sp. Strain SYK-6 (part III)

○高橋 健司[1]、上村 直史[1]、菱山 正二郎[2]、原 啓文[3]、笠井 大輔[1]、片山 義博[4]、福田 雅夫[1]、梶田 真也[5]、政井 英司[1] ([1]長岡技科大・生物、[2]森林総研、[3]MJIIT, Univ. Tech., Malaysia、[4]日大・生資科、[5]東農工大院・BASE)

○Kenji TAKAHASHI[1], Naofumi KAMIMURA[1], Shojiro HISHIYAMA[2], Hirofumi HARA[3], Daisuke KASAI[1], Yoshihiro KATAYAMA[4], Masao FUKUDA[1], Shinya KAJITA[5], Eiji MASAI[1] ([1]Nagaoka Univ. Tech., [2]FFPRI, [3]MJIIT, Univ. Tech., Malaysia, [4]Nihon Univ., [5]Tokyo Univ. Agric. Tech.)

【緒言】*Sphingobium* sp. SYK-6 株は、さまざまなリグニン由来の二量体化合物を唯一の炭素源・エネルギー源として生育できる (Masai et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2007)。SYK-6 株のリグニン由来化合物代謝に関わる酵素遺伝子はリグニンからの有用物質生産や、脱リグニンが容易な植物を作出することを目的としたリグニン構造の改変に有用であると期待される。本研究では、リグニン生合成の初期に主要な二量体の一つとして生成し、高分子リグニン中で約 3-10%を占めるフェニルクマランの代謝系遺伝子に着目した。SYK-6 株においてフェニルクマラン型化合物の dehydrodiconiferyl alcohol (DCA) は、初めに B 環側鎖γ位がカルボン酸に酸化された DCA-C に変換される。次に A 環側鎖γ位が酸化し脱離した後、α-β開裂を受けて代謝される。これまでに DCA から DCA-C への変換に複数のアルコール及びアルデヒドデヒドデヒドロゲナーゼ遺伝子が関与することを明らかにしてきた (Takahashi et al., Biodegradation, 2014)。また、2013 年度の本大会において、DCA-C の変換能を宿主に与える 2 つの酵素遺伝子 *phcC* と *phcD* を単離したことを報告した。本研究では、GMC oxidoreductase family に属する *phcC* と *phcD* の機能を明らかにすることを目的とした。

【方法】*phcC*、*phcD* 及び両遺伝子を相同組換えによって破壊し、各破壊株の休止細胞を用いて DCA-C 変換活性を調べた。DCA-C 変換活性及び変換産物の同定は ODS 又はキラルカラムを用いた HPLC 分析と LC-MS 分析によって調べた。*phcC* と *phcD* をそれぞれ *E. coli* と SYK-6 株を宿主に用いて発現させ、得られた細胞抽出液を超遠心によって細胞質画分と膜画分に分画し、各画分の DCA-C 変換活性を調べた。

【結果】*phcC* 及び *phcD* 破壊株の DCA-C 変換活性は SYK-6 株と比較して顕著に低下し、二重破壊株では活性が消失していた。以上の結果から、SYK-6 株において両遺伝子が DCA-C の変換を担うことが明らかとなった。また、*phcC* 及び *phcD* 遺伝子産物のそれぞれが DCA-C の異なる光学異性体を特異的に認識することが示された。*phcC* と *phcD* を高発現させた組換え体の細胞抽出液から膜画分と細胞質画分を調製し、DCA-C 変換活性を調べた結果、両遺伝子産物とも細胞膜に局在することが示された。酵素精製を行ったところ活性が消失したため、現在、*phcC* と *phcD* を高発現させた組換え体の膜画分を用いて各酵素の至適温度、至適 pH、基質特異性などの酵素学的諸性質を調べている。

本研究は JST-ALCA（先端的低炭素化技術開発)及び NEDO バイオマスエネルギー等高効率転換技術開発（先導技術開発）の助成を受けて行われたものである。

lignin, phenylcoumaran, *Sphingobium*

講演番号：2B21p07
講演日時、会場：3 月 27 日 15:16～ B 校舎 21 会場

リグニン生合成中間体に作用する新規芳香環開裂酵素遺伝子の探索

Genome Mining for the Discovery of Ring-Cleavage Dioxygenases Acting on Intermediates of the Lignin Biosynthetic Pathway

○小林 巽[1]、上村 直史[1]、菱山 正二郎[2]、笠井 大輔[1]、福田 雅夫[1]、菊地 淳[3]、梶田 真也[4]、政井 英司[1]([1]長岡技科大・生物、[2]森林総研、[3]理研 PSC、[4]東農工大院・BASE)
○Yuzuru KOBAYASHI[1], Naofumi KAMIMURA[1], Shojiro HISHIYAMA[2], Daisuke KASAI[1], Masao FUKUDA[1], Jun KIKUCHI[3], Shinya KAJITA[4], Eiji MASAI[1] ([1]Nagaoka Univ. Tech., [2]FFPRI, [3]RIKEN PSC, [4]Tokyo Univ. Agric. Tech.)

【目的】木質バイオマスからバイオ燃料や化学工業原料を生産する際に、リグニンを除去するために酸やアルカリ、亜臨界水処理等が行われる。これらの前処理工程に要するエネルギーはバイオ燃料生産の大きな部分を占めることから、分解性が向上したリグニンを有する植物を開発することが期待されている。当研究グループは、環境試料やゲノムデータベースから有用なモノリグノール変換酵素遺伝子の探索・解析・改良を行い、それらを植物に導入することでリグニン生合成を調節して易分解性リグニンを創出することを目的としている。最近、*Arabidopsis thaliana* の AtLigB 遺伝子産物が caffeoyl aldehyde の芳香環を 4,5-位間で開裂する芳香環開裂酵素であることが報告された (Weng et al., 2012)。本研究では、リグニンの生合成中間体の芳香環開裂に作用する酵素がリグニンの構造改変に有用と考え、AtLigB と相同性を示す遺伝子を微生物ゲノムデータベースから探索した。
【方法】NCBI ゲノムデータベースから BLAST プログラムにより AtLigB に相同性を示すバクテリア由来の遺伝子を探索・選定した。大腸菌での発現にコドンを最適化した遺伝子を合成し pET-21a(+)に導入した。His-tag 融合型及び野生型の各遺伝子を *E. coli* BL21 (DE3)株で発現させ、SDS-PAGE により遺伝子の発現を確認した。得られた各粗酵素 (500 μg/ml)を 100 μM の Fe^{2+}存在下において 500 μM caffeic acid と pH 7.5 及び 30°C の条件で 60 分間反応させた後、HPLC 分析により caffeic acid の減少量を調べた。
【結果】バクテリアゲノムデータベースから AtLigB と 42～49%の相同性を示す *Bradyrhizobium* 属細菌の BRADO (accession no., YP_001207492)、*Geobacter sulfurreducens* の KN400 (YP_006891596)、*Synechococcus* 属細菌の Syn7502 (YP_007105369)を選定した。これらの推定芳香環開裂酵素遺伝子を大腸菌で発現させ、得られた粗酵素を用いて caffeic acid 変換実験を行った。その結果、AtLigB と BRADO 遺伝子産物においてのみ caffeic acid 変換活性が見られ、BRADO が AtLigB よりも約 5 倍高い活性を示した (BRADO, 43 mU/mg)。現在、酵素学的諸性質及び caffeic acid の変換産物の同定を行うために、酵素精製について検討を行っている。

【謝辞】本研究は JST-ALCA (先端的低炭素化技術開発)の助成を受けて行われたものである。
【引用文献】Weng J. K. et al., (2012) *Science* 337:960-964

lignin, caffeic acid, dioxygenase

講演番号：2B21p08
講演日時、会場：3 月 27 日 15:27～ B 校舎 21 会場

コニフェリルアルデヒド二重結合還元酵素の部位特異的変異導入による改良

Engineering of Catalytic Functions of Coniferyl Aldehyde Double Bond Reductase by Site-Directed Mutagenesis

○上村 直史[1]、渡辺 眞悟[1]、荒木 拓馬[1]、菱山 正二郎[2]、笠井 大輔[1]、福田 雅夫[1]、菊地 淳[3]、梶田 真也[4]、政井 英司[1] ([1]長岡技科大・生物、[2]森林総研、[3]理研 PSC、[4]東農工大院・BASE)
○ Naofumi KAMIMURA[1], Shingo WATANABE[1], Takuma ARAKI[1], Shojiro HISHIYAMA[2], Daisuke KASAI[1], Masao FUKUDA[1], Jun KIKUCHI[3], Shinya KAJITA[4], Eiji MASAI[1] ([1]Nagaoka Univ. Tech., [2]FFPRI, [3]RIKEN PSC, [4]Tokyo Univ. Agric. Tech.)

【目的】木質バイオマスからバイオ燃料や化学工業原料を生産する際に、リグニンを除去するために酸やアルカリ、亜臨界水処理等が行われる。これらの前処理工程に要するエネルギーはバイオ燃料生産の大きな部分を占めることから、分解性が向上したリグニンを有する植物を開発することが期待されている。当研究グループは、環境試料やゲノムデータベースから有用なモノリグノール変換酵素遺伝子の探索・解析・改良を行い、それらを植物に導入することでリグニン生合成を調節して易分解性リグニンを創出することを目的としている。現在までに微生物ゲノムデータベースから *Arabidopsis thaliana* の alkenal double bond reductase (AtDBR, Youn et al., 2006)よりもコニフェリルアルデヒド(CALD)変換における V_{max} が高い *Parvibaculum lavamentivorans* 由来の DBR (PlDBR)を見出した。しかし、低基質濃度では AtDBR の方が PlDBR よりも活性が高く、基質親和性が優れていることが示唆された。本研究では AtDBR の立体構造情報を基に PlDBR のアミノ酸残基に部位特異的変異を導入し、変異酵素の CALD 変換能を評価した。
【方法】PlDBR 遺伝子発現プラスミドを鋳型に用い、site-directed mutagenesis により基質ポケット形成に関わると推定されたアミノ酸残基を AtDBR 型に置換した変異遺伝子を作製した。His-tag 融合型の変異酵素を *E. coli* BL21(DE3)株で生産させ、アフィニティークロマトグラフィーにより精製した。CALD 変換実験は、精製酵素 (100 μg/ml 又は 25 μg/ml)と CALD (10, 20, 50, 80, 100, 200, 500, 1,000 μM)を 500 μM NADPH 存在下で混合し、pH 7.0 および 30°C で 3 分間反応を行い、HPLC 分析により CALD の減少量を調べた。
【結果】PlDBR と AtDBR のアミノ酸配列アライメントから、AtDBR の基質ポケットを構成することが示唆されているアミノ酸残基の内、Y81、I275、Y276、Y290 の 4 つの残基が PlDBR では G75、V268、G269、M283 であり異なることが示された。これら 4 つの残基が PlDBR の CALD 変換能に与える影響を調べるために、各残基を AtDBR 型に置換した変異遺伝子を作製した。変異型 PlDBR を大腸菌で生産させ、CALD に対する動力学的性質を調べた。その結果、V268I-G269Y 変異酵素の V_{max} と K_m はそれぞれ 0.67 ± 0.04 U/mg 及び 170 ± 13 μM であることが示され、野生型 PlDBR に対して V_{max} は 0.6 倍であったが、K_m は 3.5 倍低下し、基質との親和性に向上が見られた。また、V268I-G269Y 変異酵素の低基質濃度(< 100 μM)における CALD 変換活性は AtDBR よりも高い値を示した。
【謝辞】本研究は JST-ALCA (先端的低炭素化技術開発)の助成を受けて行われたものである。

alkenal double bond reductase, coniferyl aldehyde, site-directed mutagenesis

講演番号：2B21p09
講演日時、会場：3 月 27 日 15:38～ B 校舎 21 会場

Microbacterium sp.におけるヒドラジド代謝遺伝子の解析
Analysis of hydrazide metabolism genes in *Microbacterium* sp.
○秋山 友了[1]、多久和 篤史[2]、石毛 太一郎[3]、佐々木 康幸[1]、伊藤 晋作[1]、老沼 研一[2]、高谷 直樹[2]、矢嶋 俊介[1] ([1]東農大応生科・バイオ、[2]筑波大・生命環境、[3]東農大・ゲノムセ)
○Tomonori Akiyama[1], Atsushi Takuwa[2], Taichiro Ishige[3], Yasuyuki Sasaki[1], Shinsaku Ito[1], kenichi Oinuma[2], Naoki Takaya[2], Shunsuke Yajima[1] ([1]Dept. of Biosci., Tokyo Univ. of Agric., [2]Fac. of Life and Env. Sci., Univ. of Tsukuba, [3]NODAI Genome Center, Tokyo Univ. of Agric.)

《背景》

ヒドラジドは一般式 $R^1C(=O)NR^2NR^3R^4$ で表される化合物である。原料のヒドラジンやカルボン酸は安価で入手が簡単であり、合成も容易であるため、医薬品、農薬、染料、塗料など工業的に広く用いられている。しかし、天然にはわずかにしか知られておらず、その代謝メカニズムについて詳細は不明である。通常、生物はヒドラジドを代謝する機構を持っていないと考えられ、分解されなかったヒドラジド化合物が生体内に蓄積する事が危惧される。また、一部のヒドラジドは発がん性などが心配されている一方で、土壌中ではマレイン酸ヒドラジドが生分解されるという報告も見られる。

我々の研究グループでは、ヒドラジドを代謝可能な微生物の探索とヒドラジド代謝機構解明を目的に研究を行い、*Microbacterium* sp.を土壌から単離した。さらに、本菌から同定されたヒドラジド分解酵素(hydrazidase)の機能解析を行ってきている。そこでさらなる代謝機構の解明を目指し、*Microbacterium* sp.のゲノム解読と、それに伴い見いだした遺伝子の発現解析を行った。

《方法・結果》

Microbacterium sp.のヒドラジド代謝関連遺伝子推定のため、本菌のゲノム配列解析をショートリード型のシーケンサーにより試みた。その結果 *Microbacterium* sp.のゲノムには、少なくとも 3565 の遺伝子コード領域、3 個所の rRNA コード領域、45 個所の tRNA コード領域が含まれると推定され、その中に hydrazidase 遺伝子も含まれていた。また、その前後には転写調節因子遺伝子とトランスポーターを構成するサブユニット遺伝子群が位置していた。加えて、RT-PCR によりこれらの遺伝子はオペロンとして転写されていることが明らかとなった。このことから、これらの遺伝子が協調して働くことで、ヒドラジドを代謝していると考えられたた。そこで、ヒドラジドを添加、非添加の培地で *Microbacterium* sp.を培養、RNA を抽出し、RT-qPCR にてこれらの遺伝子の転写活性を測定した。その結果、ヒドラジドを添加した培地でのみこれらの遺伝子は発現が誘導された。よって、このオペロンの遺伝子がヒドラジドの代謝に関わっていることが示唆された。

hydrazide, metabolism, *Microbacterium* sp.

講演番号：2B21p10
講演日時、会場：3 月 27 日 15:49～ B 校舎 21 会場

Pseudomonas stutzeri KF716 のビフェニル・サリチル酸分解系をコードする可動性遺伝因子の解析
Analysis of the mobile genetic element coding for biphenyl/salicylate catabolic system of *Pseudomonas stutzeri* KF716

○廣瀬 遵[1]、平井 晋哉[1]、横井 春比古[1]、木村 信忠[2]、末永 光[2]、渡邊 崇人[3]、山副 敦司[4]、藤原 秀彦[5]、古川 謙介[5]([1]宮崎大工・環境応用化、[2]産総研・生物プロセス、[3]京大・生存研、[4]NITE・バイオ、[5]別府大・食物栄養)
○Jun HIROSE[1], Shinya HIRAI[1], Haruhiko YOKOI[1], Nobutada KIMURA[2], Hikaru SUENAGA[2], Takahito WATANABE[3], Atsushi YAMAZOE[4], Hidehiko FUJIHARA[5], Kensuke FURUKAWA[5] ([1]Miyazaki Univ., [2]AIST, [3]Kyoto Univ., [4]NITE, [5]Beppu Univ.)

【目的】種々の *Pseudomonas* 属細菌のゲノムから高度に保存されたビフェニルおよびサリチル酸分解系をコードする *bph-sal* エレメントが検出されている。*bph-sal* エレメントは接合伝達により土壌中の細菌間で水平伝播していると考えられているが、それ自体の転移、欠失等の詳細については未解明である。本講演では次世代シーケンサーによる解析で得られたビフェニル資化性菌 *Pseudomonas stutzeri* KF716 のドラフトゲノム配列に基づいて *bph-sal* エレメントの全領域の解析を行った。
【方法および結果】*P. stutzeri* KF716 のゲノムシーケンス解析により、*bph-sal* エレメントをコードする 405867 bp の contig を取得した。ビフェニルをメタ開裂により安息香酸およびアセチル CoA に酸化分解する代謝酵素群をコードする *bph* オペロン(全長 10.6 kb、図中(b))の下流にサリチル酸をメタ開裂によりアセチル CoA およびアセトアルデヒドに酸化分解する代謝酵素群をコードする *sal* オペロン(11.5 kb、(c))が存在した。*bph-sal* エレメントの染色体への組み込みに関与するインテグラーゼ(*int*)をコードする領域（a）は *bph* オペロンのすぐ上流に、*parA*、*parB* をコードする領域（d)は、*sal* オペロンの 66 kb 下流に見いだされた。さらに *parA*、*parB* 領域の下流に多剤排出ポンプ(e)をコードする 4 kb の領域が存在した。KF716 株のゲノムより、染色体から切り出されて閉環した環状 *bph-sal* エレメントの連結部位と推定される 0.6 kb の DNA 断片を PCR で増幅し、シーケンス解析を行った。以上の結果から、KF716 株のビフェニル・サリチル酸分解系をコードする 117 kb の *bph-sal* エレメントの全体像を明らかにした。

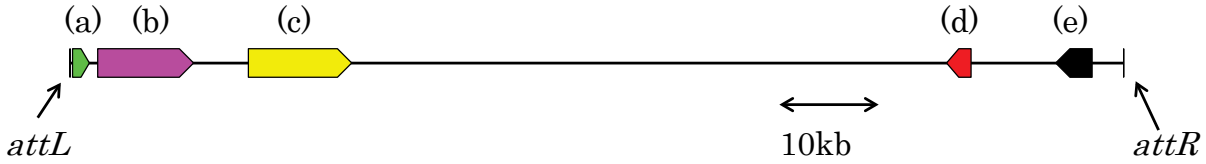


Fig. *bph-sal* element of *Pseudomonas stutzeri* KF716
(a) *int*, (b) *bph* operon, (c) *sal* operon, (d) *parA-parB*, (e) multidrug efflux pump

biphenyl, salicylate, *Pseudomonas*

講演番号：2B21p11
講演日時、会場：3 月 27 日 16:10～ B 校舎 21 会場

Halomonas sp. O-1 の phasin タンパク質遺伝子 *phaP* の機能解析
characterization of *phaP* genes encoding phasin proteins from *Halomonas* sp. O-1
○木原 崇博[1]、柘植 丈治[2]、水野 康平[1] ([1]北九州高専、[2]東工大)
○Takahiro KIHARA[1], Takeharu TSUGE[2], kouhei MIZUNO[1] ([1]KCT, [2]Tokyo Tech)

【緒　言】 近年、石油資源の枯渇、化学合成プラスチックの環境問題から環境にやさしい資源の利用が重要である。生分解性プラスチックは再生可能な資源から合成され、使用後は水と二酸化炭素まで分解される環境にやさしいプラスチックとして知られている。当研究室では多種多様な微生物がエネルギー貯蔵物質として菌体内に蓄積している生分解性プラスチックの一種 Polyhydroxyalkanoate(PHA)の研究を行っており、現在、海水中から分離した中度好塩性細菌 *Halomonas* sp. O-1 の PHA 合成酵素について研究を行っている[1)]。今回、phasin タンパク質として細胞内 PHA 顆粒形成に寄与する分子として知られている PhaP に着目し、本菌の PHA 合成酵素遺伝子 *phaC* の上流に位置する遺伝子 *phaP1* および *phaP2* の機能解析を大腸菌組み換え体にて行った。
【方 法】 モノマー供給に必要な遺伝子 *phbA*、*phbB* を含むプラスミド pGEM"ABex に *Halomonas* sp. O-1 の PHA 合成酵素遺伝子オペロン全長 *phaP1P2C* または *phaC* を導入し、*Escherichia coli* JM109 に形質転換を行った[2)]。作製した *phaC* 単独組み換え体、*phaP1P2C* 組み換え体の PHA 合成能を比較することで大腸菌体内の PhaP の機能を解析した。培養方法としてフラスコ培養により 37 ℃、120 rpm にて振盪培養を行い、2～8 時間おきに培養液 2 ml 中の濁度および PHA 蓄積量を測定した。また、同様の培養条件により 24 時間毎の乾燥菌体量あたりの PHA 蓄積量も測定した。PHA 蓄積量では熱濃硫酸処理により菌体内の PHA をクロトン酸に変換して HPLC により測定し、同様に(3HB)の標品を処理して測定した結果を基準として PHA 蓄積量を算出した。
【結 果】 菌体増殖には、*phaC* 単独組み換え体と *phaP1P2C* 組み換え体に有意な差はなかった。しかし、*phaC* 組み換え体は 14 時間を境に PHA 蓄積量が変化しなくなったが、*phaP1P2C* 組み換え体はその後も増加し続け、最大で 1.6 倍の差を生じた。また、24 時間培養後の乾燥菌体量当たり *phaC* 組み換え体は 40.6 wt%、*phaP1P2C* 組み換え体は 62.1 wt%の PHA を蓄積していた。*phaC* 組み換え体では 24 時間以降 PHA 蓄積量は変化しなかったが、*phaP1P2C* 組み換え体は 48 時間で最大 83.4 wt%の PHA を菌体内に蓄積した。これらの結果から *E. coli* 組み換え体において、*Halomonas* sp. O-1 の *phaP1*、*phaP2* は PHA の蓄積量を増大させる機能をもつことが示唆された。
【参考文献】
1) Ilham M, Nakanomori S, Kihara T, Hokamura A, Matsusaki H, Tsuge T, Mizuno K. *Polym. Degrad. Stabil.* 109:416– 423 (2014).
2) Takase K, Taguchi S, Doi Y. *J Biochem* 133(1):139–45 (2003).

Halomonas, PHA synthase, *phaP*

講演番号：2B21p12
講演日時、会場：3 月 27 日 16:21～ B 校舎 21 会場

好塩性アーキア *Haloferax volcanii* の脱窒関連遺伝子 *mcoA* および *pqqE2* の機能解析
Functional analysis of denitrification-related genes, *mcoA* and *pqqE2*, from haloarchaeon *Haloferax volcanii*

○荒木 琢磨[1]、藤田 純平[2]、吉松 勝彦[2]、鮫島 玲子[3]、藤原 健智[1,2] ([1]静岡大大学院、[2]静岡大理、[3]静岡大農)
○ Takuma ARAKI[1], Junpei FUJITA[2], Katsuhiko YOSHIMATSU[2], Reiko SAMESHIMA[3], Taketomo FUJIWARA[1,2] ([1]Graduate school of shizuoka Univ, [2]Shizuoka Univ Faculty of Science, [3]Shizuoka Univ Faculty of Agriculture)

【目的】　高度好塩性のアーキアである *Haloferax volcanii* は通性嫌気性であり，好気的な環境では酸素呼吸を行うが，嫌気条件の下では脱窒や DMSO 還元によって増殖することが可能である。*H. volcanii* の脱窒遺伝子のうち，亜硝酸塩還元酵素 NirK（HVO_2141），一酸化窒素還元酵素 NorB（HVO_2147）はゲノム上に近接して存在する。またその周囲には，電子伝達や酸化還元反応への関与が予想される酵素タンパク質や転写因子等の遺伝子が集まっている。これらの遺伝子のプロモーター中には，転写因子の認識部位と考えられる同一の回文配列が共通して見出される。このことから，少なくとも 24 個の ORF から構成されるこの遺伝子クラスターは，おそらく同一の転写制御系の支配下にあり，脱窒反応においてそれぞれ何らかの役割を担っているものと予想される。このクラスター中にコードされている機能未知のマルチ銅オキシダーゼ McoA の機能を明らかにすることを目的として，*mcoA* 遺伝子（HVO_2153）の破壊と表現型の解析を行った。さらに，クラスター中の *pqqE2* 遺伝子（HVO_2144）についても遺伝子破壊実験を行ったので併せて報告する。

【結果と考察】　ウラシル合成酵素遺伝子を利用した pop-in/pop-out 法によって、*H. volcanii* ゲノム中の *mcoA* 遺伝子の破壊を行った。*pqqE2* 遺伝子についても，同様の手法により遺伝子破壊株を作成した。*mcoA* 遺伝子破壊株（Δ*mcoA* 株）は，野生株（H26 株）と脱窒条件下で同等の増殖能を示した。脱窒培養後，気相を TCD-GC で分析したところ，H26 株、Δ*mcoA* 株ともに N_2O のみが検出された。*H. volcanii* には亜酸化窒素還元酵素 NosZ の遺伝子は存在しないことから、本菌が不完全脱窒を行うことが明らかとなった。一方、両者とも培養液中にアンモニウム塩が蓄積したが、その量が Δ*mcoA* 株において H26 株より有意に高かった。この結果から、McoA の機能として、脱窒とリンクした経路、おそらくアンモニウム塩の亜硝酸塩への変換に関与している可能性を考えている。

一方，Δ*pqqE2* 株は，好気的に，あるいは嫌気的に DMSO を呼吸基質として増殖したが，脱窒条件下では増殖しなかった。*pqqE2* 遺伝子産物は，ラジカル SAM スーパーファミリーに属するタンパク質である。このようなラジカル SAM 酵素は様々な補酵素や補欠分子族の生合成に関わることが知られている。この実験結果は，この *pqqE2* 遺伝子が，*H. volcanii* の脱窒反応に必須の生体分子の生合成に関係していることを示唆している。

denitrification, multicopper oxidase, pyrroloquinoline quinone

講演番号：2B21p13
講演日時、会場：3 月 27 日 16:32～ B 校舎 21 会場

Pseudomonas putida の *cbpA* および *dnaJ* の機能解析
Functional analysis of *cbpA* and *dnaJ* in *Pseudomonas putida*
○伊藤 史浩[1]、足立 佑貴[2]、福森 文康[3] ([1]東洋大院・生命、[2]東洋大・生命、[3]東洋大・食環)
○Fumihiro Ito[1], Yuki Adachi[2], Fumiyasu Fukumori[3] ([1]Graduate School of Life Sciences, Toyo Univ., [2]Faculty of Life Sciences, Toyo Univ., [3]Faculty of Food and Life Sciences, Toyo Univ.)

【目的】主要な分子シャペロンの一つである Hsp70 ファミリーに属する細菌の DnaK は、ATP の加水分解エネルギーを利用して、基質ポリペプチドの折りたたみを補助する。DnaK は、ATP の加水分解を促進させる DnaJ と、ヌクレオチドの交換を補助する GrpE とともに、シャペロンチームを構成して機能する。大腸菌 DnaJ には、アナログとされる CbpA が存在する。CbpA は Curved-DNA に結合するタンパク質として見出され、DnaJ に類似する J-ドメイン領域を有しており、DnaJ と一部共通の機能をもつと考えられている。一方、*Pseudomonas putida* における、CbpA を含めた J-ドメインタンパク質の機能は、これまでほとんど解析されていない。本研究では、*P. putida* の J-ドメインタンパク質である、CbpA および DnaJ の機能解析について報告する。
【実験結果・考察】大腸菌の CbpA は、定常期やリン酸が欠乏した際に誘導されるタンパク質であり、*cbpA* の発現は定常期特異的σ因子であるσ^{38} により制御されていることが知られている。一方 *P. putida* では、ゲノム配列から *cbpA* のプロモーター配列と考えられる領域に、熱ショックσ因子であるσ^{32} が認識すると考えられる配列が存在していた。*P. putida* において、*cbpA* mRNA 量の熱誘導の有無をリアルタイム PCR により観測したところ、42℃、10 分間の処理により、*cbpA* mRNA 量が 200 倍以上増加した。さらに、*P. putida* CbpA の抗体を作成し、ウエスタンブロッティング法により CbpA の検出を行ったところ、野生株では、CbpA は DnaJ と同様に熱ストレスにより誘導され、熱処理前と比較してシグナルが 5 倍ほどに増加することが分かった。また、σ^{38} をコードする *rpoS* 欠損株においても、同様に CbpA の熱誘導が見られた。以上のことから、*P. putida* の CbpA は熱ショックタンパク質であることが確認され、大腸菌の CbpA とは異なる調節を受けていることが明らかになった。大腸菌の *dnaJ* 欠損株と同様に、*P. putida* の *dnaJ* 欠損株は温度感受性が高く、35℃以上の温度ではコロニー形成能が顕著に低下する。この欠損株に、プラスミドを用いて *dnaJ* もしくは *cbpA* を導入し、それぞれによる相補性を検討した。*dnaJ* の導入により、欠損株は 37℃まで野生株と同等に生育した。一方、*cbpA* で相補した場合は、35℃では生育速度は遅いもののコロニー形成率は完全に回復したが、37℃では生育の回復は見られなかった。これまで得られた結果と合わせて、*P. putida* の CbpA は、熱ショックタンパク質であり、凝集タンパク質の再生や、比較的低い温度での生育においては DnaJ の機能を一部相補するが、より高い温度での生育における DnaJ の機能は相補できないことが明らかとなった。

Pseudomonas putida, molecular chaperone, *cbpA*

講演番号：2B21p14
講演日時、会場：3 月 27 日 16:43～ B 校舎 21 会場

Methylobacterium 属細菌における KaiC タンパク質リン酸化の機能解析
Functional analysis KaiC phosphorylation in *Methylobacterium* species
○藤澤 健斗[1]、井口 博之[1]、由里本 博也[1]、小山 時隆[2]、阪井 康能[1,3]（[1]京大院農・応用生命、[2]京大院理・植物、[3]JST・ALCA）
○Kento FUJISAWA[1], Hiroyuki IGUCHI[1], Hiroya YURIMOTO[1], Tokitaka OYAMA[2], Yasuyoshi SAKAI[1,3] ([1]Kyoto Univ. Agric., [2]Kyoto Univ. Sci., [3]JST ALCA)

【背景】*Methylobacterium* 属細菌は植物から放出されるメタノールを利用して植物葉上で優占的に生息しており、植物の生長を促進する作用も知られている。植物葉上に生息する微生物は温度変化や酸化ストレスなど外界や植物由来の多くのストレスにさらされており、*Methylobacterium* 属細菌はこれらのストレスに対する適応能力を持っていると考えられる。我々はこのような厳しい環境への適応能力について研究を行っており、2014 年本大会では *Methylobacterium extorquens* の *kaiC* 遺伝子がストレス耐性および植物への定着に関与していることを報告した。シアノバクテリアにおいては、KaiC のリン酸化リズムが昼夜に応じた遺伝子発現を制御していることが知られている。*M. extortuens* の KaiC でもリン酸化部位が保存されていたことから、*M. extorquens* の KaiC のリン酸化が果たす役割について調べた。
【結果】*M. extorquens* で KaiC と FLAG タグの融合タンパク質発現株を作製し、その細胞抽出液から調製したサンプルについて Phos-tag を用いたウエスタンブロッティングを行った。その結果、リン酸化バンドと推定されるバンドが見られ、フォスファターゼ処理によりそれらのバンドが消失したことから、KaiC がリン酸化されていることが確かめられた。次に *kaiC* 破壊株に野生型 *kaiC*、およびリン酸化部位をアラニンに置換した変異型 *kaiC* をそれぞれ相補した株を作製し、これらの株を用いてストレス耐性や植物への定着能を調べた。その結果、野生型 *kaiC* を相補した場合には表現型は回復したが、変異型 *kaiC* を相補した場合には表現型は回復しなかった。これらの結果から本菌においても KaiC の機能発現にリン酸化が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

circadian clock gene, methylotroph, plant

講演番号：2B21p15
講演日時、会場：3 月 27 日 16:54～ B 校舎 21 会場

Bacillus thuringiensis TK-E6 が産生する非 3-ドメイン型 Cry タンパク質の殺ボウフラ活性
Mosquitocidal activity of non-3-domain Cry protein from *Bacillus thuringiensis* TK-E6

○根来 綾子[1]、江草 佳務[1]、上林 智仁[1]、早崎 君江[2]、岡本 成平[2]、東 慶直[1,2]、早川 徹[3]、武部 聡[1,2] ([1]近畿大・生物理工、[2]近畿大・院・生物理工、[3]岡大・院・自然科学)
○Ayako NEGORO[1], Kamu EGUSA[1], Tomohito KANBAYASHI[1], Kimie HAYASAKI[2], Naruhei OKAMOTO[2], Yoshinao AZUMA[1,2], Tohru HAYAKAWA[3], So TAKEBE[1,2] ([1]BOST, Kinki Univ., [2]Grad. Sch. BOST, Kinki Univ., [3]Grad. Sch. Natl. Sci. Tech., Okayama Univ.)

【目的】*Bacillus thuringiensis*（Bt）が胞子形成期に菌体内につくる結晶性タンパク質顆粒（Crystal）には昆虫目特異的な殺虫活性をもつものがあり、他の昆虫目や農作物、家畜には害を示さないため BT 剤として生物農薬への利用が進められている。Bt. TK-E6 は本研究室で分離した新規 Bt で、産生する Crystal は双翅目昆虫幼生に対して強い殺虫活性を示す。Crystal には数種類の Cry タンパク質が含まれるので、それらタンパク質の遺伝子を単離し、単独発現させた Cry タンパク質の殺ボウフラ活性を検討した。
【方法および結果】Bt. TK-E6 のゲノムが持つ *cry* 遺伝子の探索をおこなったところ、12 個検出された。そこで、それらすべてを単離して構造解析をおこなった。塩基配列から推測されるアミノ酸配列の解析により、これらの遺伝子がコードするタンパク質のうち 11 個は Cry32 グループに属し、殺ボウフラ活性がある Cry4 などと同様に 3 ドメイン型の立体構造をとると予測された。一方、残りの一つは Bt 毒素命名委員会から Cry46Ab と名付けられた。このタンパク質は分子量が 33 kDa で、他の 3 ドメイン型 Cry の半分以下しかなく、予想される立体構造は Lysenin や Aerolysin などが属する、標的細胞の細胞膜に小孔を形成する pore-forming toxin のグループと似ていた。
　生物検定をおこなうため、単離した 12 個の *cry* 遺伝子を、それぞれ *Bt* 用発現ベクターにクローン化し、Crystal 非生産株である *Bt. kurustaki* CRY(-)B に導入した。胞子形成培地で 30℃、24 時間振盪培養した後、菌体を超音波破砕して不溶画分から胞子とともに Cry タンパク質を調製した。これを標品としてアカイエカとネッタイシマカの幼生に対する殺虫活性を調べたところ、Cry32 グループのタンパク質はほとんど活性を示さなかったのに対し、Cry46Ab は高い殺ボウフラ活性を示した。Cry46Ab は 3 ドメイン構造を取る Cry とのアミノ酸配列相同性がほとんど無いことから、殺虫機構も異なると予想される。BT 剤の使用は Cry タンパク質に対する耐性虫の出現などが問題となってきているが、3 ドメイン構造をとらない Cry46Ab の殺虫機構の解明は、問題解決の糸口になると期待できる。

Bacillus thuringiensis, insecticidal protein, pore-forming

講演番号：2B21p16
講演日時、会場：3 月 27 日 17:15～ B 校舎 21 会場

生物に必須の tRNA-t^{6}A 修飾は *Thermus thermophilus* では必須ではない

The Universally Conserved Essential tRNA Modification t^{6}A is not Essential in *Thermus thermophilus*

○川端 祐佳[1]、澤田 泰平[1]、北原 一正[1]、小野瀬 晃由[1]、星野 貴之[2]、中村 顕[2]（[1]筑波大生命環境科学研究科、[2]筑波大生命環境系）

○Yuka KAWABATA[1], Taihei SAWADA[1], Kazumasa KITAHARA[1], Akiyoshi ONOSE[1], Takayuki HOSHINO[2], Akira NAKAMURA[2] ([1]Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. of Tsukuba, [2]Fac. Life Environ. Sci., Univ. of Tsukuba)

生物には共通する必須遺伝子が存在し、それらの必須遺伝子は生命活動の根本をなすプロセスに関与すると考えられている。そのような必須遺伝子の中で、*ygjD/kae1/qri7* family と *yrdC/sua5* family は普遍的に保存されているにもかかわらず、その機能が未知であったために、機能解析が進められていた。近年の研究で、これらの遺伝子は大腸菌・枯草菌・酵母といったモデル微生物で生育に必須であり、tRNA^{ANN} 中の必須修飾ヌクレオチドである N^6-threonylcarbamoyl adenosine（t^{6}A）修飾の生合成に関わることが示された。t^{6}A 修飾は ANN コドンに対する tRNA の 37 位（アンチコドンの 3’側に隣接）で見つかった普遍的な修飾であり、全ての生物で保存されている。この修飾が欠損すると、開始コドン選択のミスや該当コドンでの frameshift 頻度の上昇などが引き起こされるため、ANN コドンの正確な翻訳に必須であり、そのためにこの修飾が生命に必須であると考えられている。また、*yeaZ* と *yjeE* は *Bacteria* で保存されている必須遺伝子であり、YgjD と相互作用し、t^{6}A 修飾の生合成に関わることが明らかとなった。本研究は、t^{6}A 修飾およびその生合成遺伝子に関する知見を得ることを目的とする。

我々は高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB27 株を用いて、上述の 4 つの t^{6}A 修飾生合成に関わる遺伝子破壊株の作製に成功し、これらの遺伝子が *T. thermophilus* では必須ではないことを明らかにした。なお、現在までに *T. thermophilus*、*Deinococcus radiodurans*、*Synechocystis sp.* PCC6803 でのみ t^{6}A 修飾生合成に関わる遺伝子破壊株の作製が報告されている。UV 耐性の極限環境微生物として知られる *Deinococcus radiodurans* では、*ygjD* および *yeaZ* 破壊株が UV 感受性を示すこと、また *Synechocystis sp.* PCC6803 では *ygjD* 破壊株が高塩ストレスに感受性を示すなどといったような野生株と異なる多様な表現型を示す報告がある。さらに大腸菌など、いくつかのモデル微生物で t^{6}A 修飾生合成遺伝子の欠損によっても、野生型と異なる多様な表現型を示す報告があるため、得られた遺伝子破壊株を用いて、各種ストレスに対する感受性を比較した。すると各遺伝子破壊株は高塩ストレス、浸透圧ストレス、酸化ストレスおよび高温ストレスに感受性を示した。なお、マイトマイシン C 曝露に対しては抵抗性を示した。続いて、各株の total RNA 画分を用いて、LC/MS 解析により t^{6}A 修飾の有無を検討したところ、これらの遺伝子破壊株ではいずれも t^{6}A 修飾を失っていることを明らかにした。以上より、これら 4 つの遺伝子がコードするタンパク質は *T. thermophilus* でも t^{6}A 修飾生合成に関わること、そして *T. thermophilus* では t^{6}A 修飾は必須ではないことが明らかとなった。

Thermus thermophilus, tRNA modification, LC/MS

講演番号：2B21p17
講演日時、会場：3 月 27 日 17:26～ B 校舎 21 会場

トランスポゾンを用いた *Lactobacillus casei* IGM393 株における免疫応答に関わる分子の検討
Investigation of a factor activating immune response in *Lactobacillus casei* IGM393 by using the transposon

桝田 和彌[1]、○石浜 峻[2]、金子 真理恵[2]、冨田 理[3]、加藤 光徳[2]、朝川 陽介[2]、梶川 揚申[2]、岡田 早苗[2]、朝倉 宏[1]、五十君 靜信[1]([1]国立医薬品食品衛生研究所、[2]東農大応生科・化学、[3]農研機構食品総合研究所)
kazuya masuda[1], ○takashi ishihama[2], marie kaneko[2], satoru tomita[3], mitunori kato[2], yousuke asakawa[2], akinobu kajikawa[2], sanae okada[2], hiroshi asakura[1], shizunobu igimi[1] ([1]National Institute of Health Sciences, [2]Tokyo University of Agriculture, [3]National Agriculture and Food Research Organization)

【目的】*Lactobacillus casei* IGM393 株は免疫賦活作用を有するが、その免疫誘導に関わる因子はまだ十分に解明されていない。本研究では、トランスポゾンを用いた *L. casei* IGM393 の変異株作成および、その免疫応答に影響する因子を探索する事を目的とした。【方法、結果】*L. crispatus* CHCC 3692 由来トランスポゾン Tn3692 を用いて、1396 株の変異株が得られた。変異株は RAW264.7 細胞と共培養し、TNF-α を指標として免疫誘導を評価した。その結果、野生株と比較して誘導能が大幅に減少した株が得られた。これらの株のトランスポゾン挿入部位の解析を試みたところ、ゲノム上への挿入は確認されたが、遺伝子のコーティング領域への挿入は認められなかった。そこで挿入されていた遺伝子の周辺配列の遺伝子発現量の比較を行った。しかし、挿入部位周辺の遺伝子発現量に、明確な変化は見られなかった。一方、既知の免疫応答に関与する LTA や細胞壁の脆弱化についても評価したが、それらの関与は確認されなかった。また現在、細胞側の TLR を始めとしたシグナル伝達経路への影響を調べている。

Lactobacillus casei, trasposon, immunoresponse

講演番号：2B21p18
講演日時、会場：3 月 27 日 17:37～ B 校舎 21 会場

高温適応によって獲得した大腸菌耐熱化変異株の解析

Analysis of an Escherichia coli thermotolerant mutant acquired by high-temperature adaptation

○加藤 薫平[1]、石井 あやな[1]、村田 正之[1]、高坂 智之[2]、山田 守[1]([1]山口大学大学院 医学系研究科、[2]山口大学 農学部)
○Kunpei KATO[1], Ayana ISII[1], Masayuki MURATA[1], Tomoyuki KOSAKA[2], Mamoru YAMADA[1]
([1]Yamaguchi Univ. Graduate School of Medicine, [2]Yamaguchi Univ. Faculty of Agriculture)

[目的]

熱ストレスなどの環境ストレスは生物の生存率に大きな影響を与えるため、生物はこれらのストレスに対する防御機構を備えていると考えられる。ストレスに適応するなかで獲得した変異は、ストレス応答や代謝経路などを変化させている可能性がある。高温適応の研究はいくつか実施されており、その中の 1 つの高温適応させた株は、DNA のミスマッチ修復に関与する *mutH* や DNA polymerase Ⅲ α subunit をコードする *dnaE* の変異によってより多くの変異が蓄積し、高温に適応することができたと推測されている(1)。しかし、高温適応に直接関与する遺伝子群は明確となっていない。本研究では、高温側の生育限界温度での生存機構を理解するために、生育限界温度での適応育種により耐熱化した変異株の遺伝的変異を解析し、耐熱化に必要な分子機構を推測した。なお耐熱化変異株の分離や表現型などは昨年の本大会で報告した。

[方法、結果]

耐熱化変異株は、親株と比べてコロニーのサイズが小さく、菌体の長さも短く、さらに 37°C では生育が遅い。このように親株と異なる表現型を示したことから、次世代シーケンサーによる解析を行ったところ緊縮応答に関連した遺伝子などに変異が見られた。そこで、これらの変異箇所を、サンガー法シーケンサーにより確認した。加えて、どの遺伝子の変異が耐熱化の獲得に関与しているか調べるために耐熱化変異株の 1 遺伝子の変異だけを親株に戻した株を作製し、生育限界温度付近での培養を行った。その結果、*rpoB* 変異を導入した株は耐熱性の向上がみられなかったが、*rpoC* 変異を導入した株は耐熱性の向上が確認された。*rpoC* も緊縮応答に関連していることから、緊縮応答の耐熱化への関与が推測される。

(1) Kishimoto *et al*., *PLoS Genetics*, 6(10): e1001164 (2011)

thermotolerant mutant, stringent response

講演番号：2B21p19
講演日時、会場：3 月 27 日 17:48～ B 校舎 21 会場

Corynebacterium glutamicum NCgl1221 メカノセンシティブチャネルの細胞内局在
Intracellular localization of *Corynebacterium glutamicum* NCgl1221 mechanosensitive channel
○小槌 龍介、井上 雄介、岩井 伯隆、和地 正明（東工大院・生命理工）
○Ryosuke KOZUCHI, Yusuke INOUE, Noritaka IWAI, Masaaki WACHI (Dept. Bioeng., Tokyo Tech)

【背景と目的】コリネ型細菌 *Corynebacterium glutamicum* は 1956 年にグルタミン酸生産菌として分離され、現在ではグルタミン酸をはじめとした様々なアミノ酸の工業的発酵生産に用いられている。*C. glutamicum* は、普通に増殖しているときはまったくグルタミン酸を生産しないが、ビオチン欠乏や脂肪酸エステル系界面活性剤やペニシリンの添加といった処理をすると、細胞増殖が抑制されグルタミン酸の生産が誘導される。我々は、誘導処理なしでもグルタミン酸を生産する変異株の解析から、大腸菌のメカノセンシティブチャンネル（MscS）のホモログである NCgl1221 がグルタミン酸排出に必須の因子であることを明らかにした。その後のパッチクランプ法による解析により、NCgl1221 は確かにメカノセンシティブチャネルとして機能していることが示された。しかしながら、NCgl1221 を欠損しても浸透圧ショックに感受性にならないことから、浸透圧ショックの防御機構としての役割でなく、別の機能を持っていることが示唆された。*C. glutamicum* における NCgl1221 の生理的な機能を解明するために、本研究では NCgl1221 の細胞内局在性を調べた。
【方法】全長 533 アミノ酸残基の NCgl1221 に関して、様々な部位の C 末端側に GFP 遺伝子を融合させた NCgl1221'-GFP 融合遺伝子を作製した。各種融合遺伝子はプラスミドベクターに組み込み、*C. glutamicum* に形質転換した。これらの株に対してグルタミン酸生産誘導処理を行い、グルタミン酸排出活性の測定と蛍光顕微鏡による NCgl1221'-GFP 融合タンパク質の細胞内局在の観察を行った。
【結果】GFP 蛍光観察の結果、NCgl1221 の細胞質ドメインの後に GFP を融合させたものは、細胞極および細胞分裂面に局在している様子が観察された。グルタミン酸生産の誘導処理を行ったところ正常にグルタミン酸が生産されたことから、この融合体は機能を保持している。興味深いことに、誘導処理によりその局在が変化し、細胞全体にドット状に局在する様子が観察された。そこで、この局在シグナルが NCgl1221 のどの領域に存在するか調べるために、N 末の 3 回膜貫通ドメインの直後に GFP を融合した融合体を構築したところ、細胞中央と両極への局在が観察された。しかしながら、この融合体は誘導処理をしてもグルタミン酸を生産できず、局在の変化も観察されなかった。これらのことから、NCgl1221 は普段は細胞分裂面に局在しているが、誘導処理により細胞膜の張力が変化すると活性化するとともに、その局在を変化させ、グルタミン酸を排出するようになると考えられる。

Corynebacterium glutamicum, NCgl1221, glutamic acid

講演番号：2B21p20
講演日時、会場：3 月 27 日 17:59～ B 校舎 21 会場

Evolution, distribution and structure of the carbazole degradation gene cluster in novel carbazole-degrading bacteria

○ Felipe VEJARANO[1], Tatsuya MIKAMI[1], Jun MATSUZAWA[1], Mitsuru NUMATA[2], Akira HOSOYAMA[2], Atsushi YAMAZOE[2], Chiho SUZUKI-MINAKUCHI[1], Kazunori OKADA[1], Hideaki NOJIRI[1] ([1]The Univ. of Tokyo, [2]NITE)

[Background] Environmental bacterial communities represent a promising reservoir of novel strains exhibiting innovative mechanisms for the degradation of carbazole, a mutagenic and toxic heterocyclic aromatic compound, mainly used today for dye manufacturing. In the model carbazole degrader *Pseudomonas resinovorans* CA10, mineralization of carbazole starts with the action of several enzymes encoded by the *car* gene cluster (*carAaAcAdBaBbCDEF*), which has been found in catabolic plasmids (pCAR1 and pCAR3), although strains that appear to have *car* genes on the chromosome have also been studied. To elucidate the evolutionary relationships of the *car* genes in carbazole-degraders, whole genome sequencing (WGS) of marine, soil, and activated sludge bacteria was performed and their *car* gene clusters and the neighboring regions were compared.

[Results and Discussion] We isolated two novel marine carbazole-degrading bacteria, *Hyphomonas* sp. KY3 and *Erythrobacter* sp. KY5, from Tokyo Bay and the coast of Choshi, respectively. WGS was done for these two and for previously isolated strains from soil (*Nocardioides aromaticivorans* IC177) and activated sludge (*Pseudomonas stutzeri* OM1 and *Sphingomonas* sp. KA1). WGS of KY5 strain was performed using the MiSeq platform and read assembly yielded a 3.3 Mb contig set with a N50 length of 821 kb. WGS for the other strains was performed using a combination of HiSeq 1000 and GS FLX Titanium platforms, which yielded contig sets of 3.5 Mb for KY3 (N50 of 774 kb), 5.2 Mb for IC177 (N50 of 561 kb), 6.0 Mb for KA1 (N50 of 120 kb) and 4.2 Mb for OM1 (N50 of 605 kb). Gene arrangement of the *carAaCBaBb* genes of the two marine isolates was similar to that of the soil dwelling IC177, suggesting that there is a common origin of the cluster for these three isolates. Furthermore, considering the difference of GC content between the *car* gene cluster and the rest of the genome, and the presence of at least one transposase gene and inverted repeats around the cluster, it is highly possible that previous transposition events have recruited the catabolic genes on the chromosome. Due to the lack of composite transposons such as those found on catabolic plasmids, these results suggest two different scenarios for the diversification of *car* genes located in chromosomes and plasmids.

bioremediation, carbazole, whole genome sequencing

講演番号：2B41a03
講演日時、会場：3 月 27 日 09:22～ B 校舎 41 会場

病原性真菌 *Cryptococcus neoformans* の PHO 遺伝子の発現制御

Transcriptional regulation of PHO genes in pathogenic yeast, *Cryptococcus neoformans*

○西澤 正文[1]、兼崎 友[2]、吉川 博文[3]、東江 昭夫[4] ([1]慶應大・医・微生物、[2]東農大・生物資源ゲノム解析センター、[3]東農大・応生科、[4]千葉大・真菌医学研究センター)
○Masafumi Nishizawa[1], Yu Kanesaki[2], Hirofumi Yoshikawa[3], Akio Toh-e[4] ([1]Keio Univ. Sch. Med., [2]Nodai Genome Res. Ctr., [3]Tokyo Univ. of Agric., [4]Chiba Univ.)

病原性真菌 *Cryptococcus neoformans* はヒトやイヌ、ネコに感染し、中枢神経系を冒す等の重篤な症状を引き起こす。*C. neoformans* の感染・発症機構について分子生物学的研究が進んでいるが、ヒト体内というストレス環境（高温、pH、免疫系等）にどのように適応して、定着・増殖するかについてはまだわからないことが多い。リン酸は核酸や生体膜の構成要素に加え、生体エネルギー、細胞内情報伝達に必須な栄養素であり、ヒト体内でこれを着実に獲得することが病原菌の感染成立に必要である。

真核微生物のリン酸獲得に関わる PHO 遺伝子系の発現制御機構は出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* で詳細に研究されており、PHO 遺伝子の転写活性化因子 Pho4 の核内局在が Pho85 キナーゼによるリン酸化によって制御されていること、そして Pho85 キナーゼ活性はリン酸濃度によって制御されることがわかっている。*C. neoformans* にも PHO 遺伝子系(CnPHO)が存在しており、RNA-seq 解析により *CnPHO5*（ホスファターゼ）、 *CnPHO84*（トランスポーター）等のリン酸代謝系遺伝子の発現がリン酸によって制御されていること、CnPho4 がその転写活性化に必要であり、CnPho80（Pho85 のサイクリン）がそれを抑制することがわかった。*CnPHO85* は出芽酵母と異なり、*C. neoformans* の生育に必須な遺伝子であった。また *CnPHO4*、*CnPHO85*、*CnPHO80* 等の CnPHO 系の制御遺伝子の発現もリン酸依存性であることがわかり、出芽酵母とは大きく異なっていた。次いで、ChIP-seq 解析により、CnPho4 がリン酸濃度依存的にリン酸代謝系遺伝子のプロモーター領域やイントロンに結合することがわかった。これらの結果は、*C. neoformans* の PHO 遺伝子系の発現制御機構は出芽酵母と共通していることと全く異なることがあることを示しており、*C. neoformans* が生体内で感染を起こすために必要な機構の一つという可能性が考えられる。

Pathogenic yeast, Gene expression, Stress response

講演番号：2B41a04
講演日時、会場：3 月 27 日 09:33～ B 校舎 41 会場

黄麹菌 *Aspergillus oryzae* のセリンタイプカルボキシペプチダーゼ遺伝子のイントロン残存の配列依存性の解析

The sequence dependence analysis on the intron retention of a serine-type carboxypeptidase gene in *Aspergillus oryzae*

○石田 健、久保島 恵、上野 絢子、森田 寛人、前田 浩、岡本 絢子、竹内 道雄、山形 洋平（東京農工大　応生科）
○Ken ISHIDA, Megumi KUBOSHIMA, Ayako UENO, Hiroto MORITA, Hiroshi MAEDA, Ayako OKAMOTO, Michio TAKEUCHI, Youhei YAMAGATA (Division of Applied Biological Chemistry, Tokyo Univ. of Agriculture and Technology)

【背景・目的】

オルタナティブスプライシングとは転写後の修飾過程の違いにより、同一の遺伝子から異なる mRNA が作られる現象を指す。本研究室の解析により、黄麹菌 *Aspergillus oryzae* のセリンタイプカルボキシペプチダーゼ遺伝子の 1 つ *ocpG* においてオルタナティブスプライシングの 1 種であるイントロン残存が起こることが示された。野生株の解析の結果、この遺伝子の成熟 mRNA 中には完全にスプライシングされた mRNA とイントロンが残存した mRNA が混在していること、 *ocpG* に 3 つ存在するイントロンはそれぞれ残存割合が異なることが明らかとなった[1)]。また、 *ocpG* 遺伝子のイントロン配列のみを入れ替えた株の解析ではこれらの残存が *ocpG* エキソン配列、イントロン配列いずれに依存するのかは未解明であった。このため、新たに別の遺伝子に*ocpG* イントロンを挿入し、残存割合を調べることで *ocpG* イントロン残存のイントロン配列への依存度を検討した。

【方法・結果】

ocpG イントロンを挿入する遺伝子としてアスパルティックプロテアーゼ遺伝子 *pepO* を選択した。*pepO* 遺伝子欠損株をホストとして、*pepO* 遺伝子のイントロン 1 の位置に*ocpG* イントロン 1 配列もしくはイントロン 2 配列を挿入した株、コントロールとして*pepO* に 3 つ存在するイントロンのうちイントロン 1 のみをもつ株をそれぞれ作製した。これらの株を Czapek-Dox 液体培地で 24 時間培養し、それぞれの株のイントロン置換 *pepO* のスプライシングパターンを確認した。

解析の結果、コントロール株の *pepO* イントロンはほとんどスプライシングされていたのに対し、*ocpG* イントロン 1 挿入株、*ocpG* イントロン 2 挿入株はイントロン残存を起こすことが明らかとなった。野生株における *ocpG* 遺伝子と同様に、これらの成熟 mRNA 中には完全にスプライシングされた mRNA とイントロンが残存した mRNA が混在していた。これらのことから *ocpG* のイントロン 1 、イントロン 2 領域にイントロン残存を指示するシグナルが存在することが示唆された。残存が起こる *ocpG* イントロンと他のイントロンの間で、スプライソソームの認識配列であるスプライシングシグナルに明確な差は認められなかったため、イントロン性スプライシングサイレンサー等のイントロン内の塩基配列が *ocpG* イントロンの残存に影響を与えている可能性が考えられた。

なお、本研究の一部は生研センター基礎推進事業の一環として行われたものである。

1) Ishida K, *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2014;**78**:1328-1336.

Aspergillus oryzae, intron retention, intron sequence

講演番号：2B41a05
講演日時、会場：3 月 27 日 09:44～ B 校舎 41 会場

冬虫夏草（*Cordyceps militaris*）の感染過程における各種トランスクリプトーム解析

Transcriptome analysis on the infection process of the fungus *Cordyceps militaris*.

○鈴木 智大[1]、道羅 英夫[1]、崔 宰熏[2]、加藤 竜也[1,2]、朴 龍洙[1,2,4]、阿部 伸一[3]、佐伯 潤[3]、平井 浩文[1,2]、河岸 洋和[1,2,4]（[1]静大・グリーン研、[2]静大農・応生化、[3]にちはら総研、[4]静大院・創造）

○Tomohiro SUZUKI[1], Hideo DOHRA[1], Jae-hoon CHOI[2], Tatsuya KATO[1,2], Enoch Y. PARK[1,2,4], Shinichi ABE[3], Jun-David SAEKI[3], Hirofumi HIRAI[1,2], Hirokazu KAWAGISHI[1,2,4] ([1]RIGST, Shizuoka Univ., [2]Grad. Sch. of Agric., Shizuoka Univ., [3]Nichihara R&D Lab Inc., [4]Grad. Sch. of Sci. and Tech., Shizuoka Univ.)

【目的】

冬虫夏草は昆虫などから生じるキノコの総称で、節足動物の病原体として世界的に約 400 種以上が確認されている。冬虫夏草 *Cordyceps militaris*（サナギタケ）は鱗翅目昆虫の蛹の病原体で、北半球の大部分で発生する[1)]。しかし、感染から寄生そして子実体形成における詳細なメカニズムは未だ不明であり、これらを解明することはこの種の菌の生産及び栽培にも有用な情報となることが期待される。

そこで本研究ではサナギタケの感染過程において発現する遺伝子を、網羅的に解析するため、サナギタケ菌体をカイコ（*Bombyx mori*）の蛹に接種した後の遺伝子発現を次世代シーケンサーを用いて解析することを目的とした。またより長鎖長で正確なトランスクリプトームデータを取得するため、長鎖ライブラリーの作成も試みた。

【方法及び結果】

シーケンス解析には Illumina 社の MiSeq を用いた。まず、滅菌したカイコ蛹培地にて分生子を散布して得られた菌糸体と生きたカイコ蛹に分生子を接種して得られた菌糸体から total RNA の抽出を行った。その後、それぞれライブラリーの作成を行った。シーケンス解析は両末端 150 bp の Paired-end でシーケンスを行った。長鎖ライブラリーの作成は、まず Ovation RNA-Seq System を用いて cDNA 合成を行った。次いで Covaris を用いた断片化を行い 550 bp 付近の断片化サイズを回収した後、ライブラリーの作成及びシーケンス解析を行った。シーケンス解析は両末端 300 bp の Paired-end でシーケンスを行った。

取得したリード配列はTrinity等、各種*de novo*アセンブルに供した。現在詳細に発現差解析・アノテーションを行っている。

1) Sung, GH., et al., Studies in Mycology, 57, 5 (2007).

fungus, *Cordyceps militaris*, transcriptome

講演番号：2B41a06
講演日時、会場：3 月 27 日 10:05～ B 校舎 41 会場

コリネ型細菌における ECF シグマ因子 SigE のイソブタノール応答性発現制御機構

The isobutanol-responsive transcriptional regulatory mechanism of *sigE* encoding the ECF sigma factor SigE in *Corynebacterium glutamicum*

辻本 敏博[1]、○豊田 晃一[2]、寺本 陽彦[2]、乾 将行[1,2] ([1]奈良先端大・バイオ、[2]RITE)
Toshihiro TSUJIMOTO[1], ○ Koichi TOYODA[2], Haruhiko TERAMOTO[2], Masayuki INUI[1,2] ([1]NAIST, [2]RITE)

【目的】イソブタノールはエネルギー含有量が高く、吸湿性および腐食性が低いことから、次世代のバイオ燃料として期待されている。しかしその高い細胞毒性が醗酵生産技術の開発において大きな障壁となっている。我々は細胞の転写レベルにおけるイソブタノール応答機構の解明を目指し、有用工業微生物である *Corynebacterium glutamicum* を対象に研究を進めている。これまでのマイクロアレイ解析により、環境ストレス応答に関与する extracytoplasmic function (ECF)シグマ因子および様々なストレス応答タンパクをコードする遺伝子の発現がイソブタノールに応答して誘導されることを見出している。本研究においては ECF シグマ因子 SigE をコードする *sigE* 遺伝子のイソブタノール応答性発現制御機構の解明を目的とした。

【方法と結果】分類学上同じ Actinomycetales に属する *Mycobacterium tuberculosis* における SigE ortholog の発現は二成分制御系 MprAB によって制御される [1]。マイクロアレイ解析結果から、我々は *C. glutamicum* においてイソブタノールによって強く誘導される二成分制御系として PhoRS を見出した。この二成分制御系は response regulator PhoR と sensor kinase PhoS によって構成され、リン酸欠乏応答に関与する [2]。一方、*C. glutamicum* における MprAB ortholog の発現はイソブタノールによって影響を受けなかった。PhoR、PhoS をコードする遺伝子 *phoR*、 *phoS* はオペロンを形成しており、PhoR により正の自己制御を受ける。*phoR*、*phoS* どちらの遺伝子破壊株においてもこのオペロンのイソブタノールによる発現上昇が消失したことから、自己制御を介した応答であることが明らかとなった。イソブタノールに応答した *sigE* の誘導も *phoR*、*phoS* 破壊株において消失した。以上の結果から、PhoRS によってイソブタノールストレスが認識され、活性化された PhoR によって *sigE* が誘導されるという転写制御カスケードが明らかとなった。*phoR*、*phoS* 破壊株は非常に高いイソブタノール感受性を示した。このことは PhoR regulon にイソブタノール耐性に関与する因子が含まれていることを示唆する。

1) He H., *et. al*., *J. Bacteriol.* **188(6)**, 2134-43, (2006)
2) Kocan M., *et. al*., *J. Bacteriol.* **188(2)**, 724-32, (2006)

Corynebacterium glutamiucm, isobutanol, sigma factor

講演番号：2B41a07
講演日時、会場：3 月 27 日 10:16～ B 校舎 41 会場

コリネ型細菌における転写因子 AraR によるアラビノース応答制御機構

Arabinose-responsive transcriptional regulatory mechanism in Corynebacterium glutamicum

○久下 貴之[1,2]、寺本 陽彦[2]、乾 将行[1,2] ([1]奈良先端大・バイオ、[2]RITE)
○Takayuki KUGE[1,2], Haruhiko TERAMOTO[2], Masayuki INUI[1,2] ([1]NAIST, [2]RITE)

【目的】我々は、有用工業微生物である *Corynebacterium glutamicum* の糖利用能の向上を目指し、関連遺伝子の機能および発現制御機構の解析を進めてきた。アラビノース資化能を有する ATCC 31831 株のゲノム上でアラビノース代謝酵素遺伝子 *araBDA* と取り込み体遺伝子 *araE* は、LacI family の転写因子（AraR）をコードする *araR* 遺伝子とクラスターを形成し、AraR がこれらの遺伝子の転写抑制因子として働くことをこれまでに明らかにした[1,2]。AraR はアラビノース非存在下において *araB* 転写開始点下流に 1 カ所、*araE* 転写開始点下流と上流に 2 カ所の計 3 か所に結合し、その結合サイトと転写開始点の位置関係により転写抑制効果が異なることが示唆されている。本研究では、これらアラビノース代謝関連遺伝子群のアラビノース応答制御機構についてさらに解析を行った。
【方法と結果】*araB* 上流域の AraR 結合サイトに変異を導入することにより *araBDA* だけでなく、その上流逆向きに位置するアルドース 1-エピメラーゼ遺伝子（*galM*）と *araR* の発現が上昇することが明らかになっている。RT-PCR 解析により、*araR* は *galM* とオペロンを形成していることが示された。さらに、LacZ レポーターアッセイによって *araR* 上流域にアラビノース応答に関与しない AraR 非依存的なプロモーターを見出した。以上の結果から、*araR* の発現はアラビノース誘導性の *galM* プロモーターと *galM-araR* オペロン内部に存在する恒常的な *araR* プロモーターの支配下にあると考えられる。また、3 カ所の AraR 結合サイトのそれぞれを含むプローブを用いてゲルシフトアッセイを行い、AraR のネガティブエフェクターとして働くアラビノースの効果を比較した。その結果、アラビノース非存在下における AraR の結合活性は全てのサイト間で違いがなかったにもかかわらず、*araB* 上流のサイトに比べて *araE* 上流の 2 つのサイトに対する結合はアラビノースにより強く阻害された。この結果は、*araB* プロモーターと *araE* プロモーター間で誘導に必要な細胞内のアラビノースの濃度が異なる可能性を示唆する。

1）Kawaguchi H., *et. al.*, *Appl. Environ. Microbiol.* **75(11)**, 3419-3429, (2009)
2）Kuge T., *et. al.*, *J Bacteriol* **196(12)**, 2242-2254, (2014)

Corynebacterium glutamicum, Arabinose, Sugar metabolism

講演番号：2B41a08
講演日時、会場：3 月 27 日 10:27～ B 校舎 41 会場

コリネ型細菌 RNase III による細胞分裂制御

Role of the RNase III of *Corynebacterium glutamicum* in cell division

○前田 智也[1]、田中 裕也[1]、竹本 訓彦[1]、乾 将行[1,2] ([1]RITE、[2]奈良先端大・バイオ)
○Tomoya MAEDA[1], Yuya TANAKA[1], Norihiko TAKEMOTO[1], Masayuki INUI[1,2] ([1]RITE, [2]NAIST)

【目的】コリネ型細菌 *Corynebacterium glutamicum* はグルタミン酸の生産菌として分離され、グルタミン酸やリジンなどの工業的発酵生産に利用されている。また本菌を用いて、アミノ酸だけでなく、有機酸や核酸、バイオ燃料などの発酵生産への応用が試みられている。本菌は結核菌を含むミコール酸含有放線菌群に属し、スナッピング分裂という大腸菌など他の細菌とは異なる分裂機構を有している。しかし、本菌の形態形成や細胞分裂の制御機構はよくわかっていない。
遺伝子発現制御は転写段階だけではなく、mRNA の安定性などの転写後段階においても複雑に制御されている。RNase III は多くの生物に広く保存されている二本鎖特異的なエンド型の RNA 分解酵素である。細菌において RNase III は rRNA の成熟に関与するほか、mRNA の分解制御にも関与することが報告されている。近年、mRNA レベルでの遺伝子発現制御が細菌においても注目されている。本研究では RNase III の機能解析を行うことで、有用物質生産菌における mRNA レベルの遺伝子発現制御機構の解明を目指した。
【方法および結果】我々は、*C. glutamicum* における RNase III 欠損株が伸長細胞を形成することを見出した。そこで RNase III 欠損が細胞伸長を引き起こす原因を明らかにするためにマイクロアレイ解析を行った。RNase III 欠損株では細胞分裂に関与する複数の遺伝子の発現量低下が観察された。これらの発現量低下は定量 RT-PCR 法を用いた発現解析でも同様に確認された。一方、RNase III 欠損により発現量が上昇する遺伝子として *mraZ* を見出した。MraZ は多くの細菌において FtsZ を含む細胞分裂関連遺伝子群をコードするオペロンの上流によく保存されており、大腸菌において転写因子として機能していることが示唆されている。*C. glutamicum* においても *mraZ* の過剰発現株は、大腸菌同様に伸長細胞を形成することを確認した。リファンピシンチェイス法により *mraZ* mRNA の半減期を調べたところ、RNase III 欠損により *mraZ* mRNA の安定性が著しく上昇することがわかった。これらのことから、RNase III は *C. glutamicum* において細胞分裂遺伝子群の発現制御に関与していることが示唆された。

Corynebacterium glutamicum, RNase III, cell division

講演番号：2B41a09
講演日時、会場：3 月 27 日 10:38～ B 校舎 41 会場

コリネ型細菌における RNase J によるリジン生合成経路遺伝子の発現制御解析
RNase J regulates lysine synthesis genes in *Corynebacterium glutamicum*.
○濱本 渚[1]、田中 裕也[2]、竹本 訓彦[2]、乾 将行[1,2] ([1]奈良先端大・バイオ、[2]RITE)
○Nagisa HAMAMOTO[1], Yuya TANAKA[2], Norihiko TAKEMOTO[2], Masayuki INUI[1,2] ([1]NAIST, [2]RITE)

【目的】我々はグルタミン酸、リジンや有機酸などの生産に用いられている有用工業微生物 *Corynebacterium glutamicum* の遺伝子発現制御機構について解析を進めている。*C. glutamicum* によるリジン生産についてはプロモーター改変による転写量の調節や、酵素のフィードバック解除による研究が古くから行なわれている。しかし、リジン生産における転写後制御についての研究報告はない。最も重要な転写開始後の制御の 1 つとして mRNA の分解制御がある。*C. glutamicum* は mRNA を分解する主要な endoribonuclease 候補として枯草菌の RNase J1 のホモログである RNase J を保持している。そこで本研究ではリジン生合成経路遺伝子の mRNA 分解制御について RNase J に着目して解析を行った。

【方法と結果】これまでに C. glutamicum の RNase J 遺伝子(*rnj*)は、dihydrodipicolinate reductase 遺伝子(*dapB*)、cgR_1801、dihydrodipicolinate synthase 遺伝子(*dapA*)とオペロンを形成しているとの報告がある。そこで、RNase J が自身を含むオペロンの分解制御に関与する可能性を検討した。定量リアルタイム PCR 法により *dapA* mRNA 量の定量を行ったところ *rnj* 破壊株において *dapA* mRNA 量は野生株と比べて 2 倍程度増加していた。また *dapA* mRNA の半減期も 0.89 分から 4.26 分に増加していた。これらの結果から RNase J は *dapA* 遺伝子を分解制御している可能性が示唆された。次に *rnj* 欠損株における他のリジン生合成経路遺伝子の mRNA 量の定量を行ったところ、diaminopimelate decarboxylase 遺伝子(*lysA*)をはじめとする他のリジン生合成経路遺伝子群も発現上昇していることが観察された。またリファンピシンチェイス法によりそれら遺伝子の半減期を調べたところ、RNase J の破壊により mRNA の安定化も確認された。以上の結果から、リジン生合成経路遺伝子群は RNase J により分解制御を受けていることが示唆された。また、RNase J による分解制御がリジン生産に与える影響についても検討を行った。

RNase J, *Corynebacterium glutamicum*, lysine synthesis genes

講演番号：2B41a11
講演日時、会場：3 月 27 日 11:10～ B 校舎 41 会場

Corynebacterium glutamicum RNase E/G ファミリー酵素の mRNA 認識機構の解析
Analysis of mRNA recognition mechanism of *Corynebacterium glutamicum* RNase E/G family endoribonulease
○遠藤 諭、前田 智也、岩井 伯隆、和地 正明（東工大院生命理工）
○Satoshi ENDO, Tomoya MAEDA, Noritaka IWAI, Masaaki WACHI (Dept. Bioeng., Tokyo Tech)

【背景と目的】コリネ型細菌 *Corynebacterium glutamicum* はグルタミン酸生産菌として分離され、多くのアミノ酸や有機酸などの工業的発酵生産に利用されている。これまで *C. glutamicum* における遺伝子発現制御については転写段階の解析が中心であったが、mRNA の安定性など、転写後段階においても複雑に制御されていることが明らかとなってきている。RNase E/G ファミリー酵素は多くの細菌に保存されているエンド型の RNA 分解酵素であり、大腸菌では生育に必須な RNase E と、欠失可能な RNase G の二つのホモログが知られている。一方、*C. glutamicum* では NCgl2281 遺伝子に唯一のホモログがコードされており、欠失可能である。近年、細菌においても mRNA レベルでの遺伝子発現制御が注目されており、mRNA の安定性を調節することで細菌の更なる有効利用が可能になると思われる。本研究では、有用物質生産菌である *C. glutamicum* において RNase E/G の mRNA 認識機構の解析を行うことで、mRNA レベルの遺伝子発現制御メカニズムの解明を目指した。特に、基質選択性が高い *C. glutamicum* の NCgl2281 の基質認識機構の解明が進めば、特定の mRNA の安定性を制御することにより、効率的な発酵生産のための代謝系の強化や外来タンパク質の高生産などへの応用が期待される。
【方法と結果】これまでに NCgl2281 は、グリオキシル酸経路のイソクエン酸リアーゼをコードする *aceA* mRNA の 3'非翻訳領域（3'-UTR）を特異的に認識、切断することが明らかとなっている。つまり、NCgl2281 欠損株では *aceA* mRNA が安定化し、AceA タンパク質の過剰発現が引き起こされる。そこで、NCgl2281 が *aceA* mRNA 3'-UTR を認識する要因を検討した。*aceA* mRNA 3'-UTR には、2つのステムループ構造とそれらをつなぐ AU リッチな一本鎖領域が存在することが予測された。RNase E/G は一本鎖特異的 RNase であることから、この一本鎖領域を切断していると考えられた。そこで、その周辺を含む領域に塩基置換、あるいは欠損を導入したところ、部分的な mRNA の安定化が認められた。この結果から、NCgl2281 の *aceA* mRNA の認識には、切断点周辺を含めた二次構造が重要である可能性が示唆された。
現在までに NCgl2281 の基質 mRNA として明らかになっているものは *aceA* mRNA のみである。*C. glutamicum* の代謝制御における NCgl2281 の生理的役割について解明するため、*aceA* mRNA 以外の基質 RNA をプロテオーム解析により探索した。フルクトースを唯一の炭素源として増殖させた場合、NCgl2281 欠損株で MetE タンパク質の過剰発現が確認された。さらに、欠損株において *metE* mRNA が安定化していたことから、*metE* mRNA は NCgl2281 の基質である可能性が示された。

Corynebacterium glutamicum, RNase E/G, mRNA stability

講演番号：2B41a12
講演日時、会場：3 月 27 日 11:21～ B 校舎 41 会場

プラスミドと宿主染色体由来 MvaT 様因子のヘテロ二量体形成機構
Hetero-dimerization manners of MvaT homologs encoded on the plasmid and host chromosome
○川妻 孝平[1]、水口（鈴木） 千穂[1]、寺田 透[2]、藤本 瑞[3]、岡田 憲典[1]、野尻 秀昭[1] ([1]東大・生物工学セ、[2]東大・農・応生工、[3]農生資研)
○ Kohei Kawazuma[1], Chiho SUZUKI-MINAKUCHI[1], Tohru TERADA[2], Zui FUJIMOTO[3], Kazunori OKADA[1], Hideaki NOJIRI[1] ([1]Biotechnology Research Center, The Univ. of Tokyo, [2]Graduate School of Agricultual and Life Sciences, The Univ. of Tokyo, [3]NIAS)

【目的】細菌の遺伝子転写制御には核様体タンパク質 (NAPs) が重要な役割を果たすが、NAPs は染色体だけではなく可動性遺伝因子であるプラスミドにもコードされている。宿主細菌が NAPs をコードするプラスミドを保持すると、既に宿主細菌内で形成されていた NAPs の転写制御ネットワークに新たな NAPs が加わることになり、プラスミド・宿主染色体由来の NAPs が協調的に両ゲノムの転写を制御するようになる。当研究室で研究が進められてきたプラスミド pCAR1 にコードされる Pmr と、モデル宿主 *Pseudomonas putida* KT2440 株の染色体にコードされる TurA、TurB の 3 つの MvaT ホモログ（NAPs の一種で、腸内細菌の H-NS の機能的ホモログ）は、C 末端側の DNA 結合ドメインで標的塩基配列に結合した後、N 末端側の二量体／多量体化ドメインにより DNA 上で多量体化することで遺伝子の転写制御を行う。これまでに Pmr、TurA、TurB はホモ・ヘテロ二量体を基本構造として多量体を形成することが明らかになっていた。そこで本研究では 3 つの MvaT ホモログの各組合せにおいてヘテロ二量体の形成しやすさを検証し、さらにヘテロ二量体形成に重要な残基の探索を行った。
【方法と結果】昨年度までに同定した Pmr、TurA、TurB の二量体／多量体化ドメイン (Pmr_nt_{61}, $TurA_nt_{61}$, $TurB_nt_{61}$) と同ドメインを含む長さの異なるタンパク質とをモル比を変えて混合し、タンパク質間クロスリンク法によってホモ・ヘテロ二量体の検出を行ったところ、Pmr-TurA 間、Pmr-TurB 間ではモル比がそれぞれ 1:7, 1:10 でも Pmr のホモ二量体が検出された一方で、TurA-TurB 間ではモル比 1:3 で TurA のホモ二量体が見られなくなった。これは他の組み合わせよりも TurA-TurB 間の方がヘテロ二量体を形成しやすいことを意味している。このような差が生じる原因を調べるため、二次構造予測を基に N 末端から 28 残基までのモデル構造を作製したところ、TurB の N 末端から 3 番目のアルギニン残基同士による電気的反発が TurB のホモ二量体を不安定化させている可能性が示唆された。そこで、安定なホモ二量体を形成すると予想される Pmr の N 末端から 3 番目のロイシン残基をアルギニン残基に置換し、TurA とのヘテロ二量体形成能を検証したが、ヘテロ二量体の割合は向上しなかった。現在は TurB と Pmr のキメラタンパク質を用いてヘテロ二量体形成に重要な残基の絞り込みを行っている。また、結晶構造解析からも二量体形成機構の解明を進めており、これまでにホモ二量体で安定する $TurB_nt_{61}$ アラニン置換体の結晶を作製し、分解能約 2.3 Å の回折データの取得に成功している。現在はセレノメチオニン置換タンパク質の結晶化を行い、単波長・多波長異常分散法による構造解析を試みている。

H-NS, plasmid, Pseudomonas

講演番号：2B41a13
講演日時、会場：3 月 27 日 11:32～ B 校舎 41 会場

大腸菌 DNA 結合性転写因子 FimZ による定常期細胞の伸展化機構

Regulation of bacterial morphology at stationary phase by transcriptional factor FimZ in *Escherichia coli*

○小川 綾乃[1]、石浜 明[1,2]、山本 兼由[1,2]（[1]法政大・理工・生命科学、[2]法政大・ナノテクセンター）
○Ayano OGAWA[1], Akira ISHIHAMA[1,2], Kaneyoshi YAMAMOTO[1,2] ([1]Dept. Frontier Biosci., Hosei Univ., [2]Res. Cent. Micro-Nano Tech., Hosei Univ.)

大腸菌は単細胞生物であるが様々な環境に適応することができる。この多様な環境適応のほとんどは遺伝子発現における転写レベルで調節されており、これは DNA 結合ドメインを持つ転写因子が、DNA 上で RNA ポリメラーゼと相互作用をして転写を制御していることに起因していると考えられている。さらに、これらの転写因子は培養条件によりそれぞれの細胞内量が異なる（a)。大腸菌 DNA 結合ドメインを持つ転写因子であり、二成分制御系のレスポンスレギュレーターとされる *fimZ* 遺伝子の発現は極めて弱く、レポーターアッセイなどで検出することができない。そこで、FimZ の発現誘導を行ったところ、細胞内 FimZ 量に依存した定常期特異的な細胞の伸展化を確認した。また、同様な大腸菌細胞形態変化を示す転写因子は、チューブリン様タンパク質遺伝子 *ftsZ* を活性化する SdiA や RcsB が知られる（b)。本研究では、FimZ によるゲノム発現制御機構から、定常期細胞の伸展化を理解することを目的とした。

まず、FimZ 依存的に伸展化した大腸菌定常期細胞について、細胞膜および核様体の蛍光染色を用いて分析した。その結果、FimZ により伸展化した大腸菌定常期細胞は長軸長が平均 3.2 μm の細胞であり、細胞当り１つの核様体を持つことが明らかとなった。さらに、その核様体は細胞中央部に局在することが確認された。次に、FimZ により伸展化した定常期における大腸菌のトランスクリプトーム解析を行い、ゲノム全遺伝子発現のプロファイルを得た。その結果、伸展化した大腸菌細胞では、（１）SOS 応答遺伝子群の発現増加、（２）線毛形成遺伝子群の発現増加、（３）プトレッシン利用代謝経路遺伝子群の発現増加、（４）RpoS 制御遺伝子群の発現低下が主な特徴であった。実際に、線毛形成遺伝子 *sfmA* プロモーターおよびプトレッシン代謝遺伝子 *puuD* プロモーターの活性が FimZ により誘導されることをレポーターシステムにより確認した。しかし、線毛遺伝子群とプトレッシン代謝遺伝子群の変異体を用いた顕微鏡観察では、いずれの遺伝子欠失株においても FimZ 依存的な大腸菌細胞の伸展化を抑制しなかった。また、FimZ 依存的な伸展化定常期細胞における細胞内 RpoS 量を、ウエスタンブロッティングを用いて測定したところ、RpoS 量の減少は見出されなかった。現在、FimZ による SOS 応答に関する転写制御および SOS 応答遺伝子群の FimZ 依存的定常期特異的な伸展化への関与を解析している。

(a) K. Yamamoto *et al.*, *Microbiology* (2014)
(b) L. Rothfield *et al.*, *Annu. Rev. Genet.* (1999)

transcriptional regulator, *Escherichia coli*, morphology

講演番号：2B41a14
講演日時、会場：3 月 27 日 11:43～ B 校舎 41 会場

Bifidobacterium longum NCC2705 株における線毛関連遺伝子の破壊
Knockout of fimbriae-like gene of *Bifidobacterium longum* NCC2705
○高橋 真裕子[1]、滝口 裕加[1]、野村 泉[2]、鈴木 徹[2]([1]岐阜大学応用生物、[2]岐阜大学院連農)
○ MAYUKO TAKAHASHI[1], YUKA TAKIGUCHI[1], IZUMI NOMURA[2], TOHRU SUZUKI[2]
([1]Dpt.Appl.Life Sci.,Gifu Univ, [2]United Grad.Sch.,Gifu Univ)

【目的】ビフィズス菌はヒトの大腸の細菌叢を構成する主要な細菌種の一つである。しかし、ビフィズス菌がなぜ大腸に定着出来るのかを説明するメカニズムは未だ明らかでない。*Bifidobacterium longum* NCC2705 株には、繊毛タンパクをコードすると考えられる BL0675 遺伝子が存在していることが知られている。この上下流は、他の *B. longum* 株において高度に保存されているのに対し、BL0675 のみがアミノ酸配列の保存性が低く、各菌株は A～E 型の 5 つの型に分類される[1)]。この遺伝子は①ビフィズス菌が宿主に定着する際に重要な役割を果たしていると考えられる②遺伝子の多形は、菌株間のホスト選択を決定している、と推測がされる。本研究ではこれらの繊毛様遺伝子の機能を明らかにするために, *B. longum* NCC2705 株の BL0675 遺伝子を破壊し、神戸大学大澤研から分与された菌株から得た 5 種類の *BL0675* 遺伝子を作成した *B. longum* NCC2705 *ΔBL0675* 株に導入を目指し実験を行った。
【方法】*B. longum* NCC2705 *ΔpyrE* 株の BL0675 遺伝子を *pyrE* 遺伝子で破壊した。破壊には温度感受性のプラスミド pK0403 を用いた。これに *B. longum* NCC2705 株の *BL0675* 遺伝子の上流配列、下流配列を組み込み、その 2 つの配列の間に *pyrE* 遺伝子をレゴミド法によって組み込んだ。作成した破壊用ベクターはエレクトロポレーションによって *B. longum* NCC2705 株へ形質転換を行った。形質転換を行った *B. longum* NCC2705 株を最小培地で 42 度培養させることで、相同組み換えによって *pyrE* を獲得した菌のみを選択的に培養した。さらにスペクチノマイシン耐性が無いことを確認することで目的の二重相同組み換えを起こした菌株を選択した。
【結果】*pyrE* 遺伝子を用いて *B. longum* NCC2705 *Δ*BL0675 株を作成した。現在、作成した *B. longum* NCC2705 *ΔBL0675* 株を用いて A～E 型の 5 種類の *BL0675* 置換株の作製を目指し実験を行っている。今後はこれらの BL0675 遺伝子置換株を用いて腸の構成糖に対する特異性を比較し、BL0675 遺伝子の配列による違いが宿主の腸管への接着性に与える影響を調べていく予定である。
1)Iguchi *et al.*, *Antonie van Leeuwenhoek* (2011) **99**:457-471

Bifidobacterium longum, gene knockout, fimbriae

講演番号：2B41p03
講演日時、会場：3 月 27 日 14:22～ B 校舎 41 会場

糸状菌 *Trichoderma reesei* におけるセロビオース応答性セルラーゼ誘導機構の解明

Cellobiose-dependent cellulase induction mechanism in filamentous fungi *Trichoderma reesei*

○会田 宏樹[1]、平沢 大樹[1]、新田 美貴子[2]、塩屋 幸樹[1]、志田 洋介[1]、小笠原 渉[1] ([1]長岡技科大・生物、[2]科学技術振興機構)
○Hiroki AITA[1], Hiroki HIRASAWA[1], Mikiko NITTA[2], Koki SHIOYA[1], Yosuke SHIDA[1], Wataru OGASAWARA[1] ([1]Dept. of Bioeng., Nagaoka Univ. of Tech, [2]JST)

【目的】

糸状菌 *Trichoderma reesei* は，セルロースやその分解産物であるセロビオースに応答したセルラーゼ生産機構を有する．セルラーゼの生産は遺伝子転写レベルで制御されており，多様な転写調節因子によりセルラーゼ遺伝子の転写が活性化または抑制されている．セロビオースはセルラーゼ遺伝子転写の主要な誘導基質であると考えられているが，世界的標準株 QM9414 株では，セロビオースのセルラーゼ誘導能は結晶セルロースに比べて低い．しかし，QM9414 株を親株として取得されたセルラーゼ高生産変異株 PC-3-7 株では，セロビオースのセルラーゼ誘導能が向上していた．PC-3-7 株におけるセルラーゼ高生産性に寄与するゲノム上の変異を明らかにするために QM9414 株と PC-3-7 株間の比較ゲノム解析を行ったところ，転写調節因子 BglR に変異が生じていることが明らかとなった．PC-3-7 株における解析により，BglR は経路特異的なβ-グルコシダーゼ遺伝子発現の調節因子であることが示唆された [1)]．しかし，PC-3-7 株にはそのゲノム上に多数の変異が存在することから，BglR の完全な機能解明のためには，変異の少ない QM9414 株で評価を行う必要がある．そこで本研究では，*T. reesei* QM9414 株の *bglr* 破壊株の解析を行うことで *T. reesei* のセロビオースに応答したセルラーゼ生産調節機構を解明することを目的としている．

【方法と結果】

bglr を選択マーカー*pyr4* で置換した破壊用 DNA 断片を構築し，*T. reesei* QM9414 *pyr4*⁻株にプロトプラスト-PEG 法を用いて導入することで遺伝子破壊株を造成した．遺伝子の破壊はサザンハイブリダイゼーション法により確認した．現在，QM9414 株における *bglr* の破壊がセロビオース誘導によるセルラーゼ生産性に与える影響を解析している．一方，他のセロビオース応答性セルラーゼ生産関連転写調節因子として，*Aspergillus nidulans* で転写活性化因子 ClrB が報告されている [2)]．*T. reesei* のゲノムデータベースに対して BLAST 検索を行った結果，*T. reesei* のゲノム上に ClrB と高い相同性を持つタンパクをコードする遺伝子 *clr2* を見出した．そこで，*bglr* と同様に，QM9414 株における *clr2* の破壊株を造成した．今後は，破壊株を用いて，セロビオース誘導によるセルラーゼ生産に与える影響および BglR との関連を解析する予定である．

1) Nitta et al. (2012) Fungal Genet. Biol., 49, 388-397
2) Coradetti et al. (2012) Proc Natl Acad Sci U S A., 109, 19, 7397–7402

Trichoderma reesei, transcription factor, cellulase

講演番号：2B41p04
講演日時、会場：3 月 27 日 14:33～ B 校舎 41 会場

糸状菌 *Trichoderma reesei* における pH 応答転写調節因子 PacC の機能解析

Functional analysis of pH-dependent transcriptional factor PacC in filamentous fungi *Trichoderma reesei*

○平沢 大樹、会田 宏樹、塩屋 幸樹、志田 洋介、小笠原 渉（長岡技科大生物）
○Hiroki HIRASAWA, Hiroki AITA, Koki SHIOYA, Yosuke SHIDA, Wataru OGASAWARA (Dept. of Bioeng., Nagaoka Univ. of Tech.)

【目的】

糸状菌 *Trichoderma reesei* は、セルラーゼ高生産菌として知られており、その有用性からセルラーゼ生産制御機構について研究が行われている。糸状菌において、外的環境因子は菌の増殖や代謝物の種類及び量に重要な影響をおよぼす。pH は重要な環境因子の一つであり、糸状菌は外的環境の pH 変化に応答した遺伝子発現制御機構（pH シグナル伝達経路）を保持している。*Aspergillus nidulans* において、pH シグナル伝達経路は PacC と Pal タンパク質群によって構成されており、PacC は 2 次代謝産物の生産や環境ストレス耐性に重要な転写調節因子であると報告されている。*T. reesei* においても、PacC や Pal 遺伝子群のホモログ遺伝子が存在し、セルラーゼ生産への関与が考えられている。これまでに世界的標準株 QM9414 株のセルラーゼ生産性が環境 pH により異なったことより、pH シグナル伝達経路を介したセルラーゼ生産制御機構（pH 依存的セルラーゼ生産制御機構）の存在が示唆されている。そこで本研究では、pH 依存的セルラーゼ生産制御機構を解明するため、PacC の機能解析を試みた。

【方法と結果】

pacC ホモログ遺伝子を *pyr4* マーカーに置換した遺伝子破壊株(QMΔ*pacC* 株)を構築した。QM9414 株と QMΔ*pacC* 株を pH3.5、4.0、4.5、5.0、5.5 に調整したセルラーゼ誘導培地である 1% Avicel 培地で培養を行った。菌体外タンパク質量を測定した結果、環境 pH が増加するにつれて QM9414 株のタンパク質生産量は減少していたが、QMΔ*pacC* 株では高いタンパク質生産量を保持していた。また、定量的 RT-PCR 解析の結果、QM9414 株におけるセルラーゼ遺伝子群の転写は環境 pH が増加するにつれて減少していたことから、pH 依存的セルラーゼ生産制御機構は転写レベルで制御されることが示唆された。一方、*pacC* ホモログの転写は高 pH 側で増加していた。さらに、QMΔ*pacC* 株では pH5.5 においてセルラーゼ遺伝子(*cbh1*)の転写が QM9414 株の 7.7 倍も高かった。以上から、高 pH 側では PacC によってセルラーゼの転写が抑制されており、低 pH 側では PacC がほとんど発現していないため、抑制が弱いことが示唆された。次に、PacC ホモログの pH 以外の環境因子への影響を評価するために、各種環境ストレス条件下で両株の生育を比較した。その結果、QM9414 株と比べ、QMΔ*pacC* 株の塩及び金属ストレス耐性は低下していたが、浸透圧及び酸化ストレス耐性には大きな変化は見られなかった。このことから、PacC ホモログは pH 応答のみならず、多くの環境ストレス応答に対して重要な転写調節因子であることが示唆された。

Taranscriptional factor, pH, Trichoderma reesei

講演番号：2B41p05
講演日時、会場：3 月 27 日 14:44～ B 校舎 41 会場

Trichodema reesei におけるセルラーゼ生産性に関与する推定 MFS トランスポーター3405 の機能解析
Functional analysis of MFS transporter 3405 involved in cellulose production in *Trichoderma reesei*.

○吉澤 和将[1]、谷口 大樹[1]、古川 隆紀[2]、志田 洋介[1]、小笠原 渉[1] ([1]長岡技科大　生物、[2]エジンバラ大学)
○Kazumasa YOSHIZAWA[1], Hiroki TANIGUCHI[1], Takanori HURUKAWA[2], Yousuke SHIDA[1], wataru OGASAWARA[1] ([1]Dept. of Bioeng.,Nagaoka Univ. of Tech.,, [2]sch. of Biol.,Edinburgh Univ.)

[目的]　セルラーゼ高生産菌である *Trichoderma reesei* は細胞外にセルロースが存在することでセルラーゼを誘導的に生産する。*T. reesei* のセルラーゼ誘導機構は、構成的に発現しているセルラーゼによってセルロースから生じた分解産物（糖）が誘導物質として働くというモデルが提唱されている。このメカニズムに関して、誘導物質に応答する種々の転写調節因子が報告されているが、誘導物質となりうる糖の取り込みに関わるトランスポーターの報告は少ない。当研究室では *T. reesei* のゲノムデータベースから見出せる Major facilitator superfamily(MFS)に属するトランスポーター遺伝子のうち、セルラーゼ誘導条件下で高発現する推定トランスポーター3405（TRP3405）を発見している。世界標準株である QM9414 株で TRP3405 を破壊したところ、セルロース培養条件下でセルラーゼ生産能を欠失するにもかかわらず、糖取り込み能に大きな影響を与えないことが判明した。このことから、TRP3405 が *T. reesei* のセルラーゼ誘導機構に大きく関与していると推測されたため、本研究では TRP3405 の機能解析を目的とした。

[方法と結果]　セロビオースを炭素源として QM9414 株と破壊株を 0,3 時間誘導した菌糸から得られた RNA をマイクロアレイ解析に供した。その結果、破壊株ではセルラーゼ生産に重要な転写調節因子 XYR1 や ACE3 およびセルラーゼ・ヘミセルラーゼ、誘導性トランスポーターをコードする遺伝子の発現量が低下するまたは欠失していることが明らかになった。そのため、TRP3405 はセルラーゼ誘導経路において上流に位置する可能性が示唆された。また、TRP3405 の発現量は他のトランスポーターと比較して非常に高く、細胞内での局在性について興味が持たれたため、緑色蛍光タンパク質 GFP を用いた TRP3405-GFP 融合タンパク質発現株を構築した。局在性の解析は TRP3405 誘導条件下で共焦点顕微鏡および超解像顕微鏡 N-SIM を用いて行った。観察結果から GFP 蛍光が細胞内で円状に存在すること、そして、その挙動が非常に動的である事が確認された。菌体抽出液に対して、抗 GFP 抗体を用いたウエスタン解析を行ったところ、GFP のみの分子量に相当するバンドが検出されたため、融合タンパク質は TRP3405 と GFP の間で切断されていることが示唆された。切断 GFP の N 末端解析を行ったところ、切断部位は GFP の N 末端に存在することが明らかになった。現在、GFP の切断部位への変異導入を行った融合タンパク質発現株を用いた TRP3405 の局在性解析を進めている。

Trichoderma reesei, cellulase, sugar transporter

講演番号：2B41p06
講演日時、会場：3 月 27 日 15:05～ B 校舎 41 会場

Aspergillus oryzae 金属プロテアーゼ（ADAM）遺伝子欠損が細胞壁と遺伝子発現に及ぼす影響
Effects of metalloprotease（ ADAM ）gene deletion on the cell wall and gene expression in *Aspergillus oryzae*

○小林 拓嗣[1]、前田 浩[1]、古崎 利紀[2]、石井 一夫[2]、有江 力[2]、竹内 道雄[1]、山形 洋平[1]([1]東京農工大院・応生科、[2]東京農工大・農学系ゲノム人材育成プログラム)
○Takuji KOBAYASHI[1], Hiroshi MAEDA[1], Toshinori KOZAKI[2], Kazuo ISHII[2], Tsutomu ARIE[2], Michio TAKEUCHI[1], Youhei YAMAGATA[1] ([1]Dept. of Applied Life Science, Tokyo Univ. of Agriculture and Technology, [2]Tokyo Univ. of Agriculture and Technology)

【背景・目的】麹菌 *Aspergillus oryzae* AdmA, AdmB は、ADAM (A Disintegrin And Metalloproteinase) に特徴的な金属プロテアーゼドメインやディスインテグリンドメイン、膜貫通領域を持つタンパク質である。ADAM は、哺乳類において細胞接着やタンパク質プロセッシング、シグナル伝達などに関与することが知られている。一方、真菌の ADAM としては、分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* の Mde10 が胞子表層構造の構築に働くと推定されているものの、生物学的な機能は明らかになっていない。我々は、昨年度の本大会において、*A. oryzae admA*, *admB* の単独および二重欠損株を作製し、欠損株は calcofluor white や congo red といった細胞壁撹乱剤に感受性を示すことや分生子表層構造に変化が生じたことを報告した(1)。今回は、細胞壁に生じた変化をより詳細に明らかにするため、各欠損株の菌糸および分生子の細胞壁構成多糖の解析を行った。加えて、細胞壁に変化が生じた原因を探るために RNA-Seq 解析による網羅的な転写解析を行った結果についても報告する。
【方法・結果】細胞壁構成多糖の解析のために、CD 寒天平板培地にて培養した菌体から分けて回収した菌糸および分生子を熱水とアルカリ溶液により分画した。得られた画分のヘキソース含量をフェノール・硫酸法により定量し、ヘキソサミン含量を Blix 法により定量した。解析の結果、Δ*admA*Δ*admB* と Δ*admB* 菌糸のアルカリ可溶性画分とアルカリ不溶性画分のヘキソース含量比が変化しており、各欠損株菌糸のヘキソサミン含量は減少傾向であった。このことから、α-1,3-グルカンの増加、β-1,3-グルカンの減少といった細胞壁構成多糖の量的もしくは質的な変化が生じたことが示唆された。

RNA-Seq 解析は、各欠損株およびコントロール株を小麦フスマ固体培地にて 30℃, 72 時間培養した菌体より調製した total RNA を用いて行った。解析の結果、各欠損株では細胞壁構成多糖の合成関連遺伝子、特に分解酵素遺伝子に発現変動が見られた。また、発現変動に統計的な有意差がみられた遺伝子について GO 解析を行ったところ、transmembrane transport や oxidation-reduction process に加え、転写制御に関わる GO タームがみられた。さらに、各欠損株では DNA ダメージや細胞周期チェックポイントに関わるキナーゼ遺伝子にも発現が変動したものがみられた。このことから、*admA*, *admB* 欠損株ではシグナル伝達経路に変化が生じたことが示唆された。

なお、本研究の一部は、生研センター基盤研究推進事業の一環として行われたものである。

1) 小林ら、2014 年度日本農芸化学会大会講演要旨集、3A13p13

Aspergillus oryzae metalloprotease, cell wall, transcriptome

講演番号：2B41p07
講演日時、会場：3 月 27 日 15:16～ B 校舎 41 会場

Aspergillus aculeatus dipeptidyl peptidase IV のストレス応答に関する解析
Functional analysis of dipeptidyl peptidase IV on stress response in *Aspergillus aculeatus*
○遊亀 翔太、國武 絵美、谷 修治、炭谷 順一、川口 剛司（阪府大院・生環科）
○ SYOTA YUKI, EMI KUNITAKE, SYUJI TANI, JUN-ICHI SUMITANI, TAKASHI KAWAGUCHI (Osaka Pref. Univ.)

【目的】我々は，*A. aculeatus* T-DNA 挿入変異株ライブラリーから単離したセルロース誘導能欠損株において，dipeptidyl peptidase IV (*dpp IV*) 遺伝子が破壊されていることを見いだした。これまでに，*dpp IV* 破壊株 (Δ*dpp IV*) において，cellobiohydrolase I 遺伝子等のアビセルやセロビオースにより誘導される遺伝子の発現に遅延が起こることから, DPP IV がセルロース誘導の制御に関与していることが示された。*A. aculeatus* DPP IV は *A. fumigatus* 及び哺乳類の DPP IV とそれぞれ 67%，31%の相同性を有しており，DPP IV は生物において広く保存された酵素である。哺乳類 DPP IV においては，機能解析が詳細に行われているため，その基質の同定が行われており，細胞の免疫応答，増殖，炎症など生体内の様々な恒常性に関与していることが報告されている。しかし，その他の生物における DPP IV の生理機能に関する解析はほとんど行われていない。そこで，我々は糸状菌における DPP IV の生理機能および作用機序の解明を目的に研究を進めている。
【方法及び結果】哺乳類 DPP IV は，ペプチドホルモンの N 末端側から 2 番目の Pro または Ala の C 末端側を切断することで様々なシグナル伝達を制御している。そこで，コントロール株，Δ*dpp IV*，*dpp IV* 高発現株 (*dpp IV*-OE) における DPP 活性を Gly-Pro-*p*NA を基質に用いて測定した。その結果，*dpp IV*-OE の菌体から抽出したタンパク質において有意に DPP 活性が上昇していたことから，*A. aculeatus* DPP IV が DPP 活性を有していることが示された。
哺乳類 DPP IV の多様な機能から，糸状菌 DPP IV がセルロース誘導だけでなく様々な応答に関与している可能性を検証するため，今回は糸状菌におけるストレス応答に着目し，種々のストレス条件下においてコントロール株，Δ*dpp IV*，*dpp IV*-OE の生育を観察した。pH の変化 (pH 4，pH 6.5，pH 8)，炭素源や窒素源の変更，1.5 M スクロースまたは 0.5 M NaCl を培地に添加した培養では生育に大きな変化は見られなかった。しかし，10 mM の過酸化水素を培地に添加した酸化ストレス条件下では，コントロール株, *Δdpp IV* が生育しなかったのに対し，*dpp IV*-OE は生育した。また，酸化剤として 0.06 mM のメナジオンを培地に添加した場合も同様に *dpp IV*-OE は酸化ストレス耐性を示したことから，DPP IV が酸化ストレス応答に関与していることが示唆された。現在はコントロール株，*dpp IV*-OE において，酸化ストレスに応答する遺伝子の発現解析などを行っている段階である。

dipeptidyl peptidase, stress response, Aspergillus

講演番号：2B41p08
講演日時、会場：3 月 27 日 15:27～ B 校舎 41 会場

超好熱菌 *Thermococcus kodakarensis* 低温誘導機構
Induction mechanism of cold-stress inducible genes in *Thermococcus kodakarensis*
○西川 諒[1]、籠谷 さやか[1]、Sahara Tatit Novi[1]、秀瀬 涼太[1]、今中 忠行[2]、藤原 伸介[1] ([1]関学大院理工、[2]立命館大生命科学)
○Ryo Nishikawa[1], Sayaka Kagotani[1], Tatit Novi Sahara[1], Ryota Hidese[1], Tadayuki Imanaka[2], Shinsuke Fujiwara[1] ([1]Grad. Sch. Sci. Tec. Kwansei-Gakuin Univ., [2]Dept. Biotechnol. Life Sci.Ritsumeikan Univ.)

【研究目的】超好熱菌アーキアの *Thermococcus* 属は類縁菌である *Pyrococcus* 属に比べ、低い温度でも生育する。*Thermococcus kodakaraensis* には *Pyrococcus* 属にはない多くのオルソログが存在し、そのいくつかは低温ストレス下で特異的に誘導される。これら低温誘導型遺伝子は低温ストレス下での適応に重要な役割を果たすと考えられている。*T. kodakarensis* の低温誘導型 RNA ヘリカーゼ（TK0306）では SD 配列から開始コドンまでに存在するアデニンに富む領域が制御領域であるが、アデニンに富む領域が、他の低温誘導型遺伝子の誘導に関与しているかは不明である(1)。本研究では低温誘導型遺伝子の制御領域を精査し、低温誘導の一般的機構の解明を目指した。
【結果と考察】*T. kodakarensis* の 60℃（低温）で高発現する低温誘導型遺伝子をマイクロアレイ解析でスクリーニングし、候補遺伝子 54 個中、低温誘導性の高いものから 23 個の遺伝子の低温誘導性を qRT-PCR で確認した。このうち 19 遺伝子で低温誘導が確認され、これら遺伝子群の制御領域を比較したところ、RNA ヘリカーゼ（TK0306）と同様に、SD 配列から開始コドンまでの間にアデニンまたはチミンが連続した配列が 19 遺伝子全てに存在した。超好熱性アーキアでは連続するチミンの配列は、転写終結領域（ターミネーター）として機能することが報告されている(2)。SD 配列から開始コドンまでの間に存在する連続したアデニンの数が少ない配列 （AAAA など）は、温度が高くなるとターミネーターとして機能するが、低い温度では合成された mRNA は DNA から遊離せず、転写終結が起こらないと予想される(3)。低温誘導性のシャペロニン遺伝子 *cpkA*（TK0678）にも SD 配列から開始コドンまでにアデニンとチミンの連続配列(AAT)が存在する。そこで、この領域に着目し、耐熱性カタラーゼをレポーターとする実験系を用いて詳細に解析した。*cpkA* の開始コドンまでに存在する AAT をグアニンの連続配列（GGG）に置換したところ、低温誘導性が消失した。このことから、*cpkA* の低温誘導には SD 配列から開始コドンまでの間に存在する制御配列が重要であることが明らかとなった。アデニンとチミンによる不安定な水素結合の連続が、高温で premature termination を引き起こし、高温では発現しなくなる。その結果として低温での特異的発現が導かれていると考えられる。
(1) Nagaoka, E. *et al.*, J.Bacteriol., 195, 3442-3450 (2013)
(2) Santangelo, T.J., *et al.*, J.Bacteriol., 191, 7102–7108 (2009)
(3) 藤原伸介　化学と生物 52, 714-715 (2014)

archaea, hyperthermophile, cold-inducible

講演番号：2B41p09
講演日時、会場：3 月 27 日 15:38～ B 校舎 41 会場

病原糸状菌 *Aspergillus fumigatus* の胞子トランスクリプトーム解析から明らかになった低温培養着生胞子に特異的な二次代謝遺伝子クラスター

Transcriptome analysis revealing a secondary metabolism gene cluster specifically expressed in *Aspergillus fumigatus* conidia harvested from low temperature culture

○萩原 大祐、酒井 香奈江、亀井 克彦、五ノ井 透、川本 進（千葉大学 真菌センター）
○ Daisuke HAGIWARA, Kanae SAKAI, Katsuhiko KAMEI, Tohru GONOI, Susumu KAWAMOTO (Chiba Univ.)

Aspergillus fumigatus は日和見感染症であるアスペルギルス症の主要原因菌で、胞子の吸引が主な感染ルートである。したがって、本菌に因る感染機構を理解する上で、胞子の生物学的な性質を良く理解する必要がある。特に我々は、胞子着生時の環境条件がストレス耐性や病原性などの特性に影響を及ぼすかに興味があり、本発表では異なる培養温度の影響に着目した。

本菌を 25℃で培養して採集した胞子（25℃胞子）は、至適温度 37℃培養で得られた胞子（37℃胞子）に比べて、濃い灰緑色を呈した。また、25℃胞子は UV 照射に対して高い耐性を示したことから、胞子表層のメラニン量の増加が推測された。

培養温度による胞子特性への影響をゲノムワイドに理解するために、胞子内の mRNA から RNA-sequencing によるトランスクリプトーム解析を行った。その結果、１）37℃の培養において菌糸と胞子とで比較すると 1079 遺伝子が胞子特異的な発現を示した。２）メラニン合成系遺伝子群の発現が 25℃胞子で顕著に高い値を示し、前述のメラニン蓄積量増加の推測を支持した。また、３）25℃胞子で特異的に発現している新規な二次代謝遺伝子クラスターを見出した。

この低温培養で得られた胞子に特異的なクラスターには、ポリケタイド合成酵素遺伝子（*pks*）、および *A. flavus* のアフラトキシン合成制御因子 AflR、AflS とそれぞれ相同性のある C6 型転写因子（AfAflR）、レギュレーター（AfAflS）が含まれており、転写制御機構および生成産物について興味が持たれた。そこで、上記因子の遺伝子破壊株を作製して 25℃胞子特異的な本クラスターの発現解析をリアルタイム PCR 法により行った。その結果、25℃胞子における *pks* 遺伝子の発現が *AfaflR* および *AfaflS* 遺伝子破壊株では低減しており、これら２つの制御因子が重要であることが示された。現在、AfAflR および AfAflS が *pks* 以外の遺伝子の発現制御へ関与するか否か、さらには、本クラスターから生産される二次代謝産物の特定を進めており、低温培養着生胞子の生理的な特性について併せて考察する予定である。また、*A. flavus* のアフラトキシン合成クラスターとの相同性についても、進化的な視点から考察したい。

conidia, secondary metabolism gene cluster, Aspergillus

講演番号：2B41p10
講演日時、会場：3 月 27 日 15:49～ B 校舎 41 会場

Shewanella oneidensis の電位応答のトランスクリプトーム解析
Transcriptomic responses to electrode potentials of *Shewanella oneidensis*
○廣瀬 篤弥、高妻 篤史、渡邉 一哉（東京薬科大生命科学）
○Atsumi HIROSE, Atsushi KOUZUMA, Kazuya WATANABE (Tokyo Univ. Pharm. Life Sci.)

【目的】*Shewanella oneidensis* MR-1 株は細胞外電子伝達能を有する異化的金属還元細菌であり，微生物燃料電池（MFC）における電流生成メカニズムを解明するためのモデル微生物として広く研究されている。MR-1 株等の電流生産菌は，細胞内の有機物代謝に伴って放出された電子を細胞内膜および外膜に局在する電子伝達系を介して電極に伝達することにより電流を生産する。この微生物が生産する電流は電極電位によって変動することが知られており，電極電位が微生物の代謝に様々な影響を及ぼすと考えられている。しかし，電極電位の変化に対して電流生成菌がどのように応答するかについては不明である。そこで本研究では，電極電位の変化に対する遺伝子発現応答を明らかにするため，*S. oneidensis* MR-1 株を異なる電極電位に設定した電気化学セルにおいて培養し，そのトランスクリプトーム変化を DNA マイクロアレイにより解析した。
【方法】150 ml の三電極一槽式電気化学セル（作用極: グラファイトフェルト，対極: 白金線，参照極: Ag/AgCl 電極）に MR-1 株を植菌後，ポテンショスタットを用いて電極電位を 0 V（vs Ag/AgCl）に設定し，乳酸を基質として培養を開始した。電流値が安定した後，電極電位を高電位（+0.3 V），または低電位（-0.3 V）に変更し，さらに 2 時間培養した。その後作用極に付着した菌体から RNA を抽出して DNA マイクロアレイ解析を行い，2 倍以上の発現変動を示した遺伝子（高電位 vs 低電位，n=6，$p < 0.05$）を抽出した。
【結果】低電位条件下と比較して，高電位条件下では NADH デヒドロゲナーゼ（*nuo*），ATP 合成（*atp*），乳酸代謝（*dld*-II，*lldP*），及びギ酸代謝（*fdhA*-2~*C*-2，*fdhG*~*I*）遺伝子の発現量が増加しており，一方でシトクロム c（*cco0*，*ccoP*）やギ酸代謝の一部の遺伝子（*fdh*A-1，*fdh*B-1）の発現量が減少していた。このことから，高電位条件下では乳酸を起点とする炭素代謝系が活性化し，持続的な電流量の増加につながっていること，また MR-1 株には電極電位に応答し，転写を制御する機構が存在することが示唆された。大腸菌では細胞内の酸化還元状態を認識，制御する機構として Arc 二成分制御系が知られており，*S. oneidensis* にもそのホモログが見出されている。有意な発現変動を示した遺伝子のなかにはその上流に Arc system の response regulator である ArcA の結合配列を持つものが含まれているため，現在 Arc system の欠損株を用いて同様の解析を行い，Arc system と電位応答性の関係について検証を進めている。

shewanella, microbial fuel cell, transcriptome

講演番号：2B41p11
講演日時、会場：3 月 27 日 16:10～ B 校舎 41 会場

メタノール酵母における 2 つの細胞表層ストレスセンサーの生理機能

Physiological function of two cell surface stress sensors in methylotrophic yeast

○大澤 晋、由里本 博也、阪井 康能（京都大院農・応用生命科学）
○Shin OHSAWA, Hiroya YURIMOTO, Yasuyoshi SAKAI (Kyoto Univ.)

【目的】メタノール資化性酵母はメタノールによって特異的かつ強力に誘導されるプロモーターを有しており、異種遺伝子高発現のための宿主として利用される。我々はこのメタノール誘導性プロモーターを用いた有用タンパク質生産ならびに、メタノール誘導性遺伝子発現に関連する転写制御因子についての研究を進めている。一方、メタノール誘導性に関わるシグナル伝達に関してはまったく研究が進んでいなかった。我々は、出芽酵母においてストレスセンサーとして知られる Wsc ファミリータンパク質のメタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* におけるホモログ(PpWsc1, PpWsc2)がメタノール誘導性遺伝子発現に関連していることを明らかにした。しかしながら、*Ppwsc1*Δ株においては、メタノール培地での生育ならびにメタノール遺伝子発現量が顕著に低下するが、*Ppwsc2*Δ株においてはそのような表現型が見られない。そこで、本研究では、メタノール資化性酵母がメタノール誘導性遺伝子発現に関連する Wsc ファミリータンパク質を 2 種類もつ生理的意義の解明を目的とした。

【方法・結果】メタノール資化性酵母 *P. pastoris* の *Ppwsc1 Δ Ppwsc2 Δ* 二重破壊株に *PpWSC1*、*PpWSC2* をそれぞれ過剰発現させた株を作製した。この株において各種メタノール濃度でのメタノール誘導性遺伝子の転写量を測定したところ、PpWsc1 過剰発現株では低濃度(0.025%)メタノールで転写量が最大となり、一方、PpWsc2 過剰発現株では高濃度(0.25%)で最大となった。このことから、PpWsc1 が低濃度、PpWsc2 がより高濃度のメタノール培地におけるメタノール誘導性遺伝子発現制御に役割をもつことが示唆された。次に、ストレスセンサーとしての役割について検討するため、*Ppwsc1*Δ株と *Ppwsc2*Δ株の高温ストレス条件下における生育を調べた。高温(36 ˚C)グルコース培地では、*Ppwsc1*Δ株、*Ppwsc2*Δ株どちらの株においても同等の生育低下が見られたため、PpWsc1、PpWsc2 ともに高温ストレスセンサーとしての機能を持つことが明らかとなった。一方、高温メタノール培地では *Ppwsc2*Δ株は *Ppwsc1*Δ株よりさらに生育が低下した。これらのことから、PpWsc2 は高温条件下におけるメタノール培地での生育により重要な役割をもつことが示唆された。

Wsc family proteins, methanol-inducible gene expression, Pichia pastoris

講演番号：2B41p12
講演日時、会場：3 月 27 日 16:21～ B 校舎 41 会場

メチロトローフ酵母における転写因子 Hap 複合体の分子機能解析

Analysis of molecular function of transcription factor Hap complex in the methylotrophic yeast

○小田 沙織、由里本 博也、阪井 康能（京大院農）
○Saori ODA, Hiroya YURIMOTO, Yasuyoshi SAKAI (Kyoto Univ.)

【目的】メチロトローフ酵母は、メタノールによって強力に誘導される遺伝子プロモーターを有しており、異種遺伝子発現系の宿主として広く利用されている。しかしながら、メタノール誘導性遺伝子発現の分子機構については不明な点が多い。我々はこれまでに、メチロトローフ酵母 *Candida boidinii* においてメタノール誘導を制御する因子として、CbHap2p、CbHap3p、CbHap5p を同定した。Hap2p、Hap3p、Hap5p は真核生物で広く保存された Hap 複合体の構成因子であり、出芽酵母においては Hap4p とともに複合体を形成して呼吸代謝関連遺伝子の発現を活性化することが知られている。一方、我々のこれまでの研究により、*C. boidinii* において CbHap2p、CbHap3p、CbHap5p がメタノール誘導性遺伝子発現を制御する転写因子であることが示唆されている。Hap2p、Hap3p、Hap5p は遺伝子発現活性化に先立ってヘテロトリマーを形成することが知られているため、本研究では CbHap2p、CbHap3p、CbHap5p の間の相互作用について調べた。

【方法と結果】まず、*Cbhap2Δ* 株もしくは *Cbhap5Δ* 株における CbHap3p-YFP の細胞内局在を蛍光顕微鏡で観察した。その結果、野生株では核に局在する CbHap3p が *Cbhap5Δ* 株において細胞質に拡散していた。このことから CbHap3p が CbHap5p 依存的に核に輸送されることがわかった。また、同じ株を用いてクロマチン免疫沈降(ChIP)を行い、CbHap3p のメタノール誘導性遺伝子プロモーターへの結合を調べた。その結果、*Cbhap2Δ* 株と *Cbhap5Δ* 株両方において CbHap3p の遺伝子プロモーターへの結合が見られなくなった。以上の結果より CbHap2p、CbHap3p、CbHap5p の核局在や DNA 結合に相互依存性があることが示され、これは CbHap2p、CbHap3p、CbHap5p が複合体を形成するためであると考えられた。そこで、これらの因子が複合体を形成するかどうかを明らかにするために、免疫沈降を行った結果、CbHap2p と CbHap3p、および CbHap3p と CbHap5p が共沈することがわかった。以上の結果より、*C. boidinii* において CbHap2p、CbHap3p、CbHap5p が複合体を形成してメタノール誘導性遺伝子発現を制御することが明らかとなった。

Candida boidinii, Hap complex, methanol-inducible gene expression

講演番号：2B41p13
講演日時、会場：3 月 27 日 16:32～ B 校舎 41 会場

転写産物の安定化によるモノカルボン酸輸送体遺伝子 JEN1 のグルコース抑制の遅延

Delay in a glucose repression of monocarboxylic acid transporter gene JEN1 by stabilization of its mRNA

○竹越 祐太郎、松本 耕助、五味 勝也、新谷 尚弘（東北大院農）
○Yutaro TAKEKOSHI, Kousuke MATSUMOTO, Katsuya GOMI, Takahiro SHINTANI (Tohoku Univ.)

出芽酵母のモノカルボン酸輸送体 Jen1 は、乳酸やピルビン酸の取り込みを担っている。発酵性炭素源の存在によって *JEN1* 遺伝子の遺伝子発現は抑制されているが、発酵性炭素源の枯渇によりその発現は脱抑制される。一方で、発酵性炭素源の再添加により *JEN1* 遺伝子の転写抑制が起こるとともに、細胞膜上に局在する Jen1 は速やかに分解されることが知られている。

出芽酵母遺伝子破壊株ライブラリーの網羅的スクリーニングの結果、転写調節複合体 Ccr4-Not 複合体の構成タンパク質である Ccr4、Caf1、Not4 の欠損株において、グルコースに応答した Jen1 量の減少が抑制されることが示された。これらの株において Jen1-GFP を発現させ、蛍光顕微鏡観察及びウェスタンブロット解析を行ったところ、*not4Δ*株においてグルコース添加後に Jen1-GFP は液胞への局在以外に、細胞質にドット状の局在を示し、加えて Jen の減少速度の低下が観察された。一方、*ccr4Δ*株、*caf1Δ*株においてグルコース添加後の Jen1 の液胞への輸送に異常はみられなかった。翻訳阻害剤を用いたウェスタンブロット解析の結果、*ccr4Δ*株、*caf1Δ*株ではグルコース添加後も Jen1 の発現が持続していることが示唆された。Ccr4 タンパク質のヌクレアーゼ活性の活性中心である 556 番目のグルタミン酸と 713 番目のアスパラギン酸に変異を導入した $Ccr4^{E556A/D713A}$-9myc タンパク質発現株を作製し Jen1 減少の解析を行ったところ、*ccr4Δ*株、*caf1Δ*株と同様の Jen1 減少遅延が観察された。このことから、Ccr4、Caf1 が寄与する mRNA の脱アデニル化活性の欠失により、グルコース添加後も Jen1 の発現が持続するために Jen1 の減少が遅延していることが示唆された。ノーザンブロット解析の結果、*ccr4Δ*株、*caf1Δ*株、$Ccr4^{E556A/D713A}$-9myc 株、*not4Δ*株においてグルコース添加後の *JEN1* mRNA の半減期が増加していたことから、これら 3 つのタンパク質は *JEN1* mRNA の安定性に関与していることが明らかとなった。

Not4 は複数のリン酸化部位をもつことが知られているが、発酵性炭素源の有無により制御されるリン酸化部位がいくつかあることが本研究の中で明らかとなった。これらのリン酸化部位は、発酵性炭素源の枯渇後 10 分でリン酸化が誘導され、発酵性炭素源の添加後 4 分で脱リン酸化が起こる。

現在は、Jen1 の発現における mRNA の安定性と翻訳効率の関係について、ターミネーターの違いが及ぼす影響と、Not4 のリン酸化と Jen1 の減少遅延との関係について解析中である。

Ccr4-Not complex, mRNA stability, terminator

講演番号：2B41p14
講演日時、会場：3 月 27 日 16:43～ B 校舎 41 会場

光センサー型転写調節蛋白質 LitR の機能に関与するアミノ酸残基の同定とその立体構造の決定
Role of the Semi-Conserved Histidine Residue in the Light-sensing Domain of LitR, a MerR-type Photosensory Transcriptional Regulator
見世 光、丸山 貴史、萩原 健太、上田 賢志、○高野 英晃（日大生資科・生命セ）
Kou MISE, Takafumi MARUYAMA, Kenta HAGIWARA, Kenji UEDA, ○Hideaki TAKANO (Nihon Univ.)

[経緯と目的]
LitR はアデノシル B_{12}(AdoB$_{12}$)を光アンテナ分子として利用する光センサー型転写調節蛋白質であり、グラム陰性およびグラム陽性細菌のカロテノイド合成遺伝子の光依存的な発現制御に関与する。我々はこれまでに高度好熱菌 *Thermus thermophilus* 由来の LitR が AdoB$_{12}$ を要求するリプレッサー蛋白質であり、AdoB$_{12}$ の光分解に基づくリプレッサー機能の不活性化によってカロテノイド合成遺伝子群の発現が開始することを明らかにしてきた。本研究では、好熱菌由来 LitR ファミリーの光感知ドメイン(B_{12}結合ドメイン)に高く保存されている 177 番目と 132 番目のヒスチジン(His^{177} と His^{132})残基の役割および光感知ドメインの立体構造の解明を目的とした。
[方法と結果]
His^{177} は B_{12} 結合ドメインに共通した保存アミノ酸残基である。His^{177} をアラニンに置換した LitR$_{H177A}$ 変異を有する *Thermus* 形質転換体は明と暗の両条件下において構成的なカロテノイド生産を示した。生化学的手法により LitR$_{H177A}$ 組み換え蛋白質と AdoB$_{12}$ の相互作用を解析したが、両分子間の相互作用は認められなかった。また、ビアコアを用いた解析により LitR$_{H177A}$ の DNA 結合活性は極めて低いことが判明した。これらの結果より、His^{177} は AdoB$_{12}$ との相互作用に必須なアミノ酸残基であり、その変異による DNA 結合活性の消失は AdoB$_{12}$ 結合能欠損による二次的な効果であることが予想された。
His^{132} は好熱菌由来 LitR に特異的に保存されたアミノ酸残基である。LitR$_{H132A}$ 置換変異を有する *Thermus* 形質転換体は明条件において低レベルのカロテノイド生産を示した。本変異によって LitR に光耐性が付与されたことが予想され、実際に光照射された LitR$_{H132A}$ 蛋白質は野生型より明らかに高い DNA 結合活性を有していた。光照射された野生型 LitR は４量体から単量体に解離するが、LitR$_{H132A}$ は光を照射されても４量体つまり暗状態に近い分子量を有していた。この結果は His^{132} が暗状態から明状態への機能変化に関わる重要なアミノ酸残基であることを強く示唆している。
X 線結晶構造解析により、光感知ドメインの立体構造を 2.52 Å の分解能で決定した(PDB code:3WHP)。得られた構造は AdoB$_{12}$ の光分解物であるヒドロキソコバラミンとの複合体であったことから、明状態の構造であることが強く示唆された。本構造はメタン生成アーケア由来のコリノイド蛋白質と高い類似性を示した。本構造において、His^{177} と His^{132} がヒドロキソコバラミンの近傍に存在していたことは、LitR の機能に重要なアミノ酸残基であることを強く示唆している。

LitR, Thermus, Vitamin B12

講演番号：2B41p15
講演日時、会場：3 月 27 日 16:54～ B 校舎 41 会場

Burkholderia multivorans における光誘導的な遺伝子発現に関わる ECF 型シグマ因子の役割
Role of an ECF sigma factor involved in light-induced gene expression in *Burkholderia multivorans*
○角 悟、上田 賢志、高野 英晃（日大生資科・生命セ）
○Satoru SUMI, Kenji UEDA, Hideaki TAKANO (Nihon Univ.)

［目的］*Burkholderia multivorans* ATCC 17616 は芳香族化合物群の高い分解能を持つグラム陰性細菌である。前大会において、我々は本菌が有する MerR 型転写調節蛋白質 BMULJ_5678 がその周辺にコードされている複数の光誘導性蛋白質群（シクロプロパン環脂肪酸合成酵素、光回復酵素、ECF 型シグマ因子、複数の機能未知蛋白質）の発現制御に関わることを報告した。BMULJ_5678 はビタミン B_{12} を光アンテナ分子として要求する光センサーLitR と類似性を有するが、その機能に必要なアンテナ分子は同定されていない。これまでに実施した遺伝学的な解析により、暗条件における光誘導性遺伝子群の転写は BMULJ_5678 の機能によって抑制される一方、明条件下においては BMULJ_5678 機能の不活性化によって、標的遺伝子群の転写が開始することが予想された。本研究では光誘導性遺伝子群に含まれ、RNA ポリメラーゼのプロモーター認識に関わる ECF 型シグマ因子をコードする *BMULJ_5687*（sig^{5687}）の役割を明らかにすることを目的とした。
［結果・考察］*BMULJ_5687* 遺伝子の役割を明らかにするために、薬剤耐性遺伝子の挿入により遺伝子破壊株を作製した。本破壊株における光誘導性遺伝子群の転写解析を行った結果、*BMULJ_5678* や *BMULJ_5687*～*5689* の転写は野生株と同様に光による顕著な促進が認められた。その一方で、光回復酵素をコードする *BMULJ_5675* やシクロプロパン環脂肪酸合成酵素をコードする *BMULJ_5696* などでは明・暗条件下の両条件において転写が認められなかった。これは σ^{5687} が一部の光誘導性遺伝子の発現制御に関与する光ストレス応答性シグマ因子であることを示している。また、光誘導性遺伝子群の転写を誘発する光の波長を特定するため、*B. multivorans* 野生株を青・緑・赤色光照射下において培養し、各条件下における転写レベルを半定量 RT-PCR により解析した。青色光照射は光誘導性遺伝子群の顕著な転写促進を引き起こした一方で、緑あるいは赤色光照射による転写上昇は確認されなかった。この結果は、光誘導性遺伝子群の転写が青色光によって特異的に誘導されることを示している。このことから、本菌の光応答メカニズムは次のような 2 段階の制御機構であることが予想された。暗条件では、光誘導性遺伝子群の転写は BMULJ_5678 産物によって抑制されるため、遺伝子発現は起こらない。青色光が照射されると未知のアンテナ分子による受光を介して BMULJ_5678 蛋白質のリプレッサー機能が不活性化され、*BMULJ_5678* や *BMULJ_5687*～*5689* の転写が開始する。そこで産生された σ^{5687} を含む RNA ポリメラーゼホロ酵素が光回復酵素やシクロプロパン環脂肪酸合成遺伝子群の転写を特異的に開始する。

light, sigma factor, *Burkholderia*

講演番号：2B41p16
講演日時、会場：3 月 27 日 17:15～ B 校舎 41 会場

Streptomyces griseus 由来 small non-coding RNA の過剰発現は異種 *Streptomyces* 属放線菌の増殖の低下と二次代謝の活性化を引き起こす
Overexpression of the *Streptomyces griseus* small non-coding RNA *sgs4827* in other *Streptomyces* induces growth defect and activates secondary metabolism
○手塚 武揚、大西 康夫（東大院農生科・応生工）
○Takeaki Tezuka, Yasuo Ohnishi (Univ. of Tokyo)

small non-coding RNA (sRNA) は原核生物に広く存在する遺伝子発現制御因子であるが、放線菌における sRNA についてはこれまでにほとんど報告されていない。我々は過去の研究で放線菌 *Streptomyces griseus* のゲノム配列上の *SGR4826-copA1* の遺伝子間領域に *Streptomyces* 属で高度に保存された配列（*sgs4827* と命名）を見いだした。本研究では、この保存配列中に sRNA 遺伝子がコードされていると予想し、機能解析を行った。ノーザン解析を行ったところ、この保存領域から 3 種の転写産物（長いものから SL、SM、SS とする）が検出された。転写領域全体を欠失させた変異株を作製したが、表現型に変化は見られなかった。各転写産物の 5′末端と 3′末端を S1 mapping 法で決定し、SL のプロモーターと予想される配列に変異を導入したところ、予想通り SL が検出されなくなった一方、SM と SS の転写産物量に変化はなかった。次に、SM のプロモーターと予想される配列に変異を導入したところ、SL の転写産物量に変化はなかったが、SM と SS が検出されなくなった。以上より SL と SM は一次転写産物であり、SS は SM がプロセシングされて生じる二次転写産物であることが明らかになった。高コピー数ベクターを用いて *sgs4827* を *S. griseus*、*S. coelicolor* A3(2)、*S. lividans* に導入したところ、*S. griseus* では形態分化の促進が観察された一方、*S. coelicolor* A3(2)と *S. lividans* では増殖速度の低下、色素生産の活性化、形態分化の抑制という多面的な影響が観察された。SM のプロモーターに変異を導入するとこれらの表現型は観察されなかったことから、SM または SS（またはその両方）が sRNA として機能していると考えられた。

Streptomyces, small non-coding RNA, secondary metabolism

講演番号：2B41p17
講演日時、会場：3 月 27 日 17:26～ B 校舎 41 会場

希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* における胞子形成制御遺伝子 *ssgM* の機能解析

Functional analysis of *ssgM* that regulates sporulation in *Actinoplanes missouriensis*

○安久都 卓哉、手塚 武揚、大西 康夫（東大院農生科・応生工）
○Takuya AKUTSU, Takeaki TEZUKA, Yasuo OHNISHI (Tokyo Univ.)

【背景・目的】希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* は菌糸生長による栄養増殖を行うが、栄養飢餓状態におかれると、基底菌糸から胞子嚢柄を伸ばし、その先に多数の運動性胞子を内部に含む胞子嚢を形成する。SsgA-like proteins（SALPs）は放線菌のみがもつ、約 15 kDa の酸性タンパク質である。*Streptomyces* 属放線菌では、アミノ酸配列で 30～40%程度の相同性をもつ 5～7 個程度の SALPs が、隔壁位置の標識と隔壁形成誘導、胞子細胞壁の形成と分割といった胞子形成の各段階の制御にそれぞれ関わっていることが報告されている。しかし、完全長ゲノムが解読された *Actinoplanes* 属放線菌 4 種は、いずれもゲノム上に SALP 遺伝子を 1 つしかもたない。そのため、*Actinoplanes* 属放線菌では、*Streptomyces* 属放線菌とは胞子形成制御機構に多くの相違点が存在する可能性が高いと考えられる。系統樹解析の結果から、*A. missouriensis* ゲノム上に唯一存在する SALP 遺伝子 AMIS_65300 を *ssgM* と名付け、その機能の解明を本研究の目的とした。なお、以前に我々の研究グループで行った RNA-Seq 解析では、*ssgM* は培養 1 日目の菌糸生育期と比べ培養 3 日目の胞子嚢形成期に、転写量が約 130 倍と飛躍的に増加することが明らかになっており、*ssgM* が胞子形成に関与することが強く示唆されていたことも、*ssgM* に注目した理由である。

【結果】*ssgB* 遺伝子破壊株を in-frame deletion により作製した。この遺伝子破壊株を栄養増殖培地および胞子嚢形成培地に植えて菌糸の生育と胞子嚢の形成を観察したが、野生株との違いは見られなかった。しかし、胞子嚢形成培地に胞子嚢開裂を誘導するバッファーを重層し、重層液中に放出された運動性胞子を顕微鏡下で観察したところ、野生株では重層液中に多く見られる運動性胞子が *ssgM* 遺伝子破壊株では全く観察できなかった。走査型電子顕微鏡で胞子嚢の形態を詳しく観察したところ、野生株と異なり、胞子嚢柄が細長く伸長し、運動性胞子を内包していないと見られる異常な形態の胞子嚢が多数観察された。*Streptomyces* 属放線菌においては *ssgA* あるいは *ssgB* 遺伝子を破壊すると、胞子の形成が行われなくなることから、*A. missouriensis* の *ssgM* 遺伝子破壊株においても胞子嚢内部で胞子形成が正常に進行していない可能性が考えられる。今回の結果により、*Streptomyces* 属以外の放線菌においても、SALP は胞子形成を行う上で必須な役割を担っていることが示された。

Actinoplanes missouriensis, spoluration, SsgA-like protein

講演番号：2B41p18
講演日時、会場：3 月 27 日 17:37～ B 校舎 41 会場

放線菌 *Actinoplanes missouriensis* の胞子嚢開裂に必要な遺伝子の RNA-Seq 解析による探索
RNA-Seq analysis to search for genes involved in the sporangium dehiscence in *Actinoplanes missouriensis*

○安田 理沙、毛利 佳弘、手塚 武揚、大西 康夫（東大農）
○Risa YASUDA, Yoshihiro MOURI, Takeaki TEZUKA, Yasuo OHNISHI (The Univ. of Tokyo)

放線菌 *Actinoplanes missouriensis* は原核生物でありながら非常に複雑な形態分化を行う菌の１つである。本菌は菌糸生長により栄養増殖を行うが、栄養飢餓状態に置かれると内部に数百の胞子を内包した胞子嚢を形成し休眠状態に入る。外界からの特定のシグナルを感知すると休眠状態から覚醒し、胞子嚢壁が破れて内部の胞子が放出される。本研究は *A. missouriensis* の胞子嚢開裂機構の解明を目的とする。本研究により細菌における休眠と覚醒についてこれまでに知られていない新規な分子メカニズムを明らかにできると期待している。

これまでに実施した研究の結果から、胞子嚢開裂には次の 2 つのステップがあることがわかっている。(1) 胞子嚢外壁が透明になる、(2) 胞子嚢が膨張し外壁が破れ内部の胞子が放出される。各種の阻害剤を用いた実験から、(1) では成熟胞子嚢内に蓄積していた mRNA からのタンパク質の翻訳が速やかに行われ、(2) に進行するためには更にゲノム DNA からの転写が必要であることが示唆されている。また、(1) にはプロテアーゼ活性が必須であることが分かっている（2014 年度本大会発表）。しかし各ステップで働く遺伝子はこれまで不明であった。

開裂時特異的に発現する遺伝子の同定のため、本研究では 2 種類の RNA-Seq 解析を行った。第一の解析では、(1) において働く遺伝子を同定するため、形成途中および成熟した胞子嚢における mRNA プロファイルを比較した。胞子嚢は培養 3 日目に形成され始め、培養 1~2 週間ほどで成熟することから、培養 1、3、6、40 日目の 4 点で RNA-Seq 解析を行った。(1) に必要なプロテアーゼをコードする mRNA が成熟胞子嚢特異的に蓄積していると予想し、培養 3 日目に対して培養 40 日目で転写産物量が 2 倍以上増加しているプロテアーゼ遺伝子を探索したところ、9 個見出された。

第二の解析では、(1) および (2) において働く遺伝子の同定のため、開裂段階の異なる胞子嚢の mRNA プロファイルを比較した。胞子嚢は開裂条件におかれると 10~20 分ほどで外壁が透明になり、40~50 分ほどで外壁が破れて胞子が放出されることから、未開裂の胞子嚢、開裂初期段階として開裂開始から 15 分後の胞子嚢、開裂終了段階として開裂開始から 120 分後の胞子嚢（放出された胞子）の 3 種を比較した。開裂時特異的に転写が活性化される遺伝子として、未開裂の胞子嚢に対して開裂初期段階の胞子嚢で転写産物量が 10 倍以上上昇し、かつ開裂初期段階に対して開裂終了段階では転写産物量が 10 分の 1 以下に減少している遺伝子が 94 個検出された。現在これらの RNA-Seq 解析で見出された遺伝子の破壊株を作製しており、その表現型についても発表する予定である。

actinomycete, exiting dormancy, RNA sequence

講演番号：2B41p19
講演日時、会場：3 月 27 日 17:48～ B 校舎 41 会場

放線菌 *Streptomyces rochei* における抗生物質生産制御カスケードの解析
Analysis of the regulatory cascade for antibiotic production in *Streptomyces rochei*
○岩國 美由季、鈴木 敏弘、佐々木 浩晃、山本 章治、木梨 陽康、荒川 賢治（広島大院・先端研）
○Miyuki IWAKUNI, Toshihiro SUZUKI, Hiroaki SASAKI, Shouji YAMAMOTO, Haruyasu KINASHI, Kenji ARAKAWA (Hiroshima Univ.)

Streptomyces rochei 7434AN4 株の持つ線状プラスミド pSLA2-L 上には、抗生物質ランカサイジン(LC)およびランカマイシン(LM)の生合成遺伝子クラスターがコードされており、その他に *tetR* 型リプレッサー遺伝子 *srrA*, *srrB* や SARP 型アクティベーター遺伝子 *srrY*, *srrZ*、本菌の微生物ホルモン SRB の生合成遺伝子 *srrX* など、抗生物質生産に関わる多くの制御遺伝子が存在している。当研究室では、*srrX*→*srrA*→*srrY*(→LC)→*srrZ*→ LM という抗生物質制御カスケードをすでに明らかにした。本研究では、*srrA*(*orf82*)近傍に位置するリプレッサー遺伝子 *srrB*(*orf79*)に注目し、機能解析を行った。まず、遺伝子発現およびゲルシフト解析により、*srrB* が SrrA の制御下にあり、*srrY* 上流に結合して転写調節を行う可能性が示唆された。さらに *srrB* の抗生物質生産における影響を調べるべく、親株、*ΔsrrA* 株、*ΔsrrB* 株、*ΔsrrAB* 株を 28 ℃で 3 日間 2 L 培養し、ゲル濾過およびシリカゲルクロマトグラフィーによる精製を行い、抗生物質の生産量を比較した。その結果、LC に関して、*ΔsrrA* 株は 1.5 倍、*ΔsrrB* 株は 4.9 倍、*ΔsrrAB* 株は 8.7 倍も高生産していた。また、LM に関しても、*srrB* を破壊した *ΔsrrB* 株、*ΔsrrAB* 株において大量生産が確認された。このことより *srrB* は抗生物質生産を負に制御していることが示唆された。転写量の変化と抗生物質生産量の経時変化についても併せて述べる。

また、LM 生産に関して、SrrY がもう一つの SARP 型アクティベーター遺伝子 *srrZ* の上流領域に結合することで下流の生合成経路を活性化することが明らかとなっているが、LC 生合成経路における SrrY の標的遺伝子は未だ不明であった。そこで、*S.rochei* の抗生物質制御カスケードの全容解明のため、ゲルシフトによる SARP 型アクティベーターの標的遺伝子の解析も進めており、本発表ではそれらの経緯についても報告する。

secondary metabolite, regulatory gene

講演番号：2B33a02
講演日時、会場：3 月 27 日 09:11～ B 校舎 33 会場

海洋バイオマス資化酵母の合成生物学的育種

Molecular breeding of yeast for assimilating marine biomass by synthethic biology

○佐々木 勇輔[1,2,3]、高木 俊幸[2,3]、森坂 裕信[2,3]、黒田 浩一[2,3]、植田 充美[2,3]（[1]京大院・総合生存、[2]京大院農・応用生命、[3]JST, CREST）
○Yusuke Sasaki[1,2,3], Toshiyuki Takagi[2,3], Hironobu Morisaka[2,3], Kouichi Kuroda[2,3], Mitsuyoshi Ueda[2,3] ([1]GSAIS (Grad. Sch. Adv. Integ. St.), [2]Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [3]CREST, JST)

[背景・目的] 化石燃料の多大な消費に伴い生じる CO_2 などの因子が、環境に与える影響は気象変動などの異常現象として現れはじめている。また現在我々の生活を支える化石燃料は、シェールオイルなどの活用が考えられる一方で、その埋蔵量が限られており将来的な資源の枯渇も危惧されている。

そのような背景から新たな持続可能なエネルギー源としてバイオマスの活用が必須であり、特に大型藻類などの海洋バイオマスは広大な海域面積を誇る日本にとって自給自足可能で安全保障の面から有望な資源である。その大型藻類は生育が速くかつ安価で大量供給が可能であり、陸上バイオマスで見られるリグニンなどの分解が難しいとされる成分を含まないことからもバイオエネルギーの原料として有望である。

そこで本研究では大型藻類のヘミセルロースの主成分であるキシランからのバイオエネルギーの生産を目的として、海洋微生物である *Saccharophagus degradans*[1]及びソフトバイオマス資化性 *Clostridium cellulovorans*[2]由来のキシラン資化酵素に注目し、我々が開発してきた酵母ディスプレイ法によりデザインした海洋キシラン資化酵母の育種を試みた。

[方法・結果] 我々はこれまでに *C. cellulovorans* 由来キシロースイソメラーゼを世界で初めて細胞表層提示させた酵母株によるキシロースからのバイオエネルギー生産を報告してきた[3]。

本研究では、このキシロースイソメラーゼと共役させる *S. degradans* 及び *C. cellulovorans* 由来のキシラン分解酵素であるキシラナーゼ及びキシロシダーゼを細胞壁アンカータンパク質である α-アグルチニンと融合させ、酵母細胞表層に提示、共役反応させる検討を行った。蛍光抗体染色によりキシラン分解酵素らの提示を確認した後、キシラン及びキシロースオリゴ糖を基質とした酵素反応を行い、DNS assay による還元糖の定量や TLC による糖の分離・検出によって活性測定を行った。その結果、キシラン分解活性を有する酵母株が確認された。さらに、酵素の共役による海洋バイオマス関連の多糖類からのバイオエネルギー生産の検討を試みたので報告する[4]。

[1] T.Takagi *et al*., submitted.
[2] Y.Tamaru *et al., Microb. Biotechnol.*, 4, 64-73 (2011)
[3] M.Ota *et al*., *Biotechnol. Prog.*, 29, 346-351 (2013)
[4] Y.Sasaki *et al*., submitted.

Yeast, marine biomass, bioenergy

講演番号：2B33a03
講演日時、会場：3 月 27 日 09:22～ B 校舎 33 会場

シュガープラットホーム創製に向けた *Clostridium cellulovorans* の分子育種
Molecular breeding of *Clostridium cellulovorans* for establishment of sugar platform
○稲森 貴子、石高 彰人、油屋 駿介、森坂 裕信、黒田 浩一、植田 充美（京大院農）
○Takako INAMORI, Akihito ISHITAKA, Shunsuke ABURAYA, Hironobu MORISAKA, Kouichi KURODA, Mitsuyoshi UEDA (Kyoto Univ.)

【背景・目的】
現在の石油依存型社会からの脱却に向けて、オイルリファイナリーからバイオリファイナリーへの変換に向けた取り組みが喫緊の課題となっている。そこで、非可食バイオマスを資源として効率よく単糖にまで分解する手法を確立する必要がある。中温絶対嫌気性菌 *Clostridium cellulovorans* は菌体外にセルロソームと呼ばれる酵素複合体を形成することで、ソフトバイオマスのセルロース・ヘミセルロースを効率的に分解することができる[1,2]。そこで、本研究では非可食バイオマスから単糖を生産するシュガープラットホーム創製のために *C. cellulovorans* の分子育種を検討した。

【方法・結果】
C. cellulovorans の単糖生産に対する適性を調べるために多糖やオリゴ糖など、各種の糖での培養を行った。その結果、興味深いことにグルコースやキシロースを優先資化しないことを見出した。この生理的特性は *C. cellulovorans* がシュガープラットホーム創製の基盤となる微生物であることを示している。この性質を利用してシュガープラットホーム創製をめざした研究を行っているので結果をまとめて報告する[3]。

[1] Y. Tamaru *et al., Microb Biotechnol.*, 4, 64-73 (2011)
[2] H. Morisaka *et al*., *AMB Express*, 2, 37 (2012)
[3] T. Inamori *et al*., submitted

Clostridium cellulovorans, sugar platform, biorefinery

講演番号：2B33a04
講演日時、会場：3 月 27 日 09:33～ B 校舎 33 会場

メカノセンシティブチャネル遺伝子のリジン生産菌への導入効果
The effect of introducing gene encoding mechanosensitive channel to lysine producer
○三井 岳志、小西 智之、橋本 賢一、矢部 勇、川崎 寿（東電大・院・工）
○ Takeshi MITSUI, Tomoyuki KONISHI, Kenichi HASHIMOTO, Isamu YABE, Hisashi KAWASAKI (Tokyo Denki Univ.)

【背景および目的】*Corynebacterium glutamicum* は世界中で工業的なグルタミン酸生産に利用されている。この微生物は通常の生育条件ではグルタミン酸を細胞外に蓄積することはないが、ビオチンの制限、Tween 40 の添加、ペニシリンの添加などによりグルタミン酸の過剰生産が誘導される。近年、*NCgl1221* 遺伝子産物の変異(A111V, W15CSLW)により上記のグルタミン酸過剰生産誘導条件でなくても細胞外にグルタミン酸を蓄積すること、この遺伝子を破壊するとグルタミン酸過剰生成条件においてグルタミン酸の蓄積量が抑制されることが報告された(*Appl. Environ. Microbiol.*, **73**, 4491-4498 (2007))。我々はこの遺伝子産物が細胞質膜の張力により開口するメカノセンシティブチャネルであり(*Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **74**, 2546-2549 (2010))、グルタミン酸がこのチャネルを ATP などのエネルギーを使用せず、濃度勾配のみで通過することを明らかにしてきた(*Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **76**, 1422-1424 (2012))。また、我々は微生物パッチクランプの技術を用い、このチャネルがグルタミン酸以外にもアスパラギン酸やフェニルプロピオン酸も通すことを明らかにしてきた。さらに、このチャネルがより開口しやすくなっていると考えられる A111V 変異体、W15CSLW 変異体をフェニルアラニン生産菌(*Escherichia coli* AJ12741)にて発現させると生育とフェニルアラニン生産量の向上が見られた。我々はこのチャネルを多目的な物質排出担体として用いることで、様々な物質の生産性を向上させることができるのではないかと考えている。本研究では、リジン生産菌にメカノセンシティブチャネル遺伝子を導入し、その効果について検討することを目的とした。
【方法及び結果】微生物パッチクランプシステムを用い、*C. glutamicum* 由来 *NCgl1221* 遺伝子産物がプラスのチャージを持つリジンを通過させるか電気生理学的な解析を行ったところ、グルタミン酸などのマイナスのチャージを持つ物質と同様に濃度勾配のみでこのチャネルを通過することが分かった。この結果は *C. glutamicum* 由来 *NCgl1221* 遺伝子産物は基質特異性が低く、様々な物質の排出担体として利用できる可能性を示唆している。リジン生産菌である *E. coli* AJ110692 株に *NCgl1221* 遺伝子の野生型及び変異型（A111V、W15CSLW）を導入し、その効果について報告する。

Corynebacterium glutamicum, Mechanosensitive channel, Lysine

講演番号：2B33a05
講演日時、会場：3 月 27 日 09:44～ B 校舎 33 会場

Corynebacterium alkanolyticum 由来キシロシダーゼとキシロオリゴ糖トランスポーターの機能解析

Functional characterization of *Corynebacterium alkanolyticum* xylosidase and xyloside transporter

○渡邉 彰[1]、平賀 和三[1]、須田 雅子[1]、湯川 英明[1]、乾 将行[1,2] ([1]RITE、[2]奈良先端大・バイオ)
○Akira WATANABE[1], Kazumi HIRAGA[1], Masako SUDA[1], Hideaki YUKAWA[1], Masayuki INUI[1,2] ([1]RITE, [2]NAIST)

【目的】キシランはセルロースに次いでリグノセルロースバイオマスの主要な構成成分である。これまでコリネバクテリウム属においてはキシラン資化性菌の報告はなかったが、我々は界面活性剤生産菌として知られる *Corynebacterium alkanolyticum* がキシロオリゴ糖を炭素源として増殖できることを見出した。そこで本菌からキシロオリゴ糖利用に関与するキシロオリゴ糖トランスポーターとβ-キシロシダーゼ遺伝子の同定と機能解析を目的とした。
【方法と結果】既知のバクテリア由来β-キシロシダーゼ間でよく保存されているアミノ酸配列を基にして縮重プライマーをデザインし、*C. alkanolyticum* のゲノム DNA を鋳型として PCR 法によってβ-キシロシダーゼと高い相同性を示す遺伝子断片を取得した。更に DNA walking 法によって本遺伝子断片を含む約 7kb のゲノム配列を決定した結果、本領域には遺伝子クラスター*xylEFGD* が含まれていた。XylD タンパクは細胞質型β-キシロシダーゼと相同性を示し、XylE、F、G タンパクはそれぞれ sugar ABC トランスポーターの基質結合タンパクと２つの膜貫通サブユニットと相同性を示した。大腸菌で発現・精製した XylD タンパクについて酵素活性測定を行ったところ、既知のβ-キシロシダーゼの中でも比較的高いβ-キシロシダーゼ活性を有していた。またβ-キシロシダーゼは一般的にキシロースによる強い生成物阻害を受けるが、XylD タンパクのキシロースに対する阻害定数（*Ki*）は 67 mM で、一般的なβ-キシロシダーゼの阻害定数（2～10 mM）よりも顕著に大きく、キシロースによる生成物阻害を受けにくいことが明らかとなった。XylEFG タンパクから構成される ABC トランスポーターの機能を同定するため、近縁種である *Corynebacterium glutamicum* に *xylEFGD* 遺伝子クラスターを異種発現させ、キシロオリゴ糖を含んだ培地で培養して培地中のキシロオリゴ糖の減少をモニターした。用いたキシロオリゴ糖にはキシロースユニットが 2～4 のキシロオリゴ糖に加え、これらの側鎖にアラビノースが置換したアラビノキシロオリゴ糖が含まれていた。培養の結果 *xylEFGD* 遺伝子クラスター導入株でキシロオリゴ糖のキシロースへの分解に加え、アラビノキシロオリゴ糖も培地から消失していた。XylEFG はキシロオリゴ糖 ABC トランスポーターとして機能するだけでなく、アラビノキシロオリゴ糖も取り込めるトランスポーターとしては初めての例である。

Corynebacterium alkanolyticum, xylosidase, xyloside transporter

講演番号：2B33a06
講演日時、会場：3 月 27 日 10:05～ B 校舎 33 会場

コリネ型細菌が有するシキミ酸トランスポーターの同定とその発現制御解析
Identification of shikimate transporter of *Corynebacterium glutamicum*
○久保田 健[1]、田中 裕也[1]、竹本 訓彦[1]、平賀 和三[1]、湯川 英明[1]、乾 将行[1,2] ([1]RITE、[2]奈良先端大・バイオ)
○Takeshi KUBOTA[1], Yuya TANAKA[1], Norihiko TAKEMOTO[1], Kazumi HIRAGA[1], Hideaki YUKAWA[1], Masayuki INUI[1,2] ([1]RITE, [2]NAIST)

【目的】シキミ酸は、芳香族化合物の主たる生合成経路であるシキミ酸経路の中間代謝物である。シキミ酸の生合成経路および利用経路についてこれまで多くの研究が行われてきたが、膜を介したシキミ酸の輸送に関する研究は極めて少ない。

アミノ酸等の生産に広く利用される有用工業微生物である *Corynebacterium glutamicum* は最少培地中でシキミ酸を単一の炭素源として増殖可能である。*C. glutamicum* においてシキミ酸を利用するための遺伝子群は解明されているものの、シキミ酸トランスポーターは同定されていなかった。物質生産研究において膜上輸送体の特性を調べることは炭素源利用および生産物輸送の観点から重要である。本研究では *C. glutamicum* が有するシキミ酸トランスポーターを同定し、その発現制御機構について解析を行った[1]。

【方法と結果】大腸菌のシキミ酸トランスポーターのアミノ酸配列を元に *C. glutamicum* の全 ORF に対して相同性検索を行い、高い相同性を示すタンパク質を 6 種抽出した。これらのタンパク質をコードする遺伝子の破壊株を、シキミ酸を単一の炭素源とする最少培地プレートに塗布し増殖を観察したところ、1 つの株のみが増殖しなかった。この遺伝子 *cgR_2523* の相補株は野生株と同等の増殖を示した。シキミ酸を含んだバッファー中に *cgR_2523* の破壊株と過剰発現株をそれぞれ懸濁し、シキミ酸の細胞内蓄積量を経時的に測定した。その結果、破壊株ではシキミ酸は蓄積しなかったのに対し、過剰発現株では顕著なシキミ酸の蓄積が観察された。このことは、シキミ酸の取り込みは主に *cgR_2523* がコードするタンパク質を介して行われていることを強く示唆する。以上から、*cgR_2523* をシキミ酸トランスポーター*shiA* と名付けた。

培養液中にシキミ酸を添加すると *shiA* mRNA の発現が誘導された。染色体上で *shiA* の上流に位置する遺伝子 *cgR_2524* は LysR-type の転写因子をコードしている。この *cgR_2524* の破壊株では *shiA* mRNA はシキミ酸で誘導されず、相補株では誘導を示した。*cgR_2524* がコードするタンパク質を精製し、*in vitro* DNA 結合解析を行ったところ、*shiA* 遺伝子の上流配列に結合した。以上の結果から、*cgR_2524* を *shiA* の転写活性化因子 *shiR* と名付けた。

今回は以上の結果から導き出される、シキミ酸利用経路とその制御機構について考察する。

1) Kubota T., *et. al.*, *Microbiology*, *in press*

major facilitator superfamily, accumulation, regulator

講演番号：2B33a07
講演日時、会場：3 月 27 日 10:16～ B 校舎 33 会場

コリネ型細菌による芳香族化合物前駆体シキミ酸の高生産
Production of shikimic acid as a precursor of aromatic compounds by metabolically engineered *Corynebacterium glutamicum*
○小暮 高久[1]、須田 雅子[1]、平賀 和三[1]、乾 将行[1,2] ([1]RITE、[2]奈良先端大・バイオ)
○Takahisa KOGURE[1], Masako SUDA[1], Kazumi HIRAGA[1], Masayuki INUI[1,2] ([1]RITE, [2]NAIST)

【目的】微生物や植物に存在する芳香族化合物生合成経路上の代謝中間体であるシキミ酸は、様々な医薬、農薬、化成品の合成原料として利用される有用化学物質である。特に近年、新型インフルエンザに対して有効性が示されたタミフルの製造原料としてシキミ酸の需要が高まっている。シキミ酸は植物トウシキミの果実(八角)からの抽出によって得られるが、抽出効率が低く、安定大量供給が困難といった問題が存在する。シキミ酸を安価に大量供給するための代替手法としては、バイオマス原料からの微生物変換によるシキミ酸製造が有望と考えられる。我々はこれまでに、組換え *Corynebacterium glutamicum* を用いた増殖非依存型バイオプロセスによる高効率な有機酸やエタノール、アミノ酸等の生産、及び *C. glutamicum* へのバイオマス由来混合糖利用能の付与について報告してきた。本研究では、*C. glutamicum* の代謝工学的改変による、グルコースやバイオマス由来混合糖からの芳香族化合物前駆体シキミ酸の高効率生産について検討を行った。
【方法と結果】*C. glutamicum* の混合糖利用株を親株とし、シキミ酸生合成経路を強化するとともに、シキミ酸キナーゼをコードする *aroK* 遺伝子の破壊によりシキミ酸の芳香族化合物生合成経路上の代謝変換を抑制することにより、培地中にシキミ酸を蓄積する組換え菌株を得た。該シキミ酸生成株は、ビオチンを添加しない最少培地を用いた増殖非依存的な反応条件において、グルコースからシキミ酸を高濃度生成することを確認した。さらに、シキミ酸の前駆物質であるホスホエノールピルビン酸の供給向上を目的として、該シキミ酸生成株に対し、*ptsH* 遺伝子破壊による PTS (Phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system) 糖輸送経路の遮断、及び非 PTS グルコース利用経路(IolT1 及びグルコキナーゼ)の強化を行った。さらに、律速と考えられた解糖系酵素活性の強化と副生経路の抑制を組み合わせることにより、シキミ酸生産能が顕著に向上した組換え菌株を構築した。当該遺伝子組換え株は、グルコース、キシロース、アラビノースからなる混合糖を炭素源とした反応において、それら混合糖を同時利用するとともに、グルコースを単一炭素源とした場合と同等の効率でシキミ酸を高生産することを確認した。

Corynebacterium glutamicum, shikimic acid, metabolic engineering

講演番号：2B33a08
講演日時、会場：3 月 27 日 10:27～ B 校舎 33 会場

コリネ型細菌による 1,3-ジヒドロキシアセトンを介したグリセロール生成経路の同定

The biosynthetic pathway of glycerol via 1,3-dihydroxyacetone in *Corynebacterium glutamicum*

○城島 透[1]、猪狩 尊史[1]、郡司 渉[1]、茂木 康浩[1]、須田 雅子[1]、湯川 英明[1]、乾 将行[1,2] ([1]RITE、[2]奈良先端大・バイオ)
○Toru JOHJIMA[1], Takafumi IGARI[1], Wataru GUNJI[1], Yasuhiro MOTEKI[1], Masako SUDA[1], Hideaki YUKAWA[1], Masayuki INUI[1,2] ([1]RITE, [2]NAIST)

【目的】微生物の多くは、糖代謝産物としてグリセロールを生成する。グリセロールの生合成経路は酵母において詳細に研究されており、解糖系中間体のジヒドロキシアセトンリン酸（DHAP）からグリセロール３−リン酸を経て、グリセロールへ至る代謝経路が同定されている。一方、多くの細菌もグリセロールを生成するが、その代謝経路に関する知見は非常に限定的である。我々はこれまでに、コリネ型細菌(*Corynebacterium glutamicum*)を用いた増殖非依存型バイオプロセスによる有用物質生産に関する研究開発を進めてきた。当該プロセスは、酸素抑制条件において、増殖は抑制されるが糖代謝機能は維持されるコリネ型細菌の特徴を利用したものであり、非可食バイオマスからのバイオ燃料やグリーン化学品の生産が可能である。コリネ型細菌は、酸素抑制条件において糖から少量のグリセロールを生成する。生産菌株の開発において、副生物の生合成経路に関する知見は、目的物質の収率向上のための重要な情報となる。本研究では、コリネ型細菌のグリセロール生合成経路について検討した結果を報告する。
【方法と結果】コリネ型細菌が 1, 3−ジヒドロキシアセトン（DHA）を生成することから、DHA からのグリセロール生成について検討した。通常、DHA からグリセロールへの変換反応は、グリセロールデヒドロゲナーゼ(GLD)により触媒されるが、当該酵素をコードする遺伝子はコリネ型細菌のゲノムに存在しない。そこで、GLD と類似の反応を触媒する aldo-keto reductase、および butanediol dehydrogenase 遺伝子破壊株についてグリセロール生成を検討したところ、(*S,S*)-butanediol dehydrogenase 遺伝子(*butA*)破壊により顕著にグリセロール生成が低下した[1]。次に DHA 生合成について、DHAP から脱リン酸化酵素の働きにより生成すると仮定し、遺伝子破壊株ライブラリーの中から DHA 生成が抑制される菌株をスクリーニングしたところ、*cgR_2128* 破壊株において顕著に DHA 生成が抑制されることを見出した。また、*cgR_2128* 破壊株では、グリセロールの生成も抑制された。ButA および CgR_2128 の酵素学的性質を検討したところ、ButA は、DHA を NADH 依存的にグリセロールへ変換し、CgR_2128 は、DHAP を脱リン酸化して DHA を生成可能であった。以上の結果より、コリネ型細菌では DHA を介したグリセロール生成経路が機能していると結論し、*cgR_2128* を *hdpA* (haloacid dehalogenase-superfamily phosphatase)と命名した[2]。

1) Jojima T., *et al. Appl. Microbiol. Biotechnol.* in press
2) Jojima T., *et al. FEBS Lett.* **586(23)**, 4228-4232, (2012)

Glycerol, 1,3-Dihydroxyacetone, *Corynebacterium glutamicum*

講演番号：2B33a09
講演日時、会場：3 月 27 日 10:38～ B 校舎 33 会場

カルビン回路の新機能：通性独立栄養細菌 *Ralstonia eutropha* における糖質由来脱炭酸炭素の固定とポリ(3-ヒドロキシブタン酸)生合成への再利用

New insight into the role of Calvin cycle: Reutilization of carbon decarboxylated from sugars for heterotrophic poly(3-hydroxybutyrate) biosynthesis in *Ralstonia eutropha*

清水 理恵[1]、傳寶 雄大[2]、中山 泰宗[2]、馬場 健史[2]、中村 聡[1]、福崎 英一郎[2]、○福居 俊昭[1]([1]東工大院生命理工、[2]阪大院工)
Rie Shimizu[1], Yudai Dempo[2], Yasumune Nakayama[2], Takeshi Bamba[2], Satoshi Nakamura[1], Eiichiro Fukusaki[2], ○Toshiaki Fukui[1] ([1]Tokyo Tech., [2]Osaka Univ.)

【【目的】Rubisco を鍵酵素とするカルビン回路は多くの独立栄養生物で利用される炭酸固定経路であるが、通常、本回路を必要としない好気的従属栄養条件などでは強く抑制される。*Ralstonia eutropha* H16 株はポリ(3-ヒドロキシブタン酸)[P(3HB)]生産菌としても知られる通性化学合成独立栄養細菌であり、水素をエネルギー源とした独立栄養条件でカルビン回路により炭酸固定をおこなう。一方、本菌を糖質で好気培養した際の増殖期後期にはカルビン回路が部分的に脱抑制されることが報告されているが、好気的従属栄養条件におけるカルビン回路の機能や役割についてはこれまで考慮されてこなかった。本研究では *R. eutropha* による従属栄養 P(3HB)生合成条件下でのカルビン回路の機能解析を行った。

【方法および結果】*R. eutropha* では六炭糖からエントナー-ドウドロフ(ED)経路を経由してアセチル-CoA を生成するが、その際ではグルコース骨格中の 1 位と 4 位の炭素が脱炭酸をうける。*R. eutropha* グルコース資化改変株 H16G 株、およびその Rubisco 遺伝子 *cbbLS* 破壊株、*cbb* オペロン転写活性化因子 *cbbR* 破壊株を[1-$^{13}C_1$]-グルコースを炭素源として培養し、蓄積 P(3HB)を分析したところ、*cbbLS* 破壊株・*cbbR* 破壊株では ^{13}C 存在比が 1.9～2.3%であったのに対して、H16G 株では 5.6%を示した。メタボローム解析では H16G 株および *cbbLS* 破壊株でリブロース 1,5-ビスリン酸(RuBP)が検出されたが、*cbbR* 破壊株では検出されなかった。RuBP や 3-ホスホグリセリン酸を含むほとんどの代謝物において、H16G 株では培養 12 時間後の ^{13}C 標識体存在比が培養 2 時間後と比較して増加していたが、*cbbLS* 破壊株では逆に減少した。さらに、P(3HB)生産において H16G 株は *cbbLS* 破壊株の 1.2 倍の対糖収率を示した。ED 経路を経由した P(3HB)生合成における余剰エネルギー・還元力はカルビン回路による 0.9 個の CO_2 固定に相当すると推定され、実際の P(3HB)対糖収率の増加はこの推定とよく一致した。これらの結果から、グルコースを炭素源とする好気的従属栄養条件下の *R. eutropha* においては、カルビン回路はグルコース由来ピルビン酸の酸化的脱炭酸で生じた CO_2 の一部を固定し、最終的に P(3HB)生合成に再利用する機能を有していることを明らかにした。

Calvin cycle, poly(3-hydroxybutyrate), *Ralstonia eutropha*

講演番号：2B33a10
講演日時、会場：3 月 27 日 10:49～ B 校舎 33 会場

分裂酵母プロテアーゼ遺伝子多重破壊株による 3-ヒドロキシプロピオン酸の高生産

Metabolic engineering for high production of 3-hydroxypropionic acid using the *Schizosaccharomyces pombe* protease-deficient strain

○陶山 明子[1]、漆原 正浩[2]、竹川 薫[1] ([1]九大院・農・生命機能、[2]旭硝子(株))
○Akiko SUYAMA[1], Masahiro URUSHIHARA[2], Kaoru Takegawa[1] ([1]Kyushu Univ., [2]Asahi Glass Co.,Ltd.)

【背景】近年、化学製品の原料として石油資源の代わりに再生可能な資源であるバイオマスを利用する技術（バイオリファイナリー）が研究されている。3-ヒドロキシプロピオン酸(3-HP)は、米国エネルギー省により選定されたバイオリファイナリー基幹物質 12 種類のうちのひとつであり、生分解性ポリエステルの原料や高吸水性樹脂の原料として多くの需要が見込まれている。

微生物による 3-HP 生産の報告は *E. coli* を宿主としたものが多いが、3-HP の pKa は 4.5 であり、3-HP の蓄積により培養液の pH が低下することが原因で生育の低下とそれに伴う 3-HP 生産の抑制が起こる。対策として培地の pH を中性付近に保ったまま培養する方法があるが、3-HP は塩の状態になり回収率が低下する。分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* は耐酸性が高く pH3 以下でも生育が可能であるため、本研究では *S. pombe* を宿主として代謝経路の改変により 3-HP 高生産株の育種を行った。

【方法・結果】3-HP 生産のため、*Chloroflexus aurantiacus* が有する炭酸固定経路の遺伝子を用いた。本経路では acetyl-CoA carboxylase (ACC)により acetyl-CoA を malonyl-CoA へと変換し、次いで malonyl-CoA reductase (Ca.MCR)により malonyl-CoA を 2 段階の反応を経て 3-HP へと変換する。そこで、Ca.MCR と *S. pombe* 由来の acetyl-CoA/biotin carboxylase (Cut6p)の過剰発現プラスミドを作製し、*S. pombe* ARC039 株に導入した。MM-leu-ura 培地で培養して継時的にサンプリングし培養上清の 3-HP を HPLC にて測定した。その結果、得られた形質転換体のほとんどで 3-HP 生産が行われなかった。Ca.MCR の分子量は約 132,000、Cut6p は約 257,000 と大きいため、プロテアーゼによる分解を受けやすいのではないかと予想し、細胞破砕液のウエスタン解析を行った。その結果、分解産物と思われる多数のバンドが確認できた。そこで分裂酵母プロテアーゼ多重破壊株である A8 株を宿主として、Ca.MCR と Cut6p 過剰発現株を作製し、同様にウエスタン解析を行ったところ、分解産物はほとんど検出されなかった。また得られた形質転換体のほとんどが 3-HP を分泌生産した。次に ① 強力なプロモーターを用いた Ca.MCR と Cut6p 発現量の増加 ② acetyl-CoA 生産量の増加 ③培地組成の最適化（グルコースおよび酢酸添加濃度） を検討した。その結果、3-HP 生産を向上させることができた。今後は代謝経路や排出経路を改変し、更なる 3-HP 生産量の向上を目指したい。

この成果は、独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構（NEDO）の委託業務の結果得られたものです。

3-hydroxypropionic acid, acetate, acetyl-CoA

講演番号：2B33a11
講演日時、会場：3 月 27 日 11:10～ B 校舎 33 会場

産業用酵母のゲノムシャッフリングによる高温及び酸耐性の付与と高効率キシロース発酵

Application of genome shuffling to industrial yeast strains of tolerance to high temperature and acids and efficient fermentation

○岩本 遼、猪熊 健太郎、蓮沼 誠久、近藤 昭彦（神戸大学）
○Ryo IWAMOTO, Kentaro INOKUMA, Tomohisa HASUNUMA, Akihiko KONDOO (Kobe Univ.)

【背景】

化石燃料の枯渇や温室効果ガスの排出が深刻化する中、再生可能で食料と競合しないリグノセルロース系バイオマスからのエタノール生産が注目されている。工業的に広く用いられている酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は、エタノール生産に優れている一方で、以下の課題がある；１）リグノセルロース系バイオマスの主要構成糖であるキシロースを資化できない、２）リグノセルロース系バイオマスの糖化に用いる酵素の至適温度が 50℃なのに対して、出芽酵母の生育至適温度が 30℃であり、糖化から発酵に移る際に冷却工程が必要になる、３）前処理工程で生成する酸類（酢酸、ギ酸）により発酵が阻害される。本研究では、代謝改変によりキシロース資化能を付与した酵母に対して、変異育種とゲノムシャッフリングを施すことにより高温耐性と酸（酢酸、ギ酸）耐性を賦与し、高温・酸存在下でのエタノール生産の向上を目指した。

【実験方法、結果および考察】

産業用二倍体酵母 *S. cerevisiae* の中から高温耐性を有する Sun049 と酸耐性を有する Sun224 に Scheffersomyces stipitis 由来のキシロースレダクターゼ（XR）遺伝子とキシリトールデヒドロゲナーゼ（XDH）遺伝子を導入し、内在性のキシルロキナーゼ（XK）遺伝子と共発現させることでキシロース資化能力を賦与し、Sun049T、Sun224T を作出した。これらにそれぞれ Zeocin 耐性遺伝子と G418 耐性遺伝子を導入し、 Sun049Z、Sun224K を作出した。Sun049Z と Sun224K を UV 処理した後に胞子形成させ、接合により染色体ゲノムをシャッフリングした SSG1 ライブラリーを調製した。38℃条件下、20 mM 酢酸、20 mM ギ酸存在下のプレート増殖試験で高い生育能を示した 8 株を選抜し、100 g/L キシロースを単一炭素源とし、20 mM 酢酸、15 mM ギ酸を含む YP 培地にて 38℃での微好気発酵に供した。最も良い発酵能を示した SSG1-032 は、30℃、酸非添加条件下では親株とほぼ同じエタノール生産量、エタノール生産速度を示した。一方、38℃、酸存在下においては、Sun049Z と比べて 2.58 倍のエタノール生産量、1.95 倍のエタノール生産速度を示し、Sun224K と比べて 1.34 倍のエタノール生産量、1.2 倍のエタノール生産速度を示した。本研究により、変異育種とゲノムシャッフリングの組合せは、高温及び酸耐性酵母の開発において有効であることが示された。今後、高温及び酸（酢酸、ギ酸）耐性の付与に寄与した遺伝子の同定を進めていきたいと考えている。

Industrial yeast, Genome shuffling, High temperature and acids tolerance

講演番号：2B33a12
講演日時、会場：3 月 27 日 11:21～ B 校舎 33 会場

Thermobifida fusca 由来糖質分解酵素から成る人工セルロソームによるバイオマス分解
Biomass deconstruction by artificial cellulosomes assembled with polysaccharide-degrading enzymes from *Thermobifida fusca*

○篠田 優[1]、本田 紘樹[1]、草野 大貴[1]、黒崎 正浩[1]、平野 勝紹[1]、春木 満[1]、平野 展孝[1,2]（[1]日大・工・生命応化、[2]JST・PRESTO）
○Suguru SHINODA[1], Hiroki HONDA[1], Daiki KUSANO[1], Masahiro KUROSAKI[1], Katsuaki HIRANO[1], Mitsuru HARUKI[1], Nobutaka HIRANO[1,2] ([1]Nihon Univ., College of Eng., Dept. of Chem. Bio. & Appl. Chem, [2]JST, PRESTO)

地球温暖化や化石エネルギー資源枯渇の問題は、近年の科学や工学における大きな課題の一つである。その中で持続的かつ再生可能な原材料であるセルロース系バイオマスからのバイオ燃料生産技術の確立は、それらの問題を解決する上で急務とされている。現在、環境負荷の観点からセルロース系バイオマスの分解には酵素法が用いられ、工業的には好気性糸状菌由来のセルラーゼが使用されている。しかし、それらのセルラーゼには分解効率や耐熱性、コスト面で課題があり、現在も世界中で研究や開発が進められている。その中で嫌気性微生物が生産するセルロソームと呼ばれる酵素複合体が注目されている。セルロソームは、酵素の持つドックリンドメインと骨格タンパク質のコヘシンドメインとの結合により形成し、多種多様な酵素が骨格タンパク質上へ集積されることで酵素間の相乗作用が促進され、効率的にセルロースやヘミセルロースを分解することができる。そこで本研究ではセルロソームの複合体化機構に着目し、好熱性放線菌 *Thermobifida fusca* 由来のセルラーゼ・ヘミセルラーゼを複合体化することで、高温での効率的なセルロース系バイオマスの糖化を目指した。

好熱性放線菌 *T. fusca* 由来セルラーゼ（Cel48A、Cel5A、Bgl1C）とヘミセルラーゼ（Xyn11A、Xyl43A）に、好熱嫌気性細菌 *Clostridium thermocellum* 由来セルロソーム構成セルラーゼのドックリンを融合した酵素、並びに *C. thermocellum* 由来骨格タンパク質 CipA のコヘシン 2 個から成る欠失型骨格を大腸菌にて組換え生産した。得られたドックリン融合酵素と欠失型骨格を用いてゲルシフト・アッセイを行い、すべてのドックリン融合酵素において骨格タンパク質との複合体形成を確認した。次に、脱リグニン処理済稲わらを基質としてバイオマス分解に対する酵素複合体化の効果を検討したところ、複合体化によりバイオマス分解活性の向上が認められた。また、コヘシンの個数を更に増やした骨格タンパク質を用いて複合体形成を行い、バイオマス分解に対する酵素複合体化の影響を検討したので報告する。

Polysaccharide-degrading enzyme, cellulosome, *Thermobifida fusca*

講演番号：2B33a13
講演日時、会場：3 月 27 日 11:32～ B 校舎 33 会場

アミラーゼ表層提示酵母によるシアノバクテリア *Arthrospira platensis* からの高濃度エタノール生産

High-level ethanol production from cyanobacterium *Arthrospira platensis* by amylase displayed yeast

○藍川 晋平[1,2]、猪熊 健太郎[3]、佐々木 建吾[3]、蓮沼 誠久[2,3]、近藤 昭彦[1,2] ([1]神戸大院・工、[2]JST・CREST、[3]神戸大・自科)
○Shimpei AIKAWA[1,2], Kentaro INOKUMA[3], Kengo SASAKI[3], Tomohisa HASUNUMA[2,3], Akihiko KONDO[1,2] ([1]Grad. Sch. Eng. Kobe Univ., [2]JST/CREST, [3]Adv. Sci, Tech. Kobe Univ.)

【背景】バイオリファイナリーと食糧生産の競合を避けるため，新たなバイオマス資源が求められている．その候補として，水圏の光合成生物である緑藻が注目され，その光合成産物であるデンプンを糖質源としたエタノール生産プロセスが開発されてきた．しかしながら緑藻を用いたプロセスでは，デンプンの抽出および分解のために，高温あるいは複数のステップの前処理を加えなければならなかった．そこで，我々はデンプンに類似したグリコーゲンを光合成産物として蓄積し [1]，緑藻に比べて，細胞破砕が容易なシアノバクテリア *Arthrospira platensis* に注目した．そして，*A. platensis* を糖質源とし，グリコーゲンの抽出を促進するリゾチームとアミラーゼ発現酵母を用いることで，従来プロセスで必要であった前処理を全て省き，抽出・糖化・発酵を統合し，ワンステップで *A. platensis* をエタノールへと変換するプロセスを開発した [2]．しかしながら，*A. platensis* の含水率が高いこと，発酵液中でのグリコーゲン抽出が緩やかに進行することから，エタノール濃度および生産速度が低いことが問題であった．そこで本研究では，脱水処理を加えた *A. platensis* を糖質源としてエタノール生産を行い，脱水・抽出・発酵条件の検討を通して，高収率な *A. platensis* からのエタノール生産プロセスの開発を目指した．

【方法】*A. platensis* 由来のグリコーゲンを糖化するため，*Streptococcus bovis* 由来のαアミラーゼ，*Rhizopus oryzae* 由来のグルコアミラーゼを細胞表層に発現させた *Saccharomyces cerevisiae* AASS/GASS 株を作出した．また高光強度・低硝酸塩投与量条件で *A. platensis* を培養し，グリコーゲンを乾燥重量あたり 65%まで蓄積させた．そして，脱水・抽出・発酵条件が *A. platensis* からのグリコーゲン抽出およびアミラーゼ発現酵母によるエタノール生産に及ぼす影響を調べた．

【結果】温和な条件で吸水脱水した *A. platensis* を用いることで，グリコーゲン抽出およびアミラーゼ発現酵母によるエタノール生産が効率良く進行することが明らかとなった．また発酵条件の検討により，*A. platensis* 細胞からのグリコーゲン抽出が促進され，大幅にエタノール生産速度が向上した．その結果，アミラーゼ発現酵母により *A. platensis* から 3 日間で 43 g L^{-1} のエタノールを生産することに成功した．本研究を通して，高生産量・高生産速度・高収率な抽出・糖化・発酵を統合した *A. platensis* からの直接エタノール生産プロセスを開発できた．

１） Aikawa et al. (2012) Bioresource Technology, 108, 211-215
２） Aikawa et al. (2013) Energy and Environmental Science, 6, 1844-1849

Ethanol, displayed yeast, cyanobacteria

講演番号：2B33a14
講演日時、会場：3 月 27 日 11:43～ B 校舎 33 会場

組み換え大腸菌を用いた非天然芳香族アミン類の発酵生産

Biosynthesis of non-natural aromatic amines in *Escherichia coli*

○桝尾 俊介、周 勝敏、高谷 直樹（筑波大生命環境）
○Shunsuke Masuo, Shengmin Zhou, Naoki Takaya (Univ. Tsukuba)

芳香環の水素原子がアミノ基に置き換わった、アニリンをはじめとする芳香族アミンは産業上重要な化合物であり、色素、医薬品あるいはポリマーの原料などとして広く用いられている。しかしながら、そのほとんどが石油由来であり、バイオマスから生産された例はほとんどない。これまでに、我々は *Streptomyces venezuelae* および *S. pristinaespiralis* の *papA*、*papB*、*papC* 遺伝子を発現させた組み換え大腸菌を用いて、芳香族アミンの一種である 4-aminophenylalanine (4APhe)の発酵生産系を構築し、グルコースから 2.0 g/L の 4APhe を生産することに成功している。

今回我々は、4APhe 生合成経路を構成する *S. venezuelae* の *papA*、*papB* および *papC* がコードするアミノ酸配列を基にして新規遺伝子の探索を行い、*Pseudomonas fluorescence* SBW25 株の *papA*/*papB*/*papC* 様遺伝子 *pfpapA*/*pfpapB*/*pfpapC* を発見した。これらを高発現させた大腸菌を作製し、グルコースを炭素源とした最少培地で培養したところ、培地中に 4APhe が検出されたことから、これら遺伝子が 4APhe 生合成に関与することが示された。遺伝子改変した大腸菌宿主において、これら遺伝子を高発現させることで 4APhe 高生産株を作製し、ジャーファーメンターを用いて、グルコースから 4.0 g/L の 4APhe を生産することに成功した。さらに、4APhe を別の芳香族アミンに変換する酵素を探索し、アンモニアリアーゼ、脱炭酸酵素などをコードする遺伝子をそれぞれ高発現させた種々の組み換え大腸菌を作製した。これらの大腸菌を用いた休止菌体反応により、4APhe を 4-aminocinnamic acid、4-aminophenylethanol、4-aminophenylacetic acid あるいは 4-aminophenylethylamine に高効率(70-90%)で変換することができた。また、4APhe 高生産株において当該遺伝子を高発現させることで、グルコースから 4-aminophenylethanol および 4-aminophenylacetic acid を生産することに成功した。本研究により、4APhe をはじめとした複数の芳香族アミン類の生物生産プロセスが構築された。

aromatic amines, bioengineering, *E. coli*

講演番号：2B33p01
講演日時、会場：3 月 27 日 14:00～ B 校舎 33 会場

組換え大腸菌を用いた高光学活性*(R)*-3-ヒドロキシブタン酸の生産における CoA 転移酵素高活性変異体の効果

effect of highly active mutant CoA transferase in *(R)*-3-hydroxybutyrate produced condition using recombinant *E.coli*.

○三吉 大地[1]、瀬戸 望[1]、松本 謙一郎[1]、大井 俊彦[1]、田口 精一[1,2]（[1]北大院・工、[2]JST-CREST）
○ Daichi MIYOSHI[1], Nozomi SETO[1], Ken'ichirou MATUMOTO[1], Toshihiko OOI[1], Seiichi TAGUCHI[1,2] ([1]hokkaidou Univ., [2]JST-CREST)

【目的】

3-ヒドロキシブタン酸(3HB)は不斉炭素を有するヒドロキシ酸であり、抗生物質、化粧品、香料、およびその他のファインケミカルなどの合成の際に、有用なキラル原料となる。微生物を用いた 3HB 生産には、高光学純度の 3HB が得られることに加え、植物バイオマス由来の糖を原料として使用できることが利点である。従来の微生物合成では、3HB は 3HB-CoA を重合して合成される P(3HB)の酵素分解により合成されていたが、我々は CoA 転移酵素(PCT)を利用し 3HB-CoA から 3HB を直接遊離させる新たな生産経路を確立した。本 PCT 経路では、3HB 合成の最終段階である CoA 転移反応において、3HB 合成の前駆物質であるアセチル CoA を再生できることが特徴であり、酢酸を第二の炭素源として使用することにより 3HB の生産性を向上させることができる。本研究では、3HB をより効率的に合成するために、本合成システムの鍵酵素である PCT の高活性変異体を作成し、3HB 生産性を検討した。

【方法・結果】

PCT の優良変異体をハイスループットスクリーニングするため、PCT を介して P(3HB)を合成し、ポリマー蓄積率を指標として選抜する方法を用いた。選抜された 1 つの PCT 変異体候補の活性は、3HB-CoA と酢酸を基質とした CoA 転移活性により評価した。その結果、野生型に比べて 3.0 倍高い活性をもつことが分かった。次に、取得した PCT 変異体を用いて 3HB 生産を行った。3HB-CoA 供給系酵素遺伝子および PCT 遺伝子（野生型・変異型）を大腸菌に導入し、グルコースと酢酸を添加した LB 培地で 30 ℃にて培養し、培地上清中に分泌された 3HB 濃度を HPLC により経時的に定量した。PCT 変異体を用いると、3HB の生産速度が野生型 PCT と比較して 38 %向上した。このことより、P(3HB)の合成量を指標に選抜された PCT 変異体が、3HB の発酵生産にも有利な効果を示す事がわかった。また、本 3HB 合成系において、PCT による CoA 転移反応が律速段階であることが示唆された。

(R)-3-hydroxybutyrate, *E.coli*, enzyme

講演番号：2B33p02
講演日時、会場：3 月 27 日 14:11～ B 校舎 33 会場

組換え大腸菌を利用した高光学純度(*S*)-3-ヒドロキシブタン酸の生産

Production of (*S*)-3-hydroxybutyrate by recombinant *Escherichia coli*

瀬戸 望[1]、○大井 俊彦[1,2]、松本 謙一郎[1]、田口 精一[1,2] ([1]北大院・工、[2]JST-CREST)
Nozomi SETO[1], ○Toshihiko OOI[1,2], Ken'ichoro MATSUMOTO[1], Seiichi TAGUCHI[1,2] ([1]Hokkaido Univ., [2]JST-CREST)

【目的】3-ヒドロキシ酪酸（3HB）は、不斉炭素を持つヒドロキシ酸であることから、高光学純度の(*R*)体または(*S*)体は、抗生物質やホルモンその他生理活性化合物のキラル合成のビルディングブロックとして非常に有用な分子である。化学合成と比較して、微生物発酵法による 3HB の生産は、光学選択性の高い酵素反応によって合成されるため、光学純度の高い 3HB を得られることが利点である。我々はこれまでに CoA 転移酵素（PCT）を利用した(*R*)-3HB の効率的な微生物合成法について報告してきた。そこで本研究では、(*R*)-3HB の生合成経路を基盤に改変することで、高光学活性の(*S*)-3HB の新たな代謝経路を構築し、組換え大腸菌を用いた(*S*)-3HB の生産について検討した。

【方法・結果】　β-ケトチオラーゼ（PhaA）、β-ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼおよびプロピオニルCoAトランスフェラーゼ遺伝子を保持する発現ベクターを導入した組換え大腸菌を、グルコースと酢酸を含むLB培地を用いて30℃で振とう培養した。培養上清に含まれる3HBは、AminexHPX-87Hカラム(Bio rad)を用いたHPLCにより定量した。3HB濃度は標準3HB試料から作成した標準曲線より算出した。また合成された3HBの光学純度はキラルカラムによって測定した。組換え大腸菌を振とう培養し、得られた培養上清中のグルコース、3HB濃度の経時変化を測定した。その結果、培養開始24時間後から3HBの蓄積が確認された。さらに生産性を向上させるため、培養条件を検討している。

3-hydroxybutyrate, (*S*)-3HB, microbial production

講演番号：2B33p03
講演日時、会場：3 月 27 日 14:22～ B 校舎 33 会場

大腸菌転写制御因子欠失株を用いた P(LA-co-3HB)の高生産化

Genome engineering of Escherichia coli for efficient production of lactate-based polymers

○児玉 悠[1]、門屋 亨介[1,2]、松本 謙一郎[1]、田口 精一[1,2] ([1]北大院・工、[2]JST-CREST)
○ Yu KODAMA[1], Ryousuke KADOYA[1,2], Ken'ichirou MATUMOTO[1], Seiichi TAGUCHI[1,2] ([1]Hokkaido Univ., [2]JST-CREST)

[目的] 微生物産生ポリエステルであるポリヒドロキシアルカン酸(PHA)の組換え微生物生産の向上には、これまで生合成遺伝子群の高発現・高活性化や代謝改変が効果的であることは示されてきている。最近我々は、新規 PHA として乳酸ベースポリマーP[lactate(LA)-*co*-3-hydroxybutyrate(3HB)]の微生物合成に成功している。本ポリマーは透明性と柔軟性を示し、従来の微生物産生ポリマーとは異なる応用が期待される。本研究ではポリマー生産性向上の新たなアプローチとして、転写レベルで遺伝子発現を制御するσ因子の存否が、乳酸ベースポリマーの生合成に与える影響について調べた。

[方法・結果] 初めに、大腸菌の 1 遺伝子欠失株ライブラリーである Keio コレクションより生育可能な 4 種類のσ因子欠失株(Δ*fliA*、Δ*rpoN*、Δ*fecI*、Δ*rpoS*)を選定し、乳酸ベースポリマー生産の宿主とした。これらのσ因子欠失株に乳酸ベースポリマー生合成遺伝子群を有するベクターを導入し、HPLC によりポリマー生産量および乳酸分率を調べた。その結果 *rpoN* 遺伝子欠失株のみが野生株に比べてポリマー生産量および乳酸分率の向上に効果的であることがわかった。興味深いことにこのポリマー生産量の増加は主にポリマー中の LA ユニット量の増加によるものであり、3HB ユニット量は野生株と比べ有意な差はなかった。また、炭素源として用いたグルコース消費の経時変化を調べた結果、本欠失株と野生株は、ほぼ同様に消費する傾向を示した。次に、導入されたポリマー合成系遺伝子群の発現量をウェスタンブロッティングにより定量した結果、本欠失株は野生株と比べて発現量に有意な差は見られなかった。以上のことから、*rpoN* 制御下の遺伝子群の発現が抑制されたことにより、細胞内のエネルギー消費が抑えられた結果、振り向けられるグルコースの消費が抑制されると同時に、それに伴って生じた余剰のグルコースがポリマー中の LA ユニットの合成に傾いたことでポリマー生産量が増加したと考えられた。

sigma factor, biobased plastic, *E. coli*

講演番号：2B33p04
講演日時、会場：3 月 27 日 14:33～ B 校舎 33 会場

組み換え体大腸菌で生産する資源循環型微生物ポリマーの高生産化に関与する新規遺伝子の探索

Screening of new gene involved in the high productivity of the polymers produced in recombinant *Escherichia coli*

○門屋 亨介[1,2]、松本 謙一郎[1]、大井 俊彦[1]、田口 精一[1,2]（[1]北大院・工、[2]JST-CREST）
○ Ryosuke KADOYA[1,2], Ken'ichiro MATSUMOTO[1], Toshihiko OOI[1], Seiichi TAGUCHI[1,2] ([1]Hokkaido Univ., [2]JST-CREST)

（研究背景）微生物産生ポリエステルは再生可能なバイオマスから合成されるプラスチックである。これまでは、ポリマー生産量増加の戦略として、細胞あたりの生産性向上のために合成酵素群への優良変異の導入・プロモーターの強化による遺伝子発現量の増大・細胞内の代謝の流束強化がおこなわれてきた。また、培養条件の検討として、pH・溶存酸素量のコントロールによる高密度培養が検討された。さらに、これらを組み合わせ、ポリマーの生産性向上が図られてきた。本研究では、宿主である大腸菌自身を強化することでポリマー生産性の向上を試みた。具体的には、大腸菌ゲノムにランダムに変異を導入したライブラリーを作成し、予測が不可能なターゲットを含めて高生産化につながる因子を探索するため、ポリマーの合成量が増加した変異株をハイスループットスクリーニングすることを試みた。

（方法・結果）乳酸ポリマー生合成系遺伝子群を導入した組換え大腸菌にトランスポゾン（mini-Tn5）を導入し、変異体ライブラリーを作成した。ポリマー生産量が向上したと考えられるコロニーを選抜するために、変異株ライブラリーをポリマーを特異的に染色可能なナイルレッドを含む寒天培地で培養し、呈色反応を用いた一次スクリーニングを行なった。約 1 万個のコロニーから野生株と比較して強い呈色反応を示したコロニーを選抜した。続いて強い呈色反応を示した菌株を液体培地で培養後、HPLC を用いた二次スクリーニングを行ない、最終的に最も高いポリマー生産性を示した変異株を 1 株選抜した。本変異株は、ポリマー合成量の向上に伴い炭素源の糖の消費も増大しており、炭素収率が向上した株ではなかった。しかし、ポリマー合成の様子を蛍光顕微鏡で観察したところ、興味深いことに細胞体積が増大していることがわかった。この現象はポリマー非生産条件では観察されず、一定量以上のポリマー合成・細胞内蓄積に連動して誘発されていた。以上のことから、この変異株は新しいポリマー合成用のプラットフォームとして有望である。

biobased plastic, genome, *E. coli*

講演番号：2B33p05
講演日時、会場：3 月 27 日 14:44～ B 校舎 33 会場

Production of poly(lactate-*co*-hydroxybutyrate) from *Miscanthus*-derived sugars

○ Camila UTSUNOMIA[1], Jian SUN[1], Ken'ichiro MATSUMOTO[1], Toshihiko OOI[1,2], Seiichi TAGUCHI[1,2] ([1]Grad. Sch. Chem. Sci. Eng., Hokkaido Univ., [2]JST-CREST)

[Purpose]

P[(*R*)-lactate(LA)-*co*-(*R*)-3-hydroxybutyrate(3HB)] is a novel microbial polyester produced by recombinant *Escherichia coli* heterologously expressing lactate-polymerizing enzyme which is an engineered derivative of polyhydroxyalkanoates (PHA) synthase. P(LA-*co*-3HB) is thought to be an attractive biobased material due to its semi-transparency and stretchy properties. For an economically feasible production of this new biopolyester, it is desirable to use inexpensive carbon source, such as lignocellulosic biomass. *Miscanthus*, which is a perennial crop adapted to cold area and bred to produce an extremely high biomass, could be a potent feedstock for microbial fermentation. However, the utilization of *Miscanthus* has never been investigated yet. Thus, the goal of this study was to produce P(LA-*co*-3HB) by using *Miscanthus*-derived sugars.

[Methods and results]

The ground *Miscanthus* was pretreated with sodium chlorite, sodium hydroxide or their combination for delignification. The delignified samples were hydrolyzed by using a commercial cellulase complex. The saccharification efficiency (monosaccharide concentration in the hydrolysate) of the three samples was 81.3, 49.5 and 104.4 g/L, respectively. Next, the saccharified samples were fed to *E. coli* to produce P(3HB), revealing that the sample treated with combined delignification steps was the most efficient in regard to P(3HB) production. Therefore, P(LA-*co*-3HB) was produced from the hydrolysate in comparison to the use of a mixture of pure glucose and xylose. The polymer yield (6.17 g/L) and LA fraction in the copolymer (13 mol%) were comparable to those obtained from analytical grade sugars (4.95 g/L and 15.6 mol%, respectively). This result demonstrated that *Miscanthus* hydrolysate showed to be a potent carbon source for P(LA-*co*-3HB) production.

Inedible biomass, LA-based copolymer, Microbial production

講演番号：2B33p06
講演日時、会場：3 月 27 日 15:05～ B 校舎 33 会場

Characterization of the substrate specificity of a poly(enriched lactate-*co*-3-hydroxybutyrate) depolymerase

○Jian SUN[1], Ken'ichiro MATSUMOTO[1], Ryosuke KADOYA[1], Yuta TABATA[2,3], Toshihiko OOI[1,4], Hideki ABE[2,3], Seiichi TAGUCHI[1,4] ([1]Grad. Sch. Eng., Hokkaido Univ., [2]IGSSE. Tokyo Inst. of Tech., [3]RIKEN-CSRS, [4]JST-CREST)

[Background]

P[(*R*)-lactate(LA)-*co*-(*R*)-3-hydroxybutyrate(3HB)] [P(LA-*co*-3HB)] is an unusual bacterial polyester produced in engineered *Escherichia coli*. The natural homopolymer P(3HB) is known as biodegradable material. However, the biodegradability of the copolymer has never been evaluated. To address this problem, as the initial step, we attempted to isolate P(LA-*co*-3HB)-degrading bacteria and characterize the enzyme contributing to the degradation.

[Methods and results]

The screening of P(LA-co-3HB)-degrading bacteria was performed using the soil sample collected from the campus of Hokkaido University, and a bacterium *Variovorax* sp. C34 was isolated. A depolymerase $PhaZ_{Vs}$ produced by *Variovorax* sp. C34 exhibited the activity to decrease the turbidity of P(67 mol% LA-*co*-3HB)and P(3HB) emulsions, while a well studied P(3HB) depolymerase from *Alcaligenes faecalis* T1 ($PhaZ_{Af}$) had activity only toward P(3HB). This fact suggested that the newly isolated P(LA-*co*-3HB) depolymerase possessed characteristic substrate specificity. To analyze the mechanism of degradation, the degradation products of P(3HB) and P(LA-co-3HB) using $PhaZ_{Vs}$ were analyzed using by size exclusion chromatography, ESI-MS, and NMR. The P(3HB)degradation products were 3HB monomer and dimer, which were the same as those of previously reported P(3HB) depolymerases, indicating that trimer is the minimum substrate that recognized by $PhaZ_{Vs}$. In the case of P(67 mol% LA-*co*-3HB), the degradation products consisted of LA and 3HB monomers, and LA-LA, 3HB-3HB, LA-3HB and/or 3HB-LA dimmers. This result indicated that $PhaZ_{Vs}$ hydrolyzed the ester bonds between LA and 3HB and between LA and LA units. The substrate specificity of $PhaZ_{Vs}$ was further confirmed by the hydrolysis of synthetic trimers of LA and 3HB. Interestingly, $PhaZ_{Af}$ from *A. faecalis* T1, which did not degrade P(LA-co-3HB), was also found to degrade the trimer substrates. This result indicated that the capacity of PhaZ degrading P(LA-*co*-3HB) depends on the molecular weight of substrate rather than the recognition of the structure of digested site.

polyhydroxyalkanoate, polylactic acid, biodegradation

講演番号：2B33p07
講演日時、会場：3 月 27 日 15:16～ B 校舎 33 会場

組換え大腸菌によるグリコール酸ベースポリマー合成とポリマーの物性評価

Microbial synthesis of glycolate-based polyesters in recombinant *Escherichia coli* and their physical properties

○平出 幸和[1]、斯波 哲史[1]、孫 健[1]、大井 俊彦[1]、田口 精一[1]、松本 謙一郎[1,2] ([1]北大院・工、[2]JST・さきがけ)

○Yukikazu HIRAIDE[1], Tetsufumi SHIBA[1], Jian Sun[1], Toshihiko OOI[1], Seiichi TAGUCHI[1], Ken'ichiro MATSUMOTO[1,2] ([1]Hokkaido Univ., [2]PRESTO, JST)

【背景・目的】グリコール酸ポリマーは生体適合性・生体吸収性に優れたプラスチックであり、主に医療用材料として利用されている。本ポリマーは、現在重金属触媒を用いたグリコリドの開環重合により化学合成されているが、重金属触媒を用いない新たな合成方法の開発が望まれている。当研究室では、微生物のポリエステル合成酵素の基質特異性を拡張することにより、組換え大腸菌の細胞内でグリコール酸ポリマーを生合成することに初めて成功した。しかし、本手法で得られるグリコール酸ポリマーは生産量が非常に少ないことが問題であった。そこで本研究では、グリコール酸ポリマーの合成量向上のためにポリマー生合成経路の改良に加え、得られたポリマーの物性および、生体吸収性に関与する非酵素的な加水分解性を評価することを目的とした。

【方法・結果】グリコール酸を重合酵素の基質となるグリコリル CoA に変換する酵素（PCT)、第二モノマー成分の基質となる 3-ヒドロキシブチリル CoA を供給する合成酵素群(PhaA, PhaB)、および改変型重合酵素（PhaC1(ST/QK))をコードする遺伝子を導入した組換え大腸菌を作製した。本大腸菌を、モノマー前駆体としてグリコール酸を添加した培地で培養することで、共重合体 P[glycolate-*co*-3-ヒドロキシ酪酸(3HB)]を生合成することに成功した。この際、培地に炭素源としてキシロースを加えると、ポリマー合成量が最適化前と比較して約 140 倍に増加することを見出した。抽出したポリマーを NMR 分析した結果、合成されたポリマーがランダム共重合体であることが分かった。また、培地中へのグリコール酸の添加濃度を変化させることで、ポリマー中のグリコール酸分率を 0～15%の範囲で制御することができた。さらに本共重合体の物性を評価するために、ソルベントキャストフィルムを作成し、光学的・機械的物性を検討したところ、共重合体中のグリコール酸分率に依存してフィルムの透明性と柔軟性が変化することが分かった。さらに本ポリマーの加水分解性を検討したところ、P(3HB)よりも加水分解性が向上していることが分かった。

glycolate, P(glycolate-*co*-3-hydroxybutyrate), hydrolysis

講演番号：2B33p08
講演日時、会場：3 月 27 日 15:27～ B 校舎 33 会場

中鎖脂肪酸を切り出すチオエステラーゼ遺伝子と アシルキャリアープロテイン遺伝子の同時導入による *Chlamydomonas reinhardtii* の 脂肪酸の炭素鎖長の改変

Alteration of fatty acid chain length of *Chlamydomonas reinhardtii* by simultaneous expression of medium chain specific thioesterase and acyl carrier protein

○稲葉 遊、中東 憲治、伊藤 卓朗、冨田 勝（慶応大学先端生命研）
○Yu INABA, Kenji NAKAHIGASHI, Takuro ITO, Masaru TOMITA (Keio Univ.)

太陽光や風力などの再生可能エネルギーで代替出来ないエネルギーであるジェット燃料を，藻類由来のオイルで代替することが航空業界から求められている．ジェット燃料の原料として用いることができ，凝固点が低いため寒冷地でも使用することができるオイルを生成する藻類の幅を広げるために，オイル産生藻類に炭素鎖長が 8-15 (C8-15) の脂肪酸を生成させる遺伝子改変技術の創出が求められている．

脂肪酸の炭素鎖伸長時に結合しているアシルキャリアープロテイン（ACP）に結合し，中鎖脂肪酸の段階で脂肪酸を ACP から切り出すチオエステラーゼ（TE）遺伝子を導入することが有効な手段だと考えられている中，中鎖脂肪酸 (C8-12) を選択的に切断する TE 遺伝子を *Chlamydomonas reinhardtii* に導入した研究*1 では *C. reinhardtii* の ACP が，外来の TE と結合できなかったために中鎖脂肪酸の蓄積が起きなかったと考えられている．そこから私は，種子中に中鎖脂肪酸鎖（C10:0）を蓄積する *Cuphea lanceolata* の TE 遺伝子（*ClTE*）と同 ACP 遺伝子（*ClACP*）を同時に *C. reinhardtii* に組み込むことによって中鎖脂肪酸の割合を増加させる事を目指した．

ClTE のみ発現するカセット（TEc），*ClTE* と *ClACP* を同時発現するカセット（TEACPc），及び，これら *ClTE* と *ClACP* のプラスチド移行配列を *C. reinhardtii* の対応するプラスチド移行配列に変えたカセット（mTEc, mTEmACPc）の４つを作製し，*C. reinhardtii* TKAC1017 株をエレクトロポレーション法により形質転換し，核に遺伝子カセットを導入した．遺伝子カセットにおいて，TE 遺伝子と ACP 遺伝子には *PSAD* プロモーターを用い，薬剤選択マーカーとしてゼオシン耐性遺伝子 *ble* を用いた．ゼオシン耐性を指標に得たそれぞれの形質転換体から，導入カセットの全長を保持している株をコロニーPCR によって選択し，遊離脂肪酸の鎖長を LC/MS で測定し分析した．TEc, mTEc, TEACPc, mTEmACPc それぞれを導入した形質転換体の脂肪酸組成分析の結果を報告し，*C. lanceolata* の TE 単独，TE と ACP 共導入の効果を明らかにする．

参考文献

*1 Blatti et al., (2012), PLoS One, 7, e42949.

thioesterase, acyl carrier protein, *Chlamydomonas reinhardtii*

講演番号：2B33p09
講演日時、会場：3 月 27 日 15:38～ B 校舎 33 会場

木質バイオマスのエーテル型リグニン－糖結合構造の解析

Structural analysis of lignin-carbohydrate linkages of ether type in wood biomass

○西村 裕志[1]、神谷 明宏[2]、片平 正人[2]、渡辺 隆司[1]([1]京都大生存研、[2]京都大エネ理工研)
○Hiroshi NISHIMURA[1], Akihiro KAMIYA[2], Masato KATAHIRA[2], Takashi WATANABE[1] ([1]RISH, Kyoto Univ., [2]IAE, Kyoto Univ.)

【背景・目的】
樹木に代表される植物バイオマスは未利用かつ豊富なバイオマス資源として注目されている。植物細胞壁は、主にセルロース、ヘミセルロースおよびリグニンによって構成されていて、互いに多様な結合で三次元の高分子を形成している。この高分子ネットワークで特にリグニンと糖の結合構造は、その存在量は少ないもののバイオマスの高分子ネットワークを“ほどく”ための鍵となる構造であり、バイオマスの成分分離、変換反応を開発する上で重要である。植物細胞壁中で、リグニンはヘミセルロースと共有結合して Lignin Carbohydrate Complex (LCC) を形成しており、細胞壁の強度や分解性に大きな影響を与えている。バイオマス変換において、このリグニン・糖間結合の切断を高効率で行えれば、主要３成分の分離効率は大きく上昇すると期待される。これまで、バイオエタノールや化学品を作るために、木材などの組織からリグニンと多糖類を分離する成分分離法が研究されてきた。本研究では、植物細胞壁の構造を正確に理解して分離方法を設計する基盤として、リグニンと多糖間の結合構造を天然試料から直接二次元 NMR 法により解析することを目的とした。
【実験】木質バイオマスとしてアカマツを用いた。粗粉砕後、抽出成分の除去を行った。ボールミル微粉砕後、1-4 ジオキサンを用いて抽出し残渣を回収した。親水性画分を LCC 画分とし陰イオン交換カラムクロマトグラフィーにより中性画分を得、糖分解酵素を 24 時間反応させ、多糖の結合を切断した。次に、遊離した多糖を疎水性カラムクロマトグラフィーで分離し、HPLC を用いて疎水性相互作用およびゲル濾過クロマトグラフィーにより LCC 濃縮画分を得、各種 NMR 測定を行った。
【結果】
HSQC, HMBC, HSQC-TOCSY などの二次元 NMR 測定により、リグニンと多糖の直接結合、およびその近傍原子への相関が複数観測された。HSQC 測定の結果、リグニンの β-O-4 構造におけるベンジル位がエーテル結合をした際にシフトする Benzyl ether alpha 位の C-H 相関が観測された。HMBC 測定の結果、この Benzyl ether alpha 位からリグニンの G2 位、G6 位、β-O-4 構造の γ 位への 3 結合離れた C-H 相関が観測され、Benzyl ether alpha 位の C から糖の H への遠隔相関も観測された。また、HSQC-TOCSY 測定の結果、リグニンと結合する糖部位から他の糖部位への内部相関も観測された。本研究により天然の木材内部のリグニンと多糖の結合構造として β-O-4 結合のベンジル位からエーテル結合を介して多糖と結合していることを示すことができた。

NMR, Lignin, biomass

講演番号：2B33p10
講演日時、会場：3 月 27 日 15:49～ B 校舎 33 会場

Trichoderma reesei に存在するソホロース合成能をもつβ-glucosidase の特定と解析
Search for *Trichoderma reesei* β-glucosidase responsible for sophorose formation among ten isozymes
○郭 博洋、野崎 功一、水野 正浩、天野 良彦 (信州大院・生命機能・ファイバー工学)
○Boyang Guo, Kouichi Nozaki, Masahiro Mizuno, Yoshihiko Amano (Interdisciplinary graduate school of Science and Technolgy Shinshu Univ)

【背景】糸状菌 *Trichoderma reesei* が分泌するセルラーゼはソホロース（Sop）によって誘導されることが報告されている。*T. reesei* には10種類の β-glucosidase（BGL）アイソザイム（Cel1A, Cel1B, Cel3A, Cel3B, Cel3C, Cel3D, Cel3E, Cel3F, Cel3G, Cel3H）が存在することが予測されており、Sop は BGL の糖転移反応によって合成されることが明らかになっている。本研究では各 BGL の麹菌または大腸菌による遺伝子組換え発現系の構築および精製を行い、それらの性質を調べるとともに、Sop 合成に最も適した BGL を特定し、その原因を特定することを目的とした。
【方法】遺伝子組換え BGL は各種カラムクロマトグラフィーにより精製し、以下の実験に用いた。BGL による糖転移活性は、0.05 mg BGL、10% セロビオース（G2）および 50 mM 酢酸緩衝液(pH 5.5) からなる反応液 1 ml を 30℃で 72 時間反応させ、生成物の量を経時的に HPLC により追跡することで調査した。Sop 合成を行う BGL に対しては、各種二糖類の加水分解における K_m および k_{cat} 値を測定した。また、BGL のグルコース（G1)耐性を調査するため各濃度 G1 存在下での加水分解活性を測定した。
【結果】Cel3H を除く 9 つの BGL は G2 に対する加水分解活性を示した。これらの BGL の G2 からの糖転移反応生成物を解析した結果、Cel3A、Cel3B、Cel3E、および Cel1A によって、Sop とともに結合様式が異なる様々な二糖類の生成が確認された。Sop の合成量は Cel1A と Cel3A で多く、最大で 5.4 mg/ml と 2.8 mg/ml であった。さらに Cel1A は、合成された Sop が反応後期まで蓄積されることが確認された。また、Cel1A の G2（ドナー）に対する k_{cat}/K_m 比は、61.8 $s^{-1}mM^{-1}$ であり、G2 が最も分解に適した基質であった。Cel1A は Sop に対して比較的高い K_m (0.56 mM) と低い k_{cat} (48.9 $s^{-1}mM^{-1}$) を示し、Sop に対して親和性は高いが加水分解力が低い BGL であることが明らかとなった。 各 BGL の、G1 耐性を調査した結果、Cel3A, Cel3B, Cel3E は 50 mM の G1 存在下でほとんど G2 分解活性がなくなった。一方、Cel1A は 200 mM の G1 存在下でも 40%の残存活性が認められた。これらの結果より、Cel1A の Sop 合成能が高い原因が明らかとなり、本酵素は *T. reesei* による Sop の合成に重要な役割を果たしていると考えられる。

Trichoderma reesei, β-glucosidase, cellulase induction

講演番号：2B33p11
講演日時、会場：3 月 27 日 16:10～ B 校舎 33 会場

Trichoderma reesei における 2 種類の β-glucosidase 遺伝子破壊株の作製とセルラーゼ生産における影響

Construction and analysis of knockout mutants of two ß-glucosidase genes from *Trichoderma reesei*

○畠中 理志、野崎 功一、郭 博洋、水野 正浩、天野 良彦（信州大院・理工）
○Satoshi Hatanaka, Kouichi Nozaki, Boyang Guo, Masahiro Mizuno, Yoshihiko Amano (Science and Technology Shinshu Univ)

【目的】産業的に重要なセルラーゼ生産菌である *Trichoderma reesei* は、β-グルコシダーゼ（BGL）の糖転移反応によって生成するソホロースが誘導物質となりセルラーゼが生産されることが知られている。我々は、本菌のソホロースの合成メカニズムを解明しそれを強化することによって、酵素の生産速度や生産量を増加させる研究を行っている。これまでの我々の研究で、*T. reesei* には Glucoside hydrolase family 1（GH1）および GH3 に属す少なくとも 9 種類の BGL アイソザイムが存在することを明らかにしてきた。また、その中の 4 種類のアイソザイム（Cel1A、Cel3A、Cel3B、Cel3E）がセロビオースを基質とした転移反応によって、ソホロースを合成する能力があることを明らかにしてきた。このうち、Cel1A および Cel3A の発現量は比較的高く、Cel1A は菌体内酵素であり、Cel3A は分泌型の酵素であることがわかっている。本研究では、*T. reesei* QM9414 株において、これら 2 種の BGL 遺伝子の破壊株をそれぞれ作製し、セルラーゼの誘導および生産量に対する影響を調査した。

【方法・結果】*T. reesei* における遺伝子破壊株は、目的遺伝子の ORF 上に薬剤耐性遺伝子を挿入することによって作製した。ピリチアミン耐性遺伝子（*ptrA*）の両側に目的遺伝子断片（約 1.5 kbp）を連結した遺伝子カセットを作製した。作製した遺伝子カセットをプロトプラスト-PEG 法によって *T. reesei* に導入し、ピリチアミン耐性のコロニーを得ることによって一次スクリーニングを行った。次に、これら出現したコロニーについて、PCR を行い遺伝子カセットが目的の位置に確実に挿入されているものを選抜した。一次スクリーニングで得られた薬剤耐性コロニーのほとんどは、*ptrA* の非相同組換え体であった。最終的に得られた目的遺伝子の破壊株の割合は，一次スクリーニングで得たコロニーに対して、それぞれ 29%（Cel1A）および 17%（Cel3A）であった。現在は、これら遺伝子破壊株を各種炭素源を含む培地で培養し、セルラーゼの生産時期および生産量の調査を行っている。また、セルラーゼの遺伝子発現量についても検討する予定でいる。

Trichoderma reesei, ß-glucosidase, cellulase induction

講演番号：2B33p12
講演日時、会場：3 月 27 日 16:21～ B 校舎 33 会場

超好熱細菌由来 sHSP 遺伝子導入による発酵細菌の耐熱性強化

Reinforcement of thermotolerance of ethanologenic bacteria by introduction of *Pyrococcus furiosus* sHSP gene.

○徳島 梓、原田 尚志、岡本 賢治、簗瀬 英司（鳥大院生応工）
○azusa tokushima, hisashi harada, kenji okamoto, hideshi yanase (Tottori Univ.)

【目的】

木質系・草本系バイオマスを原料とするセルロース系バイオエタノール製造プロセスでは、前処理原料にセルラーゼ酵素カクテルと C5・C6 並行発酵菌を添加して糖化と発酵を同時に進行させる同時糖化並行発酵（SSCF）が商用プロセスとして検討されている。高効率な SSCF を可能にするためには、発酵速度の律速となるセルラーゼ糖化反応温度に発酵温度を近付けることが課題となる。SSCF に使用されるセルラーゼ酵素カクテルの至適反応温度は 45～50℃であり、高速発酵細菌である *Zymomonas mobilis* の最適発酵温度は 30℃である。今回は、*Z. mobilis* に耐熱性を賦与し、高い温度での発酵を可能にすることを目的に、超好熱菌、*Pyrococcus furiosus* 由来の small heat shock protein（sHSP）に注目した。*P. furiosus* 細胞内での sHSP は 105℃環境下になると高発現し、RNA ポリメラーゼに結合することにより mRNA 合成を維持するように働くとされている。これまでに、中温菌である大腸菌内での *P. furiosus* 由来 sHSP 遺伝子の発現が耐熱性を向上させた報告がある。

【結果と考察】

人工合成した *P. furiosus* 由来 sHSP 遺伝子（504 bp, 167 a.a）を *Z. mobilis* 由来の強力なプロモーター遺伝子である P*gap*(Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)や P*eno*(enolase)の制御下に連結して組換えプラスミドを構築した。構築した pZA22-P*gap*-sHSP を大腸菌内に導入することにより、中温菌内での sHSP の発現と耐熱性向上への効果を検証した。大腸菌内では、pZA22-P*gap*-sHSP 遺伝子を導入することにより分子量が約 20,000 Dal の sHSP に相当するタンパク質バンドを SDS-PAGE により確認した。次に、sHSP 発現株を 37℃、42℃、45℃の条件下で生育を観察した結果、42℃や 45℃での生育が対象としたベクターのみの大腸菌に比べて約 2 倍の生育を示し、sHSP が中温菌においても耐熱性向上に働くことを確認することができた。

次に、pZA22-P*gap*-sHSP を *Z. mobilis* に導入して、耐熱性の向上を検討した。ベクターのみの *Z. mobilis* は 35℃以上では 20 g/L グルコースの発酵に 48 時間以上を要したが、sHSP 発現株では、35℃、37℃、39℃、40℃においても 24 時間で発酵が終了し、理論収率に近いエタノールの生産を示す結果となった。40℃での発酵性向上は、木質系・草本系バイオマスの SSCF の効率化に十分に寄与できると考察している。

bioethanol, heat-shock protein, *Zymomonas mobilis*

講演番号：2B33p13
講演日時、会場：3 月 27 日 16:32～ B 校舎 33 会場

Na^+/H^+ antiporter 遺伝子導入による発酵細菌の酢酸耐性強化

Reinforcement of acetate-resistance of ethanologenic bacteria by introduction of Na^+/H^+

○大戸 裕史、滝上 はる香、原田 尚志、岡本 賢治、簗瀬 英司（鳥大院生応工）
○Hiroshi OODO, Haruka TAKIGAMI, Hisashi HARADA, Kenji OKAMOTO, Hideji YANASE (Tottori Univ)

【目的】

セルロース系バイオエタノール製造プロセスとして、木質系バイオマスを原料にマイクロ波照射前処理と同時糖化並行発酵（SSCF）を組み合わせた実証試験を実施している。SSCF の触媒素子となる発酵菌には、発酵阻害の原因となる前処理工程で副生する糖あるいはリグニン由来の過分解に対する耐性が求められる。熱化学的な前処理工程で副生する過分解物には、フルフラール類、芳香族アルデヒド類、低級脂肪酸類が含まれ、特に高濃度の酢酸は発酵を阻害してエタノール収率の低下をもたらす。今回は、発酵阻害物としての酢酸に焦点を絞り、高速発酵細菌である *Zymomonas mobilis* の酢酸耐性強化を検討した。酢酸による発酵阻害の原因の一つとしては、取り込まれた酢酸による細胞質内 pH 低下と予想される。そこで、大腸菌細胞内で細胞質内 pH 調整に働くとされる Na^+/H^+ antiporter (NhaA)に着目し、NhaA の発現強化による *Z. mobilis* の酢酸耐性の効果を検討した。

【結果と考察】

Z. mobilis は 0.5%酢酸ナトリウム混在下での生育の遅延は観察されず、1.2%以上の酢酸ナトリウムで生育と発酵阻害が観察される。そこで、酢酸耐性濃度を木質バイオマス前処理物に含まれる 2%（325mM）に設定して Na^+/H^+ antiporter 遺伝子の発現効果を評価することとした。先ず、*Z. mobilis* のゲノム DNA に対して、大腸菌由来 *nhaA* に対するホモログ検索を行ったところ、42%の相同性を示す 1032bp で 344a.a の ORF を見いだした。そこで、*Z. mobilis* のゲノム DNA をテンプレートとして *nhaA* の増幅を行い、強力なプロモーターである P*gap* 制御下に連結して、組み換えプラスミド pZA323-P*gap*-*nhaA* を構築した。pZA323-P*gap*-*nhaA* を C5・C6 糖並行発酵性 *Z. mobilis* に導入して、*nhaA* の発現と酢酸耐性への効果を検討した。*nhaA* 発現効率は rRNA protein S17 をハウスキーピング遺伝子として用いたリアルタイム PCR により測定した結果、pZA323-P*gap*-*nhaA* を導入した株では未導入株と比較して約 1000 倍の発現を確認した。次に、目標とする 2.0%すなわち 325mM の酢酸塩を含む条件での発酵性の向上を検討した。対象とした、*Z. mobilis*(pZA323)株では、325mM 酢酸ナトリウム混在下での 20 g/L グルコースの発酵に 120 時間以上を要するのに対して、*Z. mobilis*（pZA323-P*gap*-*nhaA*）株では 72 時間でグルコースを完全に消費して、理論収率に近いエタノールを生産することが明らかになった。以上の結果は、NhaA の高発現化により酢酸エタノール耐性強化が可能であることを示している。

bioethanol, antiporter, *Zymomonas mobilis*

講演番号：2B33p14
講演日時、会場：3 月 27 日 16:43～ B 校舎 33 会場

Zymomonas mobilis の菌体外酵素生産活性化因子の解析
Analysis of a DNA fragment complementing the deficiency of cell-surface enzymes production in *Zymomonas mobilis*
○山本 知慧、原田 尚志、岡本 賢治、簗瀬 英司（鳥大院生応工）
○Chisato YAMAMOTO, Hisashi HARADA, Kenji OKAMOTO, Hideshi YANASE (Tottori Univ.)

【目的】
CBP（Consolidated bioprocessing）によるセルロース系バイオエタノール製造に最適な発酵菌の代謝工学的育種を検討している。CBP に求められる発酵菌の特性の一つとしては、前処理された木質系・草本系バイオマスの固形分、すなわちセルロース成分の同時糖化発酵能が課題となる。これまでに高速発酵細菌である *Zymomonas mobilis* にセルロース糖化能を賦与するため、細菌由来のβ-グルコシダーゼ遺伝子やエンドグルカナーゼ遺伝子を導入したが、発現したセルラーゼの大部分は細胞質内に局在した。そこで、導入したセルラーゼの分泌効率の向上と細胞表層への提示を目的として、*Z. mobilis* に見いだした細胞表層に提示されるスクロース分解酵素（levansucrase と invertase）遺伝子の分泌領域を利用した新規な細胞表層提示システムの開発を検討している。今回は、*Z. mobilis* での levansucrase と invertase の発現と分泌を促進する遺伝子群の機能解析を検討した。
【結果と考察】
これまでに、levansucrase と invertase を構成的に大量に分泌生産する *Z. mobilis* 親株に対して変異を導入し、両酵素の発現と分泌が著しく低下した欠損変異株を取得するとともに、これら欠損変異を相補する 1.7 kbp の DNA 断片を親株のゲノム DNA からクローニングしている。1.7 kbp DNA 断片を導入した欠損変異株では、levansucrase と invertase の生産が増大し、細胞表層への分泌が回復した。さらに、1.7 kbp DNA 断片の塩基配列解析により、断片上には 2 つの ORF（ORF1:327 bp, 108 a.a と ORF2:553 bp, 184 a.a）がコードされていると推定した。そこで、ORF1 と ORF2 を別々にサブクローニングして機能解析を検討した。ORF1 を導入した株では、levansucrase と invertase の酵素活性が著しく増加するとともに、細胞表層およびペリプラズム画分への局在が観察された。また、両酵素抗体を用いた Western-blotting 解析においても、両酵素の細胞表層とペリプラズム画分への局在を確認することができた。一方、ORF2 を導入した株では、酵素活性の増加は認められなかった。以上の結果から、ORF1 は levansucrase と invertase の生産を正に制御する転写活性化因子と考察した。

Cell-surface display, levansucrase, *Zymomonas mobilis*

講演番号：2B33p15
講演日時、会場：3 月 27 日 16:54～ B 校舎 33 会場

C5・C6 糖並行発酵性 *Zymobacter palmae* の発酵転換による 2,3-Butandiol 高効率生産

Highly efficient production of 2,3-butandiol from a major sugar components of lignocellulosic biomass by recombinant *Zymobacter palmae*

○久本 晴加、吉岡 優希、原田 尚志、岡本 賢治、簗瀬 英司（鳥取大院生応工）
○ Haruka HISAMOTO, Yuuki YOSHIOKA, Hisashi HARADA, Kenji OKAMOTO, Hideshi YANASE (Tottori Univ.)

【目的】

2,3-ブタンジオール(2,3-BDO)はブタンジエンを経て合成ゴム(タイヤ)の原料であるばかりでなく、化成品基材としてインク、香水、殺虫剤、軟化試薬、爆薬、可塑剤の原料として有名である。さらに、光学純度の高い 2,3-BDO は医薬品や液晶などの付加価値の高い化合物の合成素材として利用される可能性を有している。工業的には、2,3-BDO 合成はナフサを原料とし 2-ブテンオキシドを過塩素酸水溶液中で加水分解する方法で製造されている。しかし、石油資源の枯渇や温暖化問題への対応として、セルロース系バイオマスを原料とした微生物発酵法が注目されている。そこで、セルロース系バイオマスを原料としてバイオエタノールを高効率で発酵生産可能な細菌である *Zymobacter palmae* に注目した。独自に解読したゲノム情報から、*Z. palmae* にはエタノール合成経路に加え、ピルビン酸からアセト乳酸、アセトインを経る 2,3-BDO 合成経路の存在を見出した。今回は、バイオエタノール発酵細菌である *Z. palmae* の発酵転換による 2,3-BDO の高効率生産条件を検討した。

【結果と考察】

これまでに、*Z. palmae* の宿主-ベクター系を開発して異種のキシロース・マンノース発酵性遺伝子を導入して高発現させることにより、セルロース系バイオマスの主要な構成糖であるグルコース、マンノース、キシロースから理論収率でバイオエタノール生産する C5・C6 糖並行発酵菌の育種に成功している。先ず、培養条件による発酵産物の挙動を検討した。その結果、*Z. palmae* を酸素制限下(微好気条件)で培養した場合にはエタノールが理論収率で生産するのに対して、好気・撹拌条件下で培養した場合にはエタノールの生成は認められず、2,3-BDO の著量の生産が認められた。そこで、グルコースからの 2,3-BDO の生産条件の最適化を行った。その結果、*Z. palmae* は 50 g/L グルコースを炭素源として通気撹拌を行った結果、培養開始 8 時間でグルコースを完全に消費して、理論収率の 89%で高い純度の 2,3-BDO を生産した。次に、C5・C6 糖並行発酵性 *Z. palmae* を用いて、キシロースからの 2,3-BDO 発酵生産を検討した。グルコースに比べて発酵速度と収率に低下が見られるものの、培養開始 48 時間でキシロースを消費して理論収率の 74%で 2,3-BDO を生産することに成功した。現在、2,3-BDO の高効率生産を可能にするために、解糖系以降の代謝系の最適化を検討している。

bioethanol, butandiol, *Zymobacter palmae*

講演番号：2B33p16
講演日時、会場：3 月 27 日 17:15～ B 校舎 33 会場

SUMO の発現は複数の発酵阻害物による酵母の増殖遅延を改善する

SUMO improves lag phase of growth caused by mixed fermentation inhibitors

ジャヤコディー ラヒル[1,2]、門脇 真史[1]、柘植 圭介[3]、堀江 健太[1]、鈴木 章弘[1,2]、林 信行[1,2]、○北垣 浩志[1,2] ([1]佐賀大農、[2]鹿児島大農、[3]佐賀県工業技術センター)
Lahiru Jayakody[1,2], Masashi Kadowaki[1], Keisuke Tsuge[3], Kenta Horie[1], Akihiro Suzuki[1,2], Nobuyuki Hayashi[1,2], ○Hiroshi Kitagaki[1,2] ([1]Saga Univ., [2]Kagoshima Univ., [3]Saga Industrial Center)

【目的】
非食糧バイオマスからバイオエタノールなどの燃料を製造するとき、最大の課題はさまざまな種類の発酵阻害物質が生じることであった。これまで世界中で多くの発酵阻害物質が発見されてきたが、これまではそれぞれの単独の発酵阻害物質の効果を探る研究がほとんどで、発酵阻害物質同士の相互作用を明らかにする、また考慮するアプローチはほとんど報告されてこなかった。そこで本研究では発酵阻害物質同士の相互作用を明らかにしさらにその効果を解除することを目指した。
【方法・結果】
完全実施要因計画 full factorial design により既報の Furfural, 5-hydroxymethylfurfural, glycolaldehyde, 酢酸、methylglyoxal の異なる濃度の組み合わせで発酵阻害実験を行い、それぞれの物質の相互作用項を定量的に見出すことができた。この結果から、個別の発酵阻害物質の効果だけではなく、物質間の相互作用効果を考慮に入れる必要があることが明らかとなった。
そこでこれらの物質をすべて含む培地への遺伝子破壊株の感受性を網羅的に調べ、68 個の感受性遺伝子破壊株を見出した。それらの感受性株の阻害物質感受性プロファイルを主成分分析することで、感受性株をグループ化したところ、タンパク質の SUMO 化に関わる遺伝子破壊株が他の株とは異なる特徴的な感受性を示すことがわかった。そこでこれらの発酵阻害物質を酵母に加えたときの SUMO 化、ユビキチン化を調べたところ、これらの物質は酵母のタンパク質の SUMO 化、ユビキチン化を促進することがわかった。
これらの結果から SUMO 化が発酵阻害解除の鍵ではないかと考え、SUMO タンパク質及び SUMO 化タンパク質を高発現したところ、複数の発酵阻害物質存在下の増殖遅延が改善した。この高発現株では解糖系で 1,3-bisphosphoglycerate から ATP を産生する Pgk1 が多く SUMO 化されて多く分解されており、細胞周期やエネルギー状態が改善されていたことから、発酵阻害物質によって変性したタンパク質が SUMO 化・ユビキチン化により速やかに分解されることで発酵性が改善したと考えられた。
この研究結果は、発酵阻害物質の複合的な効果はタンパク質の変性にあり、これを SUMO タンパク質及び SUMO 化タンパク質を高発現することで改善することができることを初めて示すものである。また発酵阻害物質存在下での増殖遅延解除に成功した初めての酵母育種である。

Appl. Microbiol. Biotechnol., in press (2014); *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 97(14):6589-600 (2013); *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 94(1), 273-83 (2012)
Key Scientific Article in *Renewable Energy Global Innovations* (Ottawa, Ontario, Canada)

SUMO, Fementation inhibitors, Saccharomyces cerevisiae

講演番号：2B33p17
講演日時、会場：3 月 27 日 17:26～ B 校舎 33 会場

ブタノール生産菌 *Clostridium beijerinckii* を宿主とした *Clostridium cellulovorans* のセルロソーム遺伝子クラスターの発現
Expression of the cellulosomal gene cluster of *Clostridium cellulovorans* in butanol producing *Clostridium beijerinckii*

○平松 愛子[1]、黒田 浩一[2]、植田 充美[2]、田丸 浩[1,3,4]、三宅 英雄[1,3,4] ([1]三重大学院・生資、[2]京大院・農・応用生命、[3]三重大・生命支セ、[4]三重大・新産業)
○Aiko HIRAMATSU[1], Kouichi KURODA[2], Mitsuyoshi UEDA[2], Yutaka TAMARU[1,3,4], Hideo MIYAKE[1,3,4] ([1]Bioresour., Mie Univ., [2]Agric., Kyoto Univ., [3]Res. Center, Mie Univ., [4]Tecnol. Innov. Inst., Mie Univ.)

【背景・目的】
セルロース系バイオマスを用いたバイオリファイナリーの問題として製造コストが高い点があげられる。既存の方法では、前処理、糖化、発酵のプロセスを別々で行っており、コストおよびプロセスをシンプルにするためにこれらのバイオプロセスを統合（CBP）化する技術開発が求められている。
嫌気性中温菌である *Clostridium cellulovorans* は、細胞表層に「セルロソーム」と呼ばれる酵素複合体を形成し、共役酵素反応によりセルロース系バイオマスを効率よく分解することから前処理や糖化に対して有効である。*C. cellulovorans* が生産するセルロソームは、セルロソーム骨格タンパク質の一つである *cbpA* 遺伝子と複数のセルラーゼ遺伝子やヘミセルラーゼ遺伝子が遺伝子クラスターを形成していることがこれまでの研究で明らかになった。一方、同じ *Clostridium* 属で嫌気性中温菌である *Clostridium beijerinckii* は、セルロース系バイオマスを直接分解することはできないが、単糖や二糖を代謝することでブタノールを発酵することができる。*C. cellulovorans* のセルロソーム遺伝子クラスターを *C. beijerinckii* へ賦与することでセルロース系バイオマス分解能を有したブタノール生産菌が期待でき、1 つの微生物で CBP 化が可能になると考えられる。そこで、*C. beijerinckii* を宿主とし、*C. cellulovorans* のセルロソーム遺伝子クラスターの発現を試みた。
【方法・結果】
C. cellulovorans の対数増殖期における RNA-Seq 解析から高発現遺伝子に注目し、プロモーターおよびシグナルペプチドを検討した。その結果、*cbpA* 遺伝子のプロモーターとシグナルペプチドを含む発現ベクターを構築した。この発現ベクターに *cbpA* 遺伝子のみと *cbpA* 遺伝子とその下流にセルラーゼ遺伝子やヘミセルラーゼ遺伝子を含むセルロソーム遺伝子クラスターを含む 2 種類のプラスミドを構築し、エレクトロポレーション法を用いて *C. beijerinckii* に形質転換した。この形質転換体の酵素活性はコンゴーレッド染色により確認した。また、セルロソームの発現を検証するために、不溶性セルロースを使ったアフィニティークロマトグラフィーによる精製とウェスタンブロッティングにおいて *C. beijerinckii* がセルロソームを発現していることを確認した。
【謝辞】
本研究は生研センターイノベーション創出事業と農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業の支援を受けて行った。

Clostridium cellulovorans, cellulosome, CBP

講演番号：2B33p18
講演日時、会場：3 月 27 日 17:37～ B 校舎 33 会場

キシリトール資化性を導く変異型 *Saccharomyces cerevisiae* 株の分離とその特徴づけ

Isolation and characterization of a mutant *Saccharomyces cerevisiae* strain with xylitol assimilation

谷 龍典[1]、田口 久貴[1]、藤森 一浩[2]、佐原 健彦[2]、扇谷 悟[2]、鎌形 洋一[2]、○赤松 隆[1] ([1]崇城大・生物生命、[2]産総研・生物プロセス)
Tatsunori Tani[1], Hisataka Taguchi[1], Kazuhiro fujimori[2], Takehiko Sahara[2], Satoru Ougiya[2], Youichi Kamagata[2], ○Takashi Akamatsu[1] ([1]Fac. Biotechnol. Life Sci., Sojo Univ.,, [2]BPRI, AIST)

【目的】キシロース資化性組換え *S. cerevisiae* 酵母株からキシロース資化能が向上した Hex$^+$変異体や高濃度キシロースを高効率に資化する Sxm$^+$変異体を分離し，次世代シーケンサーと同定解析で，*hex3* や新規な遺伝子変異部位を特定した。その機能に基づき，キシロースを高効率に代謝する機構に関して作業仮説を建てた。この簡便で迅速な解析法を利用し，酵母がキシリトールを資化できない原因およびグルコースとキシロース共存下でキシロース消費に及ぼすこの変異の影響を解析することを目的とした。
【方法と結果】高濃度のキシロースを資化する変異体の分離法に基づき，キシリトール資化性株を分離した。最初にペプトンと酵母エキスからなる YP 培地で，酵母菌が増殖しない濃度を解析し，それぞれ 2.5 g/L と 1.25 g/L と決定した。次に, 20 g/L から 140 g/L の範囲でキシリトールを含むこの LYP 培地で, 酵母が増殖しないことを確認した。続いて 20 g/L もしくは 100 g/L 濃度のキシリトールを含む LYP 培地で増殖する独立した突然変異体を分離した。次世代シーケンサーで 3 株（SCC7, SCC8, SCC15）を解析すると, SCC7 株で *SCO1* など 3 個の ORF 内と *GLC7* のフランキング領域に, SCC8 株で *GLC7* など 6 個の ORF 内に，SCC15 株で *GLC7, SCO1* など 5 個の ORF 内に有力な候補変異があることが分かった。それぞれの遺伝子の機能から *xyt1* が原因遺伝子変異と考え，親株の *xyt1* 遺伝子欠失株を作成した。キシリトール培地で増殖試験を行ったところ，キシリトール資化性となることを見出した。変異体 3 株および *xyt1* 破壊変異体は，野生型対立アレルに対して劣性であることを確認した後，変異体間の相補性試験を行った。その結果，掛け合わせで得られた二倍体酵母は，キシリトール資化性を示したことから，原因遺伝子は *xyt1* であると結論した。キシリトール資化性株の発酵試験を 40 g/L グルコースと 20 g/L キシロースを含む YP 培地で行うと，グルコースが存在する時に顕著なキシロースの消費が認められた。【謝辞】なお本研究の一部は、バイオ燃料製造の有用要素技術開発事業の一環として NEDO から委託を受けて実施した。

Saccharomyces cerevisiae, xylitol assimilation mutant, bioethanol

講演番号：2C31a01
講演日時、会場：3 月 27 日 09:00～ C 校舎 31 会場

カリウム輸送タンパクの高発現による大腸菌セシウム取り込み能の向上
Improving cesium incorporation in *Escherichia coli* by overexpression of a potassium transporter
○金田 祥宜[1]、加藤 創一郎[1,2,3]、北川 航[1,2]、寺島 美亜[1]、浅野 行蔵[1]、鎌形 洋一[1,2] ([1]北大院・農、[2]産総研・生物プロセス、[3]東大・先端研)
○ Yoshiki KANATA[1], Soichiro KATO[1,2,3], Wataru KITAGAWA[1,2], Mia TERASHIMA[1], Kozo ASANO[1], Yoichi KAMAGATA[1,2] ([1]Hokkaido Univ., Grad. Sch. Agric., [2]AIST, BPRI, [3]Univ. Tokyo, RCAST)

【背景と目的】核実験や放射性廃棄物などに由来する放射能汚染の原因物質としてセシウム（Cs）の放射性同位体が問題視されており、その回収技術の開発が急務である。生物、特に微生物を利用した Cs 回収技術は、安価で環境負荷が低いという特性から大きな期待を集めている。生物による Cs^+蓄積は主にカリウムイオン（K^+）輸送系を介した非特異的な取り込みに依存することが知られている。実際に Cs^+蓄積能を持つ微生物種が報告されているが、実用化にはその Cs^+取り込み活性および親和性の向上が必須である。また細胞内への Cs^+の蓄積が微生物の生理状態に与える影響も未知である。本研究では大腸菌をモデル微生物とし、Cs^+輸送活性を持つ K^+輸送タンパクの過剰発現が大腸菌の Cs^+取り込み能に与える影響、および細胞内 Cs^+濃度の上昇が微生物の生理状態に与える影響を調べた。
【結果と考察】まず K^+制限培養下でその細胞内機能の一部を Cs^+が代替可能との知見に基づき、M9 最少培地を基本培地として Cs^+の存在が大腸菌の生育を向上させるかを検討した。その結果、K^+ 制限条件で高濃度 Cs^+の添加により大腸菌野生株の増殖が増加することを見出した。次に大腸菌の 3 つの K^+トランスポーターのうち Cs^+の非特異的輸送活性が報告されている Kup の発現増大による大腸菌セシウム取り込み能の向上を試みた。*kup* 遺伝子のアラビノース誘導発現株を作製し、上記の K^+制限培地で培養したところ、その増殖はより低濃度 Cs^+の添加で増加することを確認した。一方で大腸菌野生株、Δ*kup* 株、空ベクター株の増殖は同条件でほとんど促進されなかった。Cs^+の添加が各大腸菌株の細胞内 K^+、Cs^+濃度に与える影響を原子吸光分析により確認した。細胞内 K^+濃度は各菌株とも Cs^+の添加量によらずほぼ一定であった。一方、細胞内 Cs^+濃度は菌株間、添加 Cs^+量により大きな違いがみられた。Cs^+添加条件での細胞内 Cs^+濃度は、Δ *kup* 株と空ベクター株と比較して、野生株、Kup 高発現株で有意に高くなっていた。さらに細胞内 Cs^+濃度の上昇が微生物の生理状態に与える影響を調べるため、高濃度 Cs^+添加条件での各菌株の細胞形態を蛍光顕微鏡により観察したところ、Cs^+の取り込みがみられた野生株、Kup 高発現株において細胞の異常な伸長がみられ、Cs^+の過剰な取り込みが微生物の細胞分裂を阻害している可能性が示唆された。現在、Kup 発現量と Cs^+取り込み活性との相関、および細胞内 Cs^+濃度と微生物の分裂阻害の関係性について更なる解析をおこなっている。

Escherichia coli, cesium, potassium transporter

講演番号：2C31a02
講演日時、会場：3 月 27 日 09:11～ C 校舎 31 会場

非放射性同位体を用いたきのこ・野菜等におけるセシウムの挙動解析

Analysis of cesium behavior in mushrooms and vegetables with nonradioactive cesium

○本條 秀子、中山 和美（東京電力福島復興本社）
○Hideko Kambe-Honjoh, Kazumi Nakayama (Tokyo Electric Power Company)

【緒言】
きのこや野菜等農作物におけるセシウムの挙動を知るために、非放射性塩化セシウムを培地に添加した栽培による基礎試験を実施している。きのこの子実体におけるセシウムの分布・塩類を添加した際の移行抑制、および野菜の部位別のセシウム分布比較等に関する試験の結果を報告する。
【方法】
シイタケの菌床にセシウム濃度 0.17mM となるように塩化セシウム溶液を浸み込ませ、その後にセシウムの 1000 倍に当る 0.17M となるように塩化カリウム溶液を添加し、定法に基づいて栽培し、発生した子実体を採取して試料を調製した。 野菜については、水耕栽培の培養液、または栽培用の新規ポット土壌に塩化セシウムを添加して生長させ、根・茎・葉・実などを採取し、試料を調製した。採取した試料を乾燥し、硝酸分解により液化、適宜希釈してＩＣＰ-ＭＳ分析によりセシウムおよびカリウムの試料中濃度を測定した。
【結果と考察】
シイタケ菌床栽培において、塩化セシウム無添加（内在性セシウムを指標）および塩化セシウム添加の場合の両条件で、セシウムのシイタケ子実体への移行を比較したところ、カリウム添加により子実体へのセシウム移行が約 60～70%抑制される結果を得られたことから、平茸１）の菌床栽培と同様のカリウムによる移行抑制効果を確認した。また、子実体中のセシウムの分布を分析した結果、傘部分よりも柄部分により高濃度で分布することがわかった。さらに、傘の辺縁 5～8ｍｍの部分を切り出し、残りの中心部と分けて分析したところ、辺縁部のセシウム濃度が中心部より約 40%高いことがわかった。さらに詳細な分析と、ナメコを含めた原木栽培を試みており、それらの結果についても報告する予定である。
野菜の水耕栽培において、茎葉に吸収されたＣｓ/Ｋ濃度比と、培養液Ｃｓ/Ｋ濃度比を比較したところ、茎葉では培養液よりも低い傾向が見られたことから、根から茎葉への移行時にＫ選択性があると考えられた。また、各部位別の分布を分析したところ、野菜種によって異なる傾向を示した。現在分析中の結果と併せて報告する。
1）平出、砂川、根田、他、森林総合研究所 H24 年版　研究成果選集

cesium, nonradioactive, uptake

講演番号：2C31a03
講演日時、会場：3 月 27 日 09:22～ C 校舎 31 会場

脂肪酸合成経路を介した糖および炭酸ガスからの共重合ポリエステルの生合成に関する研究

Study on biosynthesis of copolymers from sugar or carbon dioxide through fatty acid synthesis pathway

○脇田 和[1]、外村 彩夏[1]、西村 綾乃[2]、柘植 丈治[3]、福居 俊昭[4]、田中 賢二[5]、松崎 弘美[1,2]（[1]熊本県立大院環境共生、[2]熊本県立大環境共生、[3]東工大院総理工、[4]東工大院生命理工、[5]近大産理工）
○Izumi WAKIDA[1], Ayaka HOKAMURA[1], Ayano NISHIMURA[2], Takeharu TSUGE[3], Toshiaki FUKUI[4], Kenji TANAKA[5], Hiromi MATSUSAKI[1,2] ([1]Grad. Sch. Environ. Sym. Sci. Pref. Univ. Kumamoto., [2]Fac. Environ. Sym. Sci., Pref. Univ. Kumamoto., [3]Tokyo Inst. Tech., [4]Tokyo Tech., [5]Kinki Univ.)

【目的】微生物がエネルギー貯蔵物質として菌体内に合成・蓄積するポリヒドロキシアルカン酸（PHA）は生分解性プラスチックであり、環境調和型プラスチックとして期待されている。*Ralstonia eutropha* は糖や炭酸ガスを唯一の炭素源とし、菌体内にポリ（3-ヒドロキシブタン酸）（P(3HB)）を合成・蓄積するが、これは硬くて脆いため実用性に乏しい。そこで、*R. eutropha* の組換え株を作製し、脂肪酸合成経路を介して炭素数 4～12 の 3-ヒドロキシアルカン酸（3HA）からなる P(3HB-*co*-3HA) 共重合ポリエステルを合成することを目的とした。

【方法および結果】PHA 合成能欠損変異株の *R. eutropha* PHB^{-}4 および短鎖長特異的 PHA 重合酵素遺伝子破壊株の *R. eutropha* C-TnGmHX8 に *Pseudomonas* sp. 61-3 の低基質特異性 PHA 重合酵素遺伝子（*phaC1*$_{Ps}$）、脂肪酸合成経路からの中鎖長 3HA ユニットを供給する 3-ヒドロキシアシル ACP:CoA トランスフェラーゼ遺伝子（*phaG*$_{Ps}$）、*R. eutropha* の 3HB ユニット供給系酵素遺伝子（*phbAB*$_{Re}$）を導入した組換え株を作製し、従属および独立栄養条件下にて培養した。*lac* プロモーターによって導入遺伝子を発現させた組換え株の従属栄養培養では、*R. eutropha* C-TnGmHX8 組換え株において破断伸びが 23%の P(3HB-*co*-2.4% 3HA)が合成されたが、NMR および GC/MS 分析の結果、炭素数 10 以上の 3HA は検出されなかった。また、独立栄養培養においては、P(3HB)ホモポリマーのみが約 60 wt%合成された。一方、*R. eutropha* の PHA 生合成遺伝子の native プロモーターによって導入遺伝子を発現させた組換え株の従属栄養培養では、合成された PHA 鎖中への中鎖長 3HA ユニットの取り込みはなかった。さらなる 3HA 分率の向上を目指して、*phaC1G*$_{Re}$、*phbAB*$_{Re}$、さらには *P. aeruginosa* PAO の推定 3-ヒドロキシアシル CoA リガーゼ遺伝子を導入した組換え株を作製し、従属および独立栄養条件下にて培養した。*R. eutropha* PHB^{-}4 を宿主として糖を唯一の炭素源とした場合、35 wt%の PHA を蓄積したが、3HA ユニットの PHA 鎖中への取り込みはなかった。また、*R. eutropha* C-TnGmHX8 を宿主として培養した場合、PHA の蓄積はみられなかった。一方、炭酸ガスを唯一の炭素源とした場合、約 20~36 wt%の PHA が合成されたが、中鎖長 3HA ユニットの PHA 鎖中への取り込みはわずかであった（2.8 mol%以下）。現在、3HA 分率の向上を目指し、宿主における関連遺伝子の発現量や組換え株の培養条件の検討などを含め、*R. eutropha* の分子育種をさらに進めている。

polyhydroxyalkanoate, PHA, *Ralstonia eutropha*

講演番号：2C31a04
講演日時、会場：3 月 27 日 09:33～ C 校舎 31 会場

耐酸性乳酸菌 *Lactobacillus acetotolerans* HT の乳酸脱水素酵素遺伝子のクローニングと生分解性共重合ポリエステルの生合成

Cloning of the lactate dehydrogenase genes from acid-tolerant lactic acid bacterium *Lactobacillus acetotolerans* HT and biosynthesis of biodegradable copolymer

○後藤 早希[1]、外村 彩夏[1]、田口 精一[2]、松本 謙一郎[2]、田中 賢二[3]、松崎 弘美[1,4]（[1]熊本県大院環境共生、[2]北大院工、[3]近大産理工、[4]熊本県大環境共生）
○Saki GOTO[1], Ayaka HOKAMURA[1], Seiichi TAGUCHI[2], Ken'ichiro MATSUMOTO[2], Kenji TANAKA[3], Hiromi MATSUSAKI[1,4] ([1]Grad. Sch. Environ. Sym. Sci., Pref. Univ. Kumamoto, [2]Hokkaido Univ., [3]Kinki Univ., [4]Fac. Environ. Sym. Sci., Pref. Univ. Kumamoto)

【目的】*Lactobacillus acetotolerans* HT は pH 2.9 の酸性下でも生育できる耐酸性乳酸菌である。しかし、*Lb. acetotolerans* に関する研究報告は非常に少ない。そこで、HT 株の性質を明らかにするため、乳酸脱水素酵素（L-LDH および D-LDH）遺伝子のクローニングと同定を行うことを目的とした。また、HT 株の D-LDH 遺伝子を利用して乳酸（LA）ユニットを含む生分解性共重合ポリエステルの生合成を試みた。

【方法および結果】*Lb. acetotolerans* HT はホモ DL-乳酸発酵型のため、D-LDH と L-LDH 遺伝子の両方を有すると考えられる。そこで、さまざまな乳酸菌の D-LDH および L-LDH の保存領域に基づいてプライマーを設計し、degenerate および inverse PCR を行って、HT 株の D-および L-LDH 遺伝子をクローニングした。その結果、HT 株の D-LDH 遺伝子は 334 アミノ酸からなる推定分子量 37 kDa のタンパク質を、L-LDH 遺伝子は 323 アミノ酸からなる推定分子量 35 kDa のタンパク質をコードしていると考えられた。得られた塩基配列と他の乳酸菌の乳酸脱水素酵素遺伝子の相同性検索により、D-LDH は *Lb. ultunensis* と 94%の相同性を示し、L-LDH は *Lb. amylolyticus* と 87%の相同性を示した。また、D-LDH と L-LDH の間に相同性はみられなかった。次に、HT 株の D-あるいは L-LDH 遺伝子を大腸菌に導入した。その結果、大腸菌は D-乳酸あるいは L-乳酸をそれぞれ生産した。以上より、クローニングした遺伝子は HT 株の D-および L-LDH 遺伝子であることが明らかとなった。続いて、HT 株の D-LDH 遺伝子を用いて LA ユニットを含むポリエステルの生合成を試みた。まず、プロピオニル CoA 転移酵素遺伝子（*pct*）、*Pseudomonas* sp. 61-3 由来の改変 PHA 重合酵素遺伝子（*phaC1*(STQK)）、*Ralstonia eutropha* 由来の β-ケトチオラーゼ遺伝子（*phbA*）、アセトアセチル CoA レダクターゼ遺伝子（*phbB*）、そして HT 株の D-LDH 遺伝子を導入した組換え大腸菌を作製した。好気および嫌気条件で培養した結果、LA ユニットを含む生分解性共重合ポリエステル P(LA-*co*-3HB)が合成された。60 strokes/min で緩やかに振とう培養した場合、100 strokes/min での振とう培養と比べ、共重合ポリエステル蓄積率は低いものの、LA ユニットの分率が高まり、約 30 mol%だった。30 mol%の LA ユニットを含む生分解性共重合ポリエステルは透明性が増すことが知られているので、より実用的なプラスチックが合成できたと考えられる。現在、さらなる微生物育種と培養条件を検討している。

Lactobacillus acetotolerans, lactate dehydrogenase, biodegradable plastics

講演番号：2C31a05
講演日時、会場：3 月 27 日 09:44～ C 校舎 31 会場

組換え大腸菌による糖からの生分解性共重合ポリエステルの生合成
Biosynthesis of biodegradable copolymers from sugar by recombinant *Escherichia coli*

○外村 彩夏[1]、西村 綾乃[2]、後藤 早希[1]、脇田 和[1]、田口 精一[3]、松本 謙一郎[3]、柘植 丈治[4]、田中 賢二[5]、松崎 弘美[1,2] ([1]熊本県大院環境共生、[2]熊本県大環境共生、[3]北大院工、[4]東工大院総理工、[5]近大産理工)
○Ayaka HOKAMURA[1], Ayano NISHIMURA[2], Saki GOTO[1], Izumi WAKIDA[1], Seiichi TAGUCHI[3], Ken'ichiro MATSUMOTO[3], Takeharu TSUGE[4], Kenji TANAKA[5], Hiromi MATSUAKI[1,2] ([1]Grad. Sch. Environ. Sym. Sci., Pref. Univ. Kumamoto, [2]Fac. Environ. Sym. Sci., Pref. Univ. Kumamoto, [3]Hokkaido Univ., [4]Tokyo Tech., [5]Kinki Univ.)

【目的】多くの微生物が菌体内に合成・蓄積するポリヒドロキシアルカン酸（PHA）は、生分解性を有し、環境調和型プラスチックとして期待されている。これまで PHA 非生産菌の大腸菌を宿主として、糖を唯一の炭素源とした炭素数 4 の 3−ヒドロキシブタン酸（3HB）と炭素数 6～12 の中鎖長 3-ヒドロキシアルカン酸（3HA）からなる P(3HB-*co*-3HA)共重合ポリエステルの生合成に関する報告例はほとんどない。そこで、本研究では、PHA 重合酵素遺伝子とともにモノマー供給系に関わる酵素遺伝子を導入した大腸菌の組換え株を作製し、糖を炭素源として 3HB 分率の高い P(3HB-*co*-3HA)共重合ポリエステルを合成することを目的とした。加えて、乳酸ユニットを含む共重合体は、透明性が増すことや物性が改善され加工しやすくなることが知られているため、これにさらに乳酸ユニットを含む P(LA-*co*-3HB-*co*-3HA)共重合ポリエステルの合成も試みた。
【方法および結果】*Pseudomonas* sp. 61-3 の低基質特異性 PHA 重合酵素遺伝子（*phaC1*）および脂肪酸合成経路からの中鎖長 3HA ユニットを供給する 3-ヒドロキシアシル ACP:CoA トランスフェラーゼ遺伝子（*phaG*）、*R. eutropha* の 3HB ユニット供給系酵素遺伝子 *phbAB* が *R. eutropha* の PHA 生合成遺伝子の native promoter によって発現するように設計したプラスミド pJScK-C1GAB を構築した。さらには、*Pseudomonas aeruginosa* PAO あるいは *P. putida* NBRC100650 の推定(*R*)-3-ヒドロキシアシル CoA（(*R*)-3HA-CoA）リガーゼ遺伝子を pBBR1MCS-3 ベクターに導入したプラスミドを構築し、これらの各プラスミドとともに pJScK-C1GAB を導入した大腸菌の組換え株を作製した。これらの株を糖を炭素源として培養した結果、*P. aeruginosa* PAO の推定(*R*)-3HA-CoA リガーゼ遺伝子を導入した組換え株で、炭素数 8～10（14）の 3HA ユニットが 5.4 mol%取り込まれた P(3HB-*co*-3HA)共重合ポリエステルが合成された。また、*Lactobacillus acetotolerans* HT の D-乳酸脱水素酵素遺伝子（*ldhD*）および *Megasphaera elsdenii* のプロピオニル CoA 転移酵素遺伝子（*pct*）、さらには *Pseudomonas* sp. 61-3 の改変 PHA 重合酵素遺伝子（*phaC1*(STQK)）および *phaG* 遺伝子、*R. eutropha* の *phbAB* 遺伝子および *P. aeruginosa* PAO の推定(*R*)-3HA-CoA リガーゼ遺伝子を導入した大腸菌の組換え株を作製した。この組換え株で、糖を炭素源として培養した結果、乳酸ユニットと炭素数 4～10 の 3HA ユニットが取り込まれた P(LA-*co*-3HB-*co*-3HA)共重合ポリエステルが合成された。

biodegradable plastics, polyhydroxyalkanoate, lactic acid

講演番号：2C31a06
講演日時、会場：3 月 27 日 10:05～ C 校舎 31 会場

アナモックスリアクターのパイロシーケンス解析
Pyro-tag sequencing analysis of anammox reactors
○石川 秀、多田羅 昌浩、上野 嘉之（鹿島技術研究所）
○Shu ISHIKAWA, Masahiro TATARA, Yoshiyuki UENO (Kajima Tech. Res. Inst.)

【目的】嫌気的アンモニア酸化反応（アナモックス）はアンモニアと亜硝酸が、微生物によって化学合成独立栄養的に窒素ガスと水に変換される反応である。アナモックスを用いた窒素除去は、省エネ・低環境負荷型の廃水処理技術として有望視されているが、一方で、アナモックス菌の培養が簡単でないため、従来型の硝化・脱窒プロセスに比べて普及例は少ない。
　これまで人工廃水を用いて、環境試料からアナモックス菌を集積し、廃水処理工学的検討を行ってきた。本発表では人工廃水、および実廃水で稼働させているアナモックスバイオリアクターについて 16S rRNA 遺伝子を標的としたパイロシーケンシングを行い、群集構造解析を行った結果を報告する。
【方法】人工廃水、および実廃水(醸造廃棄物のメタン発酵処理液)を通水し、連続式固定床アナモックスリアクター（0.5Ｌ）を立ち上げた。固定床にはひも状担体を用いた。固定床上に生成したバイオフィルムからビーズ破砕法で DNA を抽出し、それを鋳型に約 0.3kb の 16S rRNA 遺伝子の部分配列を増幅し、454 GS-FLX（Roche）でパイロシーケンシングを行った。検体ごとに約 7、000 リードの配列を解析に供した。
【結果】アンモニアと亜硝酸からなる人工廃水を通水して馴養したアナモックスリアクターでは、アナモックス菌が顕著に優占化する傾向が示された。しかしながら、実廃水では、優占化率は 1/3 程度まで低下した。一方、窒素源がアンモニアのみの人工廃水、実廃水を通水して得たバイオフィルムでは、表層部でアンモニア酸化細菌(AOB)の割合が増加し、逆に深層部ではアナモックス菌の割合が増加する傾向が認められた。この結果は、アンモニアを原料とした一槽式リアクターでは、AOB は表層部で、アナモックス菌は深層部で優占化するバイオフィルムが形成されることを示しており、このバイオフィルムの適正な管理が、一槽式での反応を可能にするものと考察できた。AOB は、廃水種によって種レベルで変化していたが、いずれのリアクターにおいても優占化したアナモックス菌は *Candidatus* Brocadia anammoxidans（Accession: AF375994）であった。

anammox, wastewater treatmenmt, pyrosequencing

講演番号：2C31a07
講演日時、会場：3 月 27 日 10:16～ C 校舎 31 会場

A rapid soil genesis and microbiota succession on recently exposed volcanic deposits in Miyake-jima, Japan

○Yong GUO[1], Akinori HIRANO[1], Ken HOSOKAWA[1], Reiko FUJIMURA[1], Yoshinori SATO[2], Tomoyasu NISHIZAWA[1], Takashi KAMIJO[3], Hiroyuki OHTA[1] ([1]Ibaraki Univ. College of Agriculture, [2]National Research Institute for Cultural Properties Tokyo, [3]Faculty of Life and Environmental Science, Univ. of Tsukuba)

From the latest eruptions of Ontake and Aso mountains in Japan, mounting attention has been paid to whether soil ecosystem can rapidly recover from the volcanic damage under natural conditions. For the same end, our study monitored the development of soil ecosystem on the recent volcanic deposits derived from the eruption of Miyake-jima in 2000. The 9-, 11-, and 14-year-old volcanic deposits were collected from a fixed site (IG3) with highly developed vegetation (shrub woodland) in the summers of 2009, 2011 and 2014, respectively. The samples were analyzed by physicochemical, microbiological and molecular approaches.

Overall, the results showed that the total organic carbon (TOC) content, *in vitro* respiratory activity, utilizable organic substrate in ECO MicroPlate (Biolog) and bacterial biomass (total direct count and plate count in DNB agar) of volcanic deposits significantly increased from 2009 (9-year-old) to 2014 (14-year-old). T-RFLP analysis targeting 16S rRNA gene showed that the bacterial community in the deposits obviously shifted from 2009 to 2014, particularly, the increasing in relative abundances of *Acetobacteraceae*, *Bradyrhizobiaceae*, *Xanthobacteraceae*, *Caulobacteraceae* and *Methylocystaceae* within *Alphaproteobacteria,* and *Acidobacteriaceae* and *Holophagaceae* within *Acidobacteria*; and decreasing in those of *Oxalobacteraceae* and *Gallionellaceae* within *Betaproteobacteria* and *Xanthomonadaceae* within *Gammaproteobacteria*, revealed by 454-pyrosequencing of 16S rRNA gene. In addition, the bacterial communities were specific in the different layers (organic layer, surface and subsurface soil layer, and deposit layer) of the new soil horizons that were firstly detected in the survey in 2014. These results showed the picture of the early soil formation and bacterial community on the land with highly developed vegetation within several decades after volcanic eruption.

soil ecosystem recovery, volcanic damage, soil microbiota

講演番号：2C31a08
講演日時、会場：3 月 27 日 10:27～ C 校舎 31 会場

海洋生物資源の時空間摂動を評価する環境代謝分析アプローチ

Environmental metabolic analysis approach for evaluation of seasonal and regional fluctuation in marine bioresources

○菊地 淳[1,2,3]、伊達 康博[1,2]、朝倉 大河[1,2]、坂田 研二[1]、伊藤 研吾[1,2]、魏 菲菲[1] ([1]理研 CSRS、[2]横市院・生命医、[3]名大院・生命農)
○Jun KIKUCHI[1,2,3], Yasuhiro DATE[1,2], Taiga ASAKURA[1,2], Kenji SAKATA[1], Kengo ITO[1,2], Feifei WEI[1] ([1]RIKEN CSRS, [2]Yokohama City Univ., [3]Nagoya Univ.)

日本は世界第４位の排他的経済水域体積を有するとされ、高低差の激しさや南北からの豊かな潮流の恩恵を受け、生物多様性のホットスポットとなっている。この多様性豊かな水産資源は世界無形文化遺産・和食の礎を支え、なおかつ世界でも健康嗜好より広く流通しつつある 1)。つまり生命・食・環境を旗印とする本学会において、魚介類や海藻類、さらにはこれらを育む海洋環境には重要課題が山積していると言えよう。特に食と環境の課題に着目すれば、飲食物の呈味が産地によって異なることは、暗黙知として我々が経験的に感じていることである。しかし、例えばジュースやワインの場合はそのまま NMR 計測し、データベース化を推進しスペクトルの多変量解析を行うことで、僅か 25 種程度の代謝物組成の違いで産地判別が可能なことが報告されている 1)。そこで我々は、類似のアプローチを魚類や海藻類といった水産物に適用可能かもしれないと着目した。

一方で、産地毎の化学的特性がどのような要因に起因するか掘り下げて分析することは、かなり挑戦的な課題と思われる。我々は着目する環境中から採取した各種生物および地理学的試料から、未精製試料を各種分析機器で得たビッグデータを統合解析し、時空間の特徴抽出を行う手法を構築してきた。現在までに、河口底泥 2)，水中プランクトン 3,4)、魚類と腸内細菌叢 5,6)、海藻類 7-9)について、有機物群、無機物群および微生物群集の分析データを統合解析し地理的特性や“旬”としての季節特性を見出す手法を報告してきたため、その全容について本会にて鳥瞰したい。

＜参考文献＞

1)菊地淳 (2014) *バイオインダストリー*. 2)Asakura et al. (2014) *Anal. Chem.* 86, 5425. 3)Ogawa et al. (2014) *PLoS ONE* 9, e110723. 4)Everroad et al. (2012) *J. Vis. Exp.* e3163. 5)Yoshida et al. (2014) *Sci. Rep.* 4, 7005. 6)Asakura et al. (in press) *PeerJ.* 7)Date et al. (2014) *Polymer J.* 44, 888. 8)Ito et al. (2014) *Anal. Chem.* 86, 1098. 9)Wei et al. (submitted).

metabolome, microbiome, ionome

講演番号：2C31a09
講演日時、会場：3 月 27 日 10:38～ C 校舎 31 会場

環境微生物と対流を用いた新規水処理装置の開発

New Water Treatment System Based on Material Circulation for Stagnated Water Area

○永野 陽祐[1]、向 真樹[1]、ディネシュ アディカリ[1]、篠崎 彰大[1]、荒木 希和子[1]、久保 幹[1]、平井 敏治[2]、窪喜 千恵美[3]、今井 浩[3]([1]立命館大学、[2]メタルファンテック、[3]ワコール)
○Yosuke NAGANO[1], Masaki MUKAI[1], Adhikari Dinesh[1], Akio SHINOZAKI[1], Kiwako ARAKI S.[1], Motoki KUBO[1], Toshiharu HIRAI[2], Chiemi KUBOKI[3], Hiroshi IMAI[3] ([1]Ritsumeikan Univ., [2]Metal Funtech Corp., [3]Wacoal Corp.)

〈背景・目的〉

湖沼等の止水域の水浄化を効率的に行うため、自然浄化における重要な要素を解析した。その結果、対流と好気性微生物（脱炭酸反応等）及び嫌気性微生物（脱窒反応等）が自然浄化の中核を担っていることが明らかになった。本研究では、好気性菌及び嫌気性菌による代謝反応と対流を用いた新規水処理装置を開発することを目的とした。

〈方法・結果〉

対流と好気性微生物および嫌気性微生物を用いた水処理装置の開発を行った。この水処理装置は、200L 容のタンクとポンプと 760mL 容量のカラムで構成した。カラムには微生物吸着担体であるポリビニルアルコール（以下 PVA）が充填されており、カラム内に微生物が保持されるよう設計した。また、カラムは好気環境カラムと嫌気環境カラムをそれぞれ作製した。好気環境カラムはカラム 6 本で構成し、水はカラム内を 3.0L/min で常に通過するよう設計した。また、嫌気環境カラムは 3 本取り付け、水が 2.4L/min で 15 分間通過し、45 分間停止を繰り返すことでカラム内の溶存酸素濃度を好気環境カラムよりも低くなるよう設計した。このため装置は、タンク内の 200L の水が好気環境カラムを 1 日に約 22 回転し、嫌気環境カラムを 1 日に約 4.25 回転する設計となった。

この装置を用いて大学構内にある止水域から採取した 200L の環境水の 2 週間あたりの浄化効率を調べた。タンク内の水は 2 週間ごとに新たに汲んだ環境水に入れ替え、水質を調査する操作を 21 回連続で 1 年間試行した。季節により水質が変動する環境水を処理したにも関わらず 1 年を通して COD の減少が認められ、平均で 26.5%の減少率が確認された。また、PVA 1g 中に存在する総菌数を調べたところ、PVA 1g 中に 1.0×10^{9}cells 程度生息していた。この菌数は一般的な環境土壌 1g 中の菌数と同等以上であることがわかった。好気環境カラムと嫌気環境カラムの両方から採取した PVA から抽出した環境微生物の DNA を用いて PCR-DGGE 法を行い、クラスター解析により相同性を調べた。その結果、好気環境カラムと嫌気環境カラムそれぞれの PVA 内菌叢の相同性は 40%以下であった。つまり各カラム内環境には明確な差異があることが明らかになった。

convection, aerobicbacteria, anaerobicbacteria

講演番号：2C31a10
講演日時、会場：3 月 27 日 10:49～ C 校舎 31 会場

鉄腐食性硝酸塩還元菌 *Prolixibacter* sp. MIC1-1 の鉄腐食能の解析

Iron corrosion induced by iron-corroding and nitrate-reducing *Prolixibacter* sp. MIC1-1

○飯野 隆夫[1]、伊藤 公夫[2]、若井 暁[3]、鶴丸 博人[3]、大熊 盛也[1]、原山 重明[4]([1]理研 BRC-JCM、[2]新日鐵住金・先端技研、[3]NITE・NBRC、[4]中大・理工)
○Takao Iino[1], Ito Kimio[2], Satoshi Wakai[3], Hirohito Tsurumaru[3], Moriya Ohkuma[1], Shigeaki Harayama[4] ([1]RIKEN-BRC JCM, [2]Nippon Steel Corp., [3]NITE・NBRC, [4]Chuo Univ.)

【目的】石油備蓄基地施設や天然ガス・パイプラインなどで問題視される金属腐食は化学的要因によるものと考えられがちである。しかし、急速な腐食の進行や局所的な腐食現象は化学的要因で説明ができず特に問題となっており、これは微生物の作用による金属腐食(微生物腐食)が疑われている。この問題に対して、水素資化性の硫酸塩還元菌(SRB)やメタン生成アーキア(メタン菌)が主な原因菌として頻繁に研究されてきたが、我々は過去に注目されなかった硝酸塩還元菌 *Prolixibacter* sp. MIC1-1 を原油から純粋分離し、本菌株が硝酸塩存在下で金属腐食を引き起こすことを新たに見い出した。本研究では、*Prolixibacter* sp. MIC1-1 株の鉄腐食機構の解明を目的とした。
【方法】*Prolixibacter* sp. MIC1-1 を供試菌株として用いた。硝酸塩など 10 種類の電子受容体と金属鉄 (Fe^0) など 11 種類の電子供与体を用いて、*Prolixibacter* sp. MIC1-1 の利用できる電子受容体と電子供与体の特定を行った。次いで、*Prolixibacter* sp. MIC1-1 を鉄顆粒もしくは鉄片を含む人工海水培地に接種し、25°C にて 30 日間培養を行なった。培養後、試験液中の溶出鉄量、水素発生量、窒素化合物量を定量分析した。また、鉄片の表面構造解析、断面構造解析、X 線解析を行った。
【結果および考察】*Prolixibacter* sp. MIC1-1 株は炭素源(D-グルコースや有機酸など)を必須に要求する従属栄養細菌で、電子受容体として硝酸塩と酸素を利用し、電子供与体として金属鉄(Fe^0)、第一鉄(Fe^{2+})を利用した。興味深いことに、既報の金属腐食菌とは異なり MIC1-1 株は水素を利用できなかった。10 mM 硝酸塩と乳酸塩存在下で鉄腐食試験を実施した結果、MIC1-1 株の培養液は黄変し、鉄顆粒は黒く変色した。硝酸塩無添加条件では培養液および鉄顆粒に変化は見られなかった。MIC1-1 株の溶出鉄量は無菌区の 6 倍で、Fe^{2+}と Fe^{3+}の比率は無菌区が 4:1 であったのに対し、植菌区は 3:2-2:3 であった。培養液の各種成分を分析した結果、植菌区では硝酸が減少し、産物として亜硝酸とアンモニアが検出された。腐食鉄片の構造解析を行った結果、鉄片は減肉し、腐食生成物として炭酸鉄($FeCO_3$)とリン酸鉄($FePO_4$)が付着していることが明らかとなった。これらの現象は、過去に頻繁に研究されてきた SRB やメタン菌の鉄腐食とは異なる現象であった。以上、*Prolixibacter* sp. MIC1-1 株は硝酸還元により Fe^{2+}や Fe^{3+}形成を伴う鉄腐食を引き起こすことが明らかとなった。近年、石油備蓄タンクに硝酸塩を添加することで、SRB の増殖を抑制できる事例が報告されている。しかし、本研究の結果は、そのような現場に鉄腐食性硝酸塩還元菌が存在した場合、金属腐食被害を拡大することを意味する。今後、鉄腐食性硝酸塩還元菌を含めた鉄腐食菌のモニタリング技術や防食技術の開発が必要である。

Iron corrosion, Microbiologically influenced corrosion, Nitrate-reducing bacterium

講演番号：2C31a11
講演日時、会場：3 月 27 日 11:10～ C 校舎 31 会場

最確数法・制限酵素断片長多型解析法の活性汚泥中の微生物群集解析への利用

Application of newly developed MPN/MERFLP method to microbial community analysis in activated sludge

○堀西 直人[1]、赤星 裕美[2]、渡邊 克二[1,2] ([1]福岡工業大学大学院、[2]福岡工業大学)
○Naoto HORINISHI[1], Yumi AKAHOSHI[2], Katsuji WATANABE[1,2] ([1]Graduate School of Fukuoka Institute of Technology, [2]Fukuoka Institute of Technology)

【目的】最確数法・制限酵素断片長多型解析法が細菌群集の同定・定量に有効であることを見出し、マイクロチップ電気泳動装置(MCE-202 MultiNA;島津製作所)で得たデータから効率的に微生物相の同定・定量を行うための条件検討を行ってきた。これまでは主に土壌・堆肥・食品等の固相系試料を対象として微生物相解析を行ってきたが、この方法の水系微生物相解析への利用例として排水処理に関与する微生物相の解析に適用した。今回は培養後解析した結果と、培養せずに直接 DNA を抽出して解析した結果とを比較した。
【方法】制限酵素切断長データは、複数の微生物由来の遺伝子が混在した状態でも測定可能であるため、制限酵素多型解析法では微生物を純粋分離せずに同定することができる。さらに最確数法を組み合わせることで、微生物群集のそれぞれの微生物を同定・定量することができる。今回は、廃棄乳の流入が多く運転状態が良くない条件の活性汚泥 A と、運転状態が安定している条件の活性汚泥 B からそれぞれ希釈系列を調整し、乳糖ﾌﾞｲﾖﾝ培地(LB 培地)で培養し、高栄養条件下で増殖が速い従属栄養性の一般細菌に由来する 16S rDNA を制限酵素断片長多型解析法により解析し属名を推定した。推定された菌群を各希釈段階毎に集計し最確数法で計数し、試料に含まれる微生物群集の分類・定量を行った。また解析方法の簡略化を検討する目的で、同試料から培養せずに直接 DNA を抽出後、希釈系列を調製し PCR で増幅される 16S rDNA を同様に解析し､培養を介して得た結果との比較を行った。
【結果と考察】培養後解析する方法での活性汚泥 A の結果は､全菌数は 1.1×10^{11}MPN/ml であったが、高次希釈培養液では解析精度が低下したため大部分が同定できなかった。活性汚泥 B の全菌数は 1.1×10^{9}MPN/ml であり、*Weissella ghanensis* が 6×10^{8}MPN/ml 存在していた。培養せずに解析する方法での活性汚泥 A の結果は、全菌数が 2.0×10^{6}MPN/ml であり、*Streptomyces caelestis* が 1.1×10^{6}MPN/ml 存在していた。活性汚泥 B の全菌数は 2.0×10^{6}MPN/ml であったが､制限酵素断片の選抜が困難であり解析できなかった。解析が困難になる問題に対して、培養後解析する方法では高次希釈培養液 DNA サンプルの DNA 濃度を高め解析精度の改善を試みている。また培養せずに解析する方法では、新たな制限酵素の組み合わせ等の対策を検討している。

most probable number method, multiple enzyme restriction fragment length polymorphism analysis, activated sludge

講演番号：2C31a12
講演日時、会場：3 月 27 日 11:21～ C 校舎 31 会場

油脂高分解処理開放系での投入菌株の分別識別化・半定量の試み

Possible evaluation for detecting and quantification analysis of inoculated microbe under oil-degrading open treatment system

○平野 達也[1]、稲垣 泰治[1]、倉根 隆一郎[1]、稲川 顕嗣[2] ([1]中部大学、[2]シーシーアイ株式会社)
○Tatsuya Hirano[1], Yasuharu Inagaki[1], Ryuuitiro Kurane[1], Akitsugu Inagawa[2] ([1]chubu Univ., [2]CCI Co.)

「背景」多量の油が混入すると予想されている排水経路にはグリーストラップの油を除去する施設（除害施設）の設置が義務付けられている。しかしグリーストラップに溜まった油脂を放置しておくと、スカムが発生し、排水中の油脂の収集効率の低下、下水や河川への流出、排水口へ逆流、油脂の酸化、腐敗による悪臭、害虫発生の原因となる。グリーストラップ等の小型の除害設備では計画値を大幅に超える油の流入などの管理不良等の問題、不定期清掃、さらに専門業者にメンテナンスを依頼するとコストがかかってしまう。
「目的」グリーストラップにおいて効率よく油分を低減する方法として、近年微生物製剤を利用して廃水処理効率を高効率に管理することが求められている。そこで、我々は土壌より油脂分解優良菌株の探索を行い、既存の市販の微生物製剤よりも高い油脂分解力を持った菌株を酸性条件で油脂を高分解する菌株、（中性から弱アルカリ条件で油脂を高分解する菌株）を各 1 株取得した。
グリーストラップの環境条件である弱酸性条件下で油脂の分解能が高い菌株について分類同定試験を行った結果、酵母の *Yarrowia Lipolitica* であることを同定し既に報告している。中性から弱アルカリ条件下で分解力の高い菌株については現在同定中である。
微生物製剤を用いた生物学的処理は投与後の追跡調査ができていない難点がありそのため、微生物製剤投与後を想定し、開放系であるグリーストラップ内の菌叢の変化と投与菌 *Y. lipolitica* を遺伝子解析による追跡調査が可能か試みた。
「方法」グリーストラップの排水の菌叢は投入菌 *Y. lipolitica* 18SrRNA に代表されるだけでなく同時に存在する細菌による 16SrRNA のどちらも遺伝子解析する必要がある。遺伝子解析の手法として DGGE 法を適用した。*Yarrowia lipolitica* とグラム陰性の細菌 *E.coli* とグラム陽性の細菌 *C. glutamicum* を比率ごとに共培養後、DNA 抽出を行い 18SrRNA 用プライマー、16SrRNA 用プライマーで PCR を行い、DGGE 法にて投入菌 *Yarrowia lipolitica* を他の微生物と分別識別化を行い、さらにバンドの輝度の強弱について半定量化を試みた。輝度については画像解析ソフトを用いてバンド枠内の全画素のグレー値を合計したものを画素数で割り平均値を求めることで半定量化が開放系においても可能であることが示唆された。

DGGE, Grease trap, oils and fats-degrading

講演番号：2C31a13
講演日時、会場：3 月 27 日 11:32～ C 校舎 31 会場

嫌気・好気環境下での石油汚染土壌のバイオレメディエーションにおける菌叢解析

Analysis of bacterial community during bioremediation of oil polluted soils under aerobic and anaerobic conditions

○酒井 晴奈、向 真樹、アディカリ ディネッシュ、荒木 希和子、久保 幹（立命館大）
○Haruna SAKAI, Masaki Mukai, Dinesh Adhikari, Kiwako S. Araki, Motoki Kubo (Ritsumeikan Univ.)

【背景・目的】

微生物を利用した汚染浄化技術であるバイオレメディエーションは、土壌や海洋などの環境中での汚染物質の除去に活用されている。現在の石油汚染土壌のバイオレメディエーションには、*Rhodococcus* 属や *Gordonia* 属などの好気環境で活性をもつ細菌が用いられている。一方で、流出した石油などの炭化水素は嫌気環境にある土壌の深部へ沈降する傾向があり、このような状況での汚染の原位置処理には嫌気性菌の活躍が不可欠である。したがって、好気性菌だけでなく嫌気性菌も用いることにより、さらなるバイオレメディエーション技術の発展が期待されている。しかし、バイオレメディエーションにおける嫌気性菌の役割については未知の部分が多く、それらを用いた方法は確立されていない。本研究では、嫌気環境でのバイオレメディエーション中の微生物の挙動を解明することを目的とし、嫌気環境、好気環境での油汚染土壌における菌叢の解析を行った。

【方法・結果】

TC:19,900 mg/kg、TN:1,300 mg/kg (C/N:15)に調整した土壌にヘキサデカン (2,000 mg/kg-soil, 5,000 mg/kg-soil)を加えて油汚染土壌を作製した。これらを嫌気環境もしくは好気環境に 4 週間静置し、1 週間ごとに土壌を採取し、油分分析、総細菌数測定、16S rRNA 遺伝子での DGGE による菌叢の分析を行った。その結果、いずれの環境でも油分濃度の減少がみられ、嫌気環境下でもバイオレメディエーションが進行することが確認された。総細菌数は嫌気環境で少ない傾向にあり、菌叢は時間の経過とともに変化し、嫌気環境と好気環境で異なる菌叢に変化することがわかった。

Anaerobic condition, Bioremediation, Bacterial community

講演番号：2C31a14
講演日時、会場：3 月 27 日 11:43～ C 校舎 31 会場

Pseudomonas sp. HI-70 株の大環状アルコール分解系の解析
Genetic and biochemical characterization of the large cyclic alcohol degradation pathway in *Pseudomonas* sp. strain HI-70
○佐藤 ゆう、岩木 宏明、長谷川 喜衛 (関西大 化学生命工)
○Yu SATO, Hiroaki IWAKI, Yoshie HASEGAWA (Kansai Univ.)

【目的】

Psudomonas sp.HI-70 株は大環状アルコールを唯一の炭素源として生育する。我々は、これまでに代謝経路上のシクロアルカンモノオキシゲナーゼ遺伝子(*cpdB*)およびラクトンハイドロラーゼ遺伝子(*cpdC*)の構造を明らかにし、大腸菌で高発現した CpdB の酵素反応特性について報告している[1)]。本研究では、CpdC の酵素反応特性の解析を行うとともに大環状アルコール脱水素酵素遺伝子の検索を試みた。

【方法と結果】

CpdC の酵素反応特性を解析するため大腸菌発現系を構築した。精製酵素は、ゲルろ過クロマトグラフィーおよび SDS-PAGE により、単量体分子量約 33,000 のホモダイマーであることが明らかとなった。本酵素は、6～16 員環のラクトンに活性を有し、環が大きいほど高活性を示した。さらに、一般にエステラーゼ活性測定用基質として用いられる酢酸 4-ニトロフェニルの加水分解も触媒した。

次に、大環状アルコール脱水素酵素遺伝子を検索するため、既知領域から作製したプローブを用いたサザン解析をもとに周辺領域約 10kb をクローン化した。得られた領域の塩基配列を解析した結果、8 個のオープンリーディングフレーム(ORF)が見出された。その中には推定アミノ酸配列がシクロヘキサノールデヒドロゲナーゼを含む short-chain dehydrogenase のものと相同性を有する ORF(*cpdA*)が存在することがわかった。*cpdA* の機能を解析するため大腸菌発現系を構築した。IPTG 発現誘導菌体から調製した無細胞抽出液はシクロドデカノールをはじめとする大環状アルコールに対して活性があり、*cpdA* は大環状アルコール脱水素酵素をコードする遺伝子であることがわかった。

1) Iwaki et al., Appl. Environ. Microbiol. 72, 2707-2720 (2006); 永橋ら　日本農芸化学会大会講演要旨集

cycloalkanol dehydrogenase, lactone hydrolase, *Pseudomonas*

講演番号：2C31p02
講演日時、会場：3 月 27 日 14:11～ C 校舎 31 会場

Pseudokirchneriella subcapitata に対する銀ナノ粒子の毒性
Toxicity of silver nanoparticles to *Pseudokirchneriella subcapitata*
○川瀬 俊悟、神山 明穂、高橋 祐樹、長坂 征治（東洋大学）
○Syungo Kawase, Akiho Kamiyama, Yuuki Takahashi, Seiji Nagasaka (Toyo Univ.)

【背景】銀は古代から抗菌効果を目的として食器などに利用され、古代ローマでは抗菌作用のメカニズムや銀イオンの存在は理解されていなかったが銀製の水瓶に水を貯めて腐敗を防いでいた。近年になり低コストであることや抗菌性の高さから銀ナノ粒子を用いた消費者向けの抗菌製品の生産量が増加している。銀ナノ粒子の利用範囲拡大の一方で、環境への流出の増加が予想され水質環境中の生態系に悪影響を及ぼす危険性が懸念されている。しかし、銀ナノ粒子の生物に対する毒性のメカニズムは未解明の部分が多い。本研究では生態系の中で生産者として重要な役割を担っている藻類に対する銀ナノ粒子の毒性評価を目的として毒性試験のモデル生物とされている *Pseudokirchneriella subcapitata*（ムレミカヅキモ)を用いて毒性評価をおこなった。また、銀ナノ粒子の毒性が銀イオンによるものなのか、またはナノ粒子特有の性質によるものなのかを調べるために硝酸銀を曝露して対照実験を行った。
【方法および結果】供試生物として *Pseudokirchneriella subcapitata* を用いた。三日間の前培養を 2 回繰り返して生育条件を整えた細胞を新しい培地に加えて細胞数を 1.0 $\times 10^5$ cell/ml に調製した。硝酸銀、銀ナノ粒子をそれぞれ 5 ,25 , 50 ppb で曝露し静置と振盪の二つの条件で生育測定を行った。生育の評価は、曝露後 0 時間の吸光度に対する 24 時間ごとの吸光度の割合で求めた生育度を指標として比較した。ムレミカヅキモの生育は曝露する銀濃度の上昇にともない阻害され、硝酸銀曝露では 50 ppb の曝露濃度で生育が完全に阻害されていた。一方、銀ナノ粒子の曝露では 50 ppb でも無処理区と比較して１０％程度の生育が認められ、両銀種間での毒性の違いが示唆された。細胞内への銀の取込み量を比較するために細胞内金属含有量を測定した。曝露開始から 7 日後の培養液から細胞を遠心(3500 rpm,10 min 4 ℃)して回収し、1 mM 硝酸で細胞外の金属を洗い流した。洗浄した細胞に硝酸 4 mL を加えてホットプレート上で加熱(100 ℃ 1.5 時間、150 ℃ 2.5 時間、室温 1 時間)して細胞の分解、金属の抽出を行い金属含有量分析用のサンプルとした。細胞内の銀含有量は曝露濃度が上がるにつれて高くなる傾向が認められ、生育の阻害が細胞内に吸収された銀によるものである事が予想された。一方、銀曝露した細胞内では金属の蓄積以外でも過酸化水素による酸化ストレスの影響が推測された。銀曝露による細胞内の酸化ストレス変化を蛍光試薬 DCFH-DA を用いて測定した。細胞内で発生している酸化ストレスについては 50 ppb の硝酸銀曝露した細胞で顕著な上昇が確認された。現在、酸化ストレスの測定について詳細な解析を行いつつ、関連遺伝子の発現解析を進めている。

silver nanoparticles, bioaccumulation, oxidative stress

講演番号：2C31p03
講演日時、会場：3 月 27 日 14:22～ C 校舎 31 会場

銀ナノ粒子を用いた可視光応答型光半導体の病原細菌に対する抗菌効果

Antimicrobial effect of novel photocatalyst using nanosilver particle on pathogenic bacteria

○田尻 晋太郎[1]、宮崎 愛[1]、伊東 謙吾[2]、田中 賢二[1] ([1]近大産理工生環科、[2]伊都研究所)
○Shintaro TAJIRI[1], Megumi MIYAZAKI[1], Kengo ITO[2], Kenji TANAKA[1] ([1]Kinki Univ. Fac. Humanity-Oriented Sci. & Eng., [2]Ito Laboratory)

【目的】二酸化チタン TiO_2 をはじめとする光触媒物質は、光による発電、酸化分解、抗菌、脱臭、防汚作用を有し、光電池はじめ生活用品や環境浄化剤、建築用外装材、道路資材等として実用化され我々の生活に浸透している。既存の光触媒の多くは、UV を吸収するものの可視光には応答しないため、光触媒としての用途は屋外・日中に限られていた。近年、可視光吸収により触媒作用を発揮する光触媒の研究が注目されているが、実際に開発された“可視光応答型”光触媒の多くは可視光の吸収とそれによる起電力の発生が弱く、とくに抗菌性に関しては弱い光での活性が低く暗所では抗菌力が得られないなど、改善すべき点が少なくない。NPO 伊都研究所の伊東らは、西松建設（株）と共同で、銀ナノ粒子(A)、ボロン樹脂(B)（(株)ボロンインターナショナル社製)、およびクレイ(C)を材料に用いた新規な光半導体（以下、ABC 光半導体と称す）を開発した。この ABC 光半導体は、その光吸収領域が紫外領域よりエネルギーの低い可視部から近赤外域にも及ぶため、屋内でも有効な光触媒・光電変換素子として期待される。当研究室では、ABC 光半導体の暗所および可視光照射下での抗菌特性について研究しており、本発表では、病原細菌に対する抗菌効果について報告する。

【方法・結果】ABC 光半導体は水に溶解しないため、酢酸ブチルに溶解させたものを標準寒天平板培地に 100 μL 塗抹し、無菌空気気流下で溶媒を揮発させた後に各種検定菌を接種・培養し、対照試験区に対するコロニー形成阻害率を測定することにより抗菌活性を評価した。まず、検定菌として大腸菌の非病原性株と *Micrococcus luteus* を使って試験した所、ABC 光半導体は暗所でも強い抗菌活性を示し、また、室内灯と同程度の光量の LED 白色光照射により抗菌活性の向上が認められた。そこで、黄色ブドウ球菌、緑膿菌および腸管出血性病原大腸菌 O157:H7 等の病原細菌を使って試験した所、いずれの検定菌に対しても明瞭な抗菌効果が認められた。ただし、ABC 光半導体の抗菌力は検定菌の種類によって異なり、O157:H7 に対しては生菌数を $1/10^5$ に減らす強い抗菌活性が認められたが、緑膿菌に対してはそれほどの強い抗菌力を示さなかった。また、半導体中の A、B、C 成分の混合比によっても抗菌活性は異なり、A の含量を増やすと活性が強くなる傾向が認められたが、他の 2 成分 B、C も抗菌活性の発現に必須であることが分かった。現在、照射光の波長（色）が抗菌活性に及ぼす影響についても検証を行っている。また、実用性を考慮し、プラスチックフィルムに ABC 光半導体を浸透させ、その上で検定菌を暴露処理した後の生菌数の減少についても試験中である。

antimicrobial affect, photocatalyst, nanosilver

講演番号：2C31p04
講演日時、会場：3 月 27 日 14:33～ C 校舎 31 会場

固体表面の防カビ性能を評価するための新規なバイオアッセイ

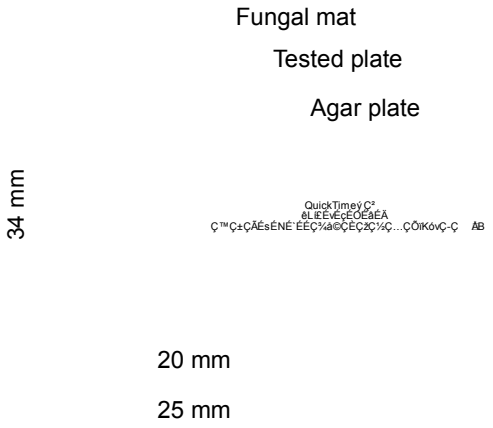
Novel bioassay for antifungal activity on a solid surface

○小田 忍[1]、竹内 侑[1]、黒澤 渉[1]、水谷 勉[2]、木村 誠[2]、今井 俊夫[3]、山口 芳美[4]、大箸 信一[1]([1]金沢工大ゲノム研、[2]水谷ペイント（株）、[3]ニチハ（株）、[4]（株）島田商会)
○Shinobu ODA[1], Tasuku TAKEUCHI[1], Wataru KUROSAWA[1], Tsutomu MIZUTANI[2], Makoto KIMURA[2], Toshio IMAI[3], Yoshimi YAMAGUCHI[4], Shinichi OHASHI[1] ([1]Kanazawa Inst. Technol., [2]Mizutani Paint, Co., Ltd., [3]Nichiha, Co., Ltd., [4]Shimada & Co., Ltd.)

【目的】　建造物の外壁や金属、あるいはプラスチック表面でのカビの増殖は、外観上の問題のみならず対象物の機能面あるいは感染症等の安全面にも関わる深刻な問題である。このような固体表面でのカビの増殖を抑止する手法の開発に先だって、固体表面の抗カビ性能を正確に評価する手法の確立がまずもって不可欠である。しかし、既知の評価法である JIS Z 2911(カビ抵抗性試験)や ISO 846:1978 法等ではカビの胞子カクテルを試験板表面に噴霧または滴下して、それらの増殖面積率で評価するため、固体表面の撥水性や増殖面積の測定等において精度上問題があると言わざるを得ない。そこで本研究では、試験塗板表面へのカビ気中菌糸の侵入距離を指標とする、新たな抗カビ性能評価法を確立することを目的とした。

【方法】　25 x 25 x 1 mm のポリスチレン板表面に、防藻・防カビ剤(Actiside EPW, Thor Specialities)を 1、2、3%添加したエマルション系塗料を膜厚 70～90 μm で塗装した。この塗板を、直径 34 mm のプラスチックシャーレに調製した修正サブロー寒天平板上に塗膜を上にして設置した。各辺に面したシャーレ内壁に接するようにカビマット(1 x 1 mm)を寒天平板上に 4 点植菌し、25℃で 1～2 週間培養した。培養後、試験片 4 辺について実体顕微鏡下で塗板表面への気中菌糸の侵入距離をデジタルノギスで計測し、配合した防藻・防カビ剤濃度と侵入距離との関係を調べた。

【結果】　防藻･防カビ剤に対して抵抗性を示した *Absidia blakesleeana* ATCC 10148b 等の 2 株を除き、他の 13 株では薬剤濃度が高くなるほど塗板表面への気中菌糸の侵入距離は短くなった。*Cladosporium cladosporioides* NBRC 6348 や *Penicillium multicolor* IAM 7153 等の 4 株は薬剤濃度が 1%、*Aspergillus ochraceus* ATCC 18500 や *Penicillium pinophilum* NBRC 6345 等の 3 株は同 2%で、塗板表面への侵入は完全に阻害された。薬剤濃度と侵入距離との間の相関係数(R^2)は、薬剤耐性株 2 株を除く 13 株で 0.704～0.923 の高値を示した。以上の結果より、本法は、固体表面の抗カビ性能の評価法として簡便かつ精度の高い評価法であると考えられた。



antifungal activity, antifouling paint, bioassay

講演番号：2C31p05
講演日時、会場：3 月 27 日 14:44～ C 校舎 31 会場

酸化あるいは還元作用を付与した各種溶媒あるいは雰囲気を基盤とする環境負荷低減技術の開発と応用

Development and Applications of Environmental Loading Reduction Technologies based on Variously Solvent and Atmosphere with Oxidation and/or Reduction Effects

○田村 健治[1]、苅野 仁[2]、本田 祐美[3]（[1]首都大・産技高専品川、[2]（有）イオン化学、[3]環美健ライフ研）
○Kenji Tamura[1], Hitoshi Karino[2], Yumi Honda[3] ([1]Tokyo Metro. Coll. Ind. Tech., [2]Ion-Kagaku, Ltd., [3]Kanbiken-Life Lab.)

環境負荷低減技術開発の一環として、各種溶媒あるいは雰囲気に対して、非常に強力な酸化作用並びに還元作用（抗酸化作用）を発現させる低環境負荷な方法を見出した。前者は、安定化次亜塩素酸水由来の酸化作用を用いる方法であり、後者は、イオン半導体由来の還元作用すなわち抗酸化作用を応用するものである。

安定化次亜塩素酸水は、高精度流体制御法（特許取得済み）により、有効塩素濃度並びに水素イオン指数 pH を高精度連続的に制御しながら調製される水溶液であり、塩素 Cl_2 の使用・発生を伴わず、塩酸 HCl を含有しないため、遮光条件下で有機物などの非酸化対象物との接触を避けることにより、貯蔵や流通が可能となる。

$Cl_2 + H_2O \rightleftarrows HClO + H^+ + Cl^-$ (従来法：反応制御困難・調整後直ちに使用が必須) （１）

$NaClO + H^+ + Cl^- \rightarrow HClO + Na^+ + Cl^-$ (本法：高精度流体制御法) （２）

本法の可変設定値　流量：　450 L/hr < 流量 < 800 L/hr
有効塩素濃度：　10ppm < 有効塩素濃度 < 200ppm
水素イオン指数：　5.0 < pH < 6.8　（標準設定値）

本品由来の強力な酸化作用は、人畜無害な低温殺菌効果（次亜塩素酸 HClO は白血球の好中球における体内合成物質）並びに消臭効果などは、様々な分野・領域における殺菌・衛生管理・防疫対策に効果的である。

イオン半導体（特許取得済み）は、消費電力などが著しく小さく人畜無害な環境適合型の装置である。各種溶媒あるいは雰囲気に対して、本半導体を作用させることにより、安全で簡便に非常に強力な抗酸化作用を付与することが可能となる。存在寿命の長い、溶媒和電子型の新規活性種が調製されるために発現されるものと推定される。本活性種が発生されると、酸化還元電位だけでなく、粘度あるいは表面張力についても低下されることから、各種溶媒の有効分子量の低下が示唆される。

本品由来の強力な抗酸化作用は、食用油の劣化防止・食品の鮮度保持・食肉の選択的熟成促進などをはじめ、各種二次電池の充放電特性向上・熱交換機における熱交換効率向上・自動車の燃費向上並びに排気ガスの有害成分低下などにも適応範囲を拡充されつつある。

the Ionic Semiconductor, the Aqueous of Stabilization Hypochlorous Acid, Environmental Loading Reduction Technologies

講演番号：2C31p06
講演日時、会場：3 月 27 日 15:05～ C 校舎 31 会場

山形県米沢市の高活性型ポリ塩化ビフェニル分解細菌の単離と *bph* オペロン解析

Isolation of highly polychlorinated biphenyl-degrading bacteria from Yonezawa and genotyping of the *bph* operon.

○太田 茉莉紗[1,2]、高塚 由美子[1]、櫻間 晴子[1]、原 富次郎[1] ([1]山形大院理工、[2]アプリザイム(株))
○Marisa OTA[1,2], Yumiko TAKATSUKA[1], Haruko SAKURAMA[1], Tomijiro HARA[1] ([1]Grad. School of Science & Engineering, Yamagata Univ., [2]Applizyme Inc.)

【背景と目的】ポリ塩化ビフェニル類（PCBs）は、性状が安定なため広く産業利用されたが、生体蓄積性および毒性が判明し、世界で製造・使用が禁止された有機塩素化合物の一つである。我々はこれまで、山形県米沢市周辺から PCBs の母核であるビフェニルを資化する細菌を数多く単離し、PCBs 分解特性を調べた。単離菌株には *Comamonas* sp. や *Rhodococcus* sp. の他、共生種株として *Rhodococcus* sp./*Stenotrophomonas* sp./*Achromobacter* sp. や、*Rhodococcus* sp./*Pseudomonas* sp.、*Rhodococcus* sp./*Achromobacter* sp. 等があり、これら細菌株が共通して有するビフェニルジオキシゲナーゼ（BDO）は、PCBs 異化の初発反応において分子状酸素を添加することで水酸化へと導く重要な役割を演じる。上記単離菌株の BDO 活性は全てオルト位とメタ位への酸素添加型（2,3-BDO）であったが、基質特異性（PCB 異性体に対する分解特性）は異なっていた。我々は BDO 高発現型の固定化微生物触媒を作創し、菌株間の分解特性の差を活用して複合使用することで PCBs 分解活性の向上に成功した。さらに 2014 年度本大会においては、2,3-BDO とは反応特性が異なるメタ位とパラ位への酸素添加型(3,4-BDO)微生物触媒を複合して、商用 PCBs であるカネクロール KC-300 や KC-400 を 99%以上分解達成したことを報告した。この複合微生物触媒で、とりわけ *Comamonas testosteroni* 株由来 BDO は高活性であり、５塩素置換型 PCBs までを広く基質とする特徴を有する。我々が単離した約 120 菌株中の種属優勢性は、*Rhodococcus* sp. および *Achromobacter* sp.（各々単離率 27%）＞*Stenotrophomonas* sp.（同 17%）＞*Pseudomonas* sp.（同 13%）＞*C. testosteroni* sp.（同 1.8%）と、*C. testosteroni* は最も少なかった。今回は、高活性だが菌叢劣勢な２株の *C. testosteroni* の BDO を含む一連の関連酵素群の遺伝子構造（*bph* オペロン）を解析した。本報告では、その結果と共に地域固有性についても論じたい。
【方法と結果】米沢市周辺の異なる場所から単離した２株の *C. testosteroni* について、*bph* オペロン構造解析を、サザンハイブリダイゼーションとゲノム DNA を鋳型としたインバース PCR 法を用いて行った（YU14-111 株；2012 年度本大会で *bph* オペロン構造報告済、YAZ2 株；本大会新規報告）。両者を比較した結果、構造および配列共に完全に一致した。上記２株のカネクロール KC-300 中の PCB 異性体分解特性解析の結果、米沢市由来の高活性 PCBs 分解細菌の特徴は、2,3-BDO 活性が優勢であることが示唆された。現在、全ゲノム配列解析を進行中であり、その結果判明するだろう特徴も本報告へ加えたい。

polychlorinated biphenyl, *bph* operon, *Comamonas testosteroni*

講演番号：2C31p08
講演日時、会場：3 月 27 日 15:27～ C 校舎 31 会場

クロロフェノール分解菌 *Ralstonia pickettii* DTP0602 の後期分解遺伝子の解析
Gene analysis of lower pathway for degradation of chlorophenol by *Ralstonia pickettii* DTP0602
○畢 貞、八田 貴（岡山理大工）
○ZHEN BI, TAKASHI HATTA (Okayama Univ. Sci.)

【目的】クロロフェノールの中でも、2,4,6-トリクロロフェノール(2,4,6-TCP)は重合することによって毒性の高いテトラクロロダイオキシンとなる。現在、我々は土壌細菌 *R. pickettii* の 2,4,6-の分解酵素遺伝子及びゲノム解析を行っている。分解にはどのような遺伝子がどのように分解に関わり、どのように分解調節されているかを調べている。

本研究では *R. pickettii* DTP0602 は全ゲノム解析がされているが、3-オキソアジピン酸 (3-OA)以降の分解遺伝子クラスターが 3 セット存在しいるがこれら遺伝子がどのように分解に関わっているかを調べた。3-OA は 3-OA CoA トランスフェラーゼと 3-OA CoA チオラーゼによって TCA 回路へ代謝される。今回は 3 ヶ所に存在する 3-OA CoA トランスフェラーゼ遺伝子(*hadE*)を破壊しその役割を検討した。

【方法】*R. pickettii* DTP0602 の各 3 遺伝子の破壊は pK18mobSacB を用い、抗生物質耐性遺伝子を挿入することによって取得した。遺伝子破壊の確認は PCR 法を用いた。これらの破壊株を用いて芳香族化合物での生育を調べ、どの遺伝子が分解にどのように関わっているのかを調べた。また、*hadEF* を広宿主域ベクターに組み込み相補させた。

【結果】ゲノム解析の結果から 2,4,6-TCP 分解遺伝子 *hadRXABC*、*hadSYD*、及び *hadE1F1G1* が染色体 2 の 400Mb 以内に存在していた。染色体 2 に存在する *hadE1F1* は主に安息香酸の分解に関わっており、染色体 1 に存在する *hadE2F2* はチロシンの分解に関わって可能性が予想された。染色体 3 に存在する *hadE3F3* は 2,4,6-トリクロロフェノールの分解に関わっていることが解った。3-OA から TCA サイクルへの分解に関わる *hadEFG* は類似の遺伝子 3 コピーが Chr 1,2,3 にそれぞれ存在していたが、別々の有機物の分解に関わっていることが明らかとなった。

chlorophenol, *Rakstonia pickettii*, 3-oxoadipate

講演番号：2C31p09
講演日時、会場：3 月 27 日 15:38～ C 校舎 31 会場

有機塩素系芳香族化合物ペンタクロロフェノール分解菌群 IK25 の機能解析

Metagenomic analysis of a pentachlorophenol-degrading consortium

○Yee Lii Mien[1]、沼田 充[2]、堀嵜 允文[1]、細山 哲[2]、山副 敦司[2]、八田 貴[3]、水口（鈴木） 千穂[1]、岡田 憲典[1]、山根 久和[4]、野尻 秀昭[1] ([1]東大・生物工学セ、[2]NITE、[3]岡山理大・工、[4]帝京大・バイオ)

○Lii Mien YEE[1], Mitsuru NUMATA[2], Tadafumi HORISAKI[1], Akira HOSOYAMA[2], Atsushi YAMAZOE[2], Takashi HATTA[3], Chiho SUZUKI-MINAKUCHI[1], Kazunori OKADA[1], Hisakazu YAMANE[4], Hideaki NOJIRI[1] ([1]Univ. of Tokyo, [2]NITE, [3]Okayama Univ., [4]Teikyo Univ.)

【背景・目的】有機塩素系農薬ペンタクロロフェノール(PCP)は木材保護剤、除草剤として 1930 年代に人工的に作られ、広く使用されてきた。後にその毒性、残留性が環境問題となり、PCP は 1990 に農薬登録失効し、PCP とその塩及びエステル類は現在ストックホルム条約の POPs 追加物質と提案されている。広範囲、低濃度の汚染を浄化するにはバイオレメディエーションが有効とされており、本研究では PCP 分解を行う分解菌（群）の取得と機能解析を目的とした。また、合わせて分解に有効な酵素の同定を行うと共に、自然界での分解遺伝子の拡散、代謝経路の進化について知見を得ることも目的とした。以前の本大会で、環境土壌から PCP 分解菌群の集積培養、単離について報告したが、それらの菌群から PCP 分解菌の単離に至らなかった。今大会では、そのうち一つの菌群のメタゲノム解析を行い、従来の 16S rDNA の PCR-DGGE 法による解析より網羅的に菌群構造を調べ、機能遺伝子の探索を試みた結果を報告する。

【方法・結果】PCP を完全分解した菌群から全ゲノムを精製し、Hiseq 1000 により塩基配列決定を行った。約 10^8 リードが得られ、16S rDNA PCR-DGGE 法と一致する２つの属種が見られたほか、*Burkhloderia* 属も検出され、この分解菌群は主に３つの属の細菌により構成されることが明らかになった。なお、16S rDNA の平均リード深度が *Burkhloderia* 属、*Hyphomicrobium* 属及び *Bradyrhizobium* 属それぞれで 940.77、1678.32 と 432.14 であった。

一方、機能遺伝子探索では、クロロフェノール類を分解できる既知の遺伝子配列を用い、検索した結果、*Burkhloderia* 属で報告されている 2,4,5-トリクロロフェノール(TCP)分解酵素(TftC、TftD)(1)と相同性が約 70%の配列が検出された。*Cupriavidus* 属、*Ralstonia* 属の 2,4,6-TCP 分解酵素とも高い相同性を示すため、当該遺伝子を PCP 分解菌群の全ゲノムから増幅し、大腸菌に異種発現させ、休止菌体により PCP と 2,4,6-TCP 分解試験を行った。その結果、反応後には基質（初期濃度 100 mM）が、それぞれ 90%以上、70%以上減少した。今回単離した当該酵素は、過去に解析された類似酵素と塩基配列レベルでは高い相同性を示しているが、酵素の基質特異性に違いが見られたことから、単離時に使用した基質（今回は PCP）の分解に適応するために変化（進化）したと考えられる。

(1) L. Xun. Purification and characterization of chlorophenol 4-monooxygenase from *Burkhloderia cepacia* AC1100. (1996) J. Bacteriol. 178(9): 2645.

Pentachlorophenol, biodegradation, consortium

講演番号：2C31p10
講演日時、会場：3 月 27 日 15:49～ C 校舎 31 会場

微生物によるトリクロサンの除去
Removal of Triclosan by Bacteria

○齋藤 さや[1]、小森谷 友絵[2]、吉野 悟[2]、坂本 恵一[2] ([1]日大生産工（院）、[2]日大生産工)
○Saya SAITO[1], Tomoe KOMORIYA[2], Satoru YOSINO[2], Keiichi SAKAMOTO[2] ([1]Industrial Technology of Nihon Univ. Master, [2]Industrial Technology of Nihon Univ.)

トリクロサン(5-Chloro-2-(2,4-dichlorophenoxyl)phenol) は、グラム陰性および陽性菌に対して抗菌性があり、歯磨き粉や薬用石鹸などのパーソナルケア製品に多く用いられ、廃水されている。生活排水中のトリクロサンは廃水処理により約95%が除去されている。一方で河川中には、9 ng/Lのトリクロサンが残存しており、薬剤耐性菌の出現や微生物生態系の撹乱、生体濃縮による人体への影響が示唆されている。そのため、パルス放電による分解方法や酸化還元酵素による分解法など様々な分解除去研究がされている。そこで、本研究は廃水処理の効率化を目的とし、微生物機能によるトリクロサンの除去を研究した。まずトリクロサン非感受性菌の単離培養および同定を行い、それら菌株のトリクロサン分解能を調査した。その後、それら微生物へのトリクロサンの吸着能に着目した研究を行った。

実験：一般環境中（新川、千葉用水総合管理所、千葉県八千代市八千代台北子供の森公園）から採集した土壌および水サンプルを PAS 培地（トリクロサンを唯一の炭素源として含む極貧栄養培地）に添加し、トリクロサン非感受性菌を選択的に培養した。その後、コロニーの形態の違いより菌体を釣菌し、6 種類のトリクロサン非感受性菌を得た。これらの菌の 16S rDNA をシークエンス解析した結果、2 種類が *Burkholderia* 属 、2 種類が *Acromobacter* 属、2 種類が *Stenotrophomonas* 属 であり、これらの菌はブドウ糖非発酵性グラム陰性桿菌に分類されることがわかった。なお、これらの菌は種が異なるため、以下 *Burkholderia* 1,2、*Acromobacter* 1,2、*Stentrophomonas* 1,2 と表記する。次に得られた菌を 10 ppm のトリクロサンを含む PAS 培地で 120 時間培養しトリクロサン分解能を評価した。培養中は 24 時間ごとに培養液を採取し、HPLC を用いてトリクロサン濃度を測定した。またその時に濁度（OD_{600}）を測定することで菌体濃度の指標とした。その結果、培養開始から 24 時間の間に 3 つの菌が急激なトリクロサン濃度の減少を示した。また菌体を培地に入れた直後のトリクロサンの濃度はそれぞれ *Burkholderia* 属が 2.6 ppm、*Acromobacter* 属が 3.1 ppm、*Stenotrophomonas* 属が 1.7 ppm であり、菌体がトリクロサンを吸着していると示唆した。そのため、メタノールを用いて 0 時間に採取された菌体からトリクロサンを抽出した。これを HPLC で測定した結果 2～4 ppm のトリクロサンが検出された。このことによりトリクロサンは菌体に吸着することがわかる。また抽出されたトリクロサンから 1 OD_{600} あたりの吸着量を求めた結果、これらの菌の中で最も高い吸着量を示したのは *Burkholderia* 2 であった。本研究により、*Burkholderia* または *Stenotrophomonas*、その菌体膜機能の利用により効率的なトリクロサン除去が示唆された。

Bacteria, Triclosan, Removal

講演番号：2C31p11
講演日時、会場：3 月 27 日 16:10～ C 校舎 31 会場

海洋由来の 1,4-ジオキサン分解性微生物

1,4-dioxane degrading bacteria derived from the ocean

○松井 稜太郎[1]、椎葉 究[1]、鎌田 泰彰[1]、榊原 風太[2]、高木 和広[2]([1]東京電機大理、[2]農業環境技術研究所)
○Ryotaro MATSUI[1], Kiwamu SHIIBA[1], Yatsuaki KAMATA[1], Futa SAKAKIBARA[2], Kazuhiro TAKAGI[2] ([1]Tokyo Denki Univ., [2]NIAES)

（目的、方法）1,4-ジオキサンは、主に有機塩素化合物の安定剤として、ワックス、化粧品、プラスチック等様々な製品に用いられている。国内では、H21 年 11 月に「健康保護に係る水質環境基準項目」及び「地下水環境基準項目」に追加され、基準値は、共に 0.05mg/L 以下と定められている。水に対する高い親和性と、VOC と比較して揮発性が低い性質であるため、化学工場付近の地下水を汚染する事例が確認されている。この 1,4-ジオキサンを浄化するにあたり、UV 照射やオゾン処理といった物理化学的処理法が有効であるとされているが、装置が高価であること、二次環境汚染の懸念、設置場所の確保が必要であり処理コストが高いなどのデメリットがある。一方、微生物によるバイオレメディエーションは、時間を要するものの低コストであり二次環境汚染のリスクが低く複雑な管理を必要としないメリットがある。近年、1,4-ジオキサンの分解能を持つ微生物が、ごく僅かではあるが陸圏で発見されている。本研究では陸圏より貧栄養状態かつ厳しい環境条件である海洋に生息する微生物を、1,4-ジオキサンのような環境汚染物質の生分解に利用するバイオレメディエーション法の研究を行っている。今回、土壌から迅速・簡便に難分解性有機汚染物質を集積・単離できる土壌・木炭還流法(Takagi et al.)を応用して、海水から 1,4-ジオキサン分解菌の集積・単離及びその特性について検討した。尚、還流液中の 1,4-ジオキサン濃度は、HPLC による測定法を開発し、継時的測定した。
（結果、考察）海水・木炭還流法による集積試験を開始してから 3～4 カ月後に還流液中の 1,4-ジオキサン消失速度が高まることが確認された。還流 154 日後の装置内の木炭を粉砕、緩衝液で懸濁し、10^{-5} 希釈液を 1,4-ジオキサンを唯一の炭素源とした添加した BSM 寒天培地に平板塗抹した。その結果、32 種類のコロニーが確認され、そのうち増殖速度が速いコロニーから分離した微生物の 1,4-ジオキサン分解能を比較した。その中で 1 種類だけ 1,4-ジオキサン分解能が極めて高いことが確認された(以下、その菌株を RM31 株とする)ので、その特性について検討した。RM31 株は、1,4-ジオキサン 1,000ppm を唯一の炭素源とした BSM 液体培地（好気培養）において、２日間で約 400ppm の 1,4-ジオキサンを分解することが確認された。また、生育 pH は 5 以下では分解活性は低下し中性～弱アルカリ（pH7～8）付近が至適であり、また生育温度は 20～25℃が適温であることが示された。RM31 菌株の SEM による観察では、放線菌の形態を確認することができた。更に RM31 株の 16S rRNA 遺伝子解析を行った結果、*Pseudonocardia* 属である可能性が高いことが示されたが、既知の分解菌株とは異なっている可能性も示唆された。

1,4-Dioxane, Sea water-chacoal perfusion method, Bioremediation

講演番号：2C31p12
講演日時、会場：3 月 27 日 16:21～ C 校舎 31 会場

2,6-ジニトロフェノール分解菌 *Burkholderia* sp. KU-64 株の分離と分解系遺伝子の解析

Isolation and genetic characterization of 2,6-dinitrophenol-degrading bacterium *Burkholderia* sp. strain KU-64 and its 2,6-dinitrophenol degradation pathway.

○小早 希、岩木 宏明、長谷川 喜衛 (関西大 化学生命工)
○Nozomi KOHAYA, Hiroaki IWAKI, Yoshie HASEGAWA (Kansai Univ.)

【目的】

ニトロフェノールは染料、農薬、爆薬の原料として大量に使用されており、毒性のある環境汚染物質として広く検出される。このことから、微生物を用いたバイオレメディエーションによる浄化が期待されており、バイオレメディエーション技術に資する微生物の研究が盛んに行われている。本研究では 2,6-ジニトロフェノール(2,6-DNP)分解菌を土壌より分離し、2,6-DNP 分解経路について検討した。

【方法・結果】

2,6-DNP を唯一の窒素源とした無機塩培地で集積培養を行い、2,6-DNP 分解菌(KU-64 株)を得た。本菌株の 16SrRNA 遺伝子配列を解析したところ、*Burkholderia terrae* に近縁な細菌であることがわかった。2,6-DNP の分解経路を推定するため、HPLC を用いて培養生成物を確認したところ、亜硝酸が蓄積することが分かった。この結果より、本菌株はニトロ基を還元せず、オキシゲナーゼの作用により直接遊離する経路で 2,6-DNP を分解することが示唆された。そこで初発酵素遺伝子を同定するため、クロロフェノールやニトロフェノールオキシゲナーゼの配列を基に作製したプライマーを用い、PCR による増幅を試みた。その結果、推定される約 500bp の断片を得た。得られた断片の塩基配列を解析したところ、推定アミノ酸配列がクロロフェノールやニトロフェノールモノオキシゲナーゼのものと相同性を有したことから、ニトロフェノールモノオキシゲナーゼの部分配列が得られたものと判断した。そこで、モノオキシゲナーゼ遺伝子および分解系遺伝子全域を取得するため、インバース PCR で周辺の増幅を試み、約 10kb の DNA 領域を取得した。この領域の塩基配列を解析した結果、9 個の *orf* が存在し、一部は *Cupriavidus necator* JMP134 株の 2,4,6-トリクロロフェノール分解系遺伝子群と高い類似性を示した。現在、これらの遺伝子が 2,6-DNP の分解に関与するかを確かめるため、大腸菌発現系の構築や遺伝子欠損株の造成を試みている。

2,6-dinitrophenol, degradation, *Burkholderia*

講演番号：2C31p13
講演日時、会場：3 月 27 日 16:32～ C 校舎 31 会場

Sphingomonas bisphenolicum AO1 株におけるビスフェノール A（BPA）分解遺伝子の探索と BPA 分解能の安定化に向けた研究

Molecular cloning of bisphenol-A (BPA) degradation genes and improvement of BPA bioremediation ability in *Sphingomonas bisphenolicum* AO1.

○中川 直也[1]、木場 悟[1]、松村 吉信[1,2]（[1]関西大学化学生命工、[2]関西大学 ORDIST）
○NAOYA NAKAGAWA[1], SATORU KOBA[1], YOSHINOBU MATSUMURA[1,2] ([1]Department of Life Science and Biotechnology Kansai Univ., [2]ORDIST, Kansai Univ.)

【目的】
ビスフェノール A（BPA）はポリカーボネート樹脂やエポキシ樹脂の原料などとして大量に用いられている合成化合物であるが、内分泌攪乱物質として生物に与える影響が大きいとも報告されている。実際に、カナダでは工場から環境への BPA 排出量が規制されているため、BPA の無毒化や分解処理技術の必要性が高まっている。当研究室では BPA を完全分解する *Sphingomonas bisphenolicum* AO1 株を単離している。この株は BPA 以外にその他のビスフェノール類化合物やビフェニル類化合物も分解できることから、合成化合物で汚染された環境の浄化にも利用可能であると予想される。しかし、BPA 分解能を失った自然突然変異株の AO1L 株が AO1 株の培養細胞より単離されるなど、その BPA 分解能は不安定である。また、AO1 株で予想される BPA 分解経路の中で 4-hydroxyacetophenone（4-HAP）の分解が律速段階であると示唆されている。本研究では、AO1 株の環境汚染物質分解能の向上とゲノム構造の安定化に向けて、その全ゲノム構造の解読し、AO1 組換え体による機能改善に取組んだ。
【方法と結果】
次世代シーケンサ（Roche 社製および Illumina 社製）を用いて AO1 株の全塩基配列を解読し、BPA 代謝の初期反応に関わる酵素遺伝子を持つ pBAR1 の遺伝子構造の推定を行った。pBAR1 には、推定 67 個の遺伝子がコードされており、そのうち 13 個がトランスポサーゼ遺伝子、21 個が接合伝達に関する遺伝子であり、これらが AO1 株の BPA 分解の不安定性に関わっていると考えられた。さらに、BPA 分解能の向上のため BPA 分解酵素遺伝子 *bisdAB* 組換え AO1 株を構築した。しかし、これら組換え体における BPA 分解能の向上は見られず、BisdA と BisdB の発現量の増加も確認されなかった。現在は pBAR1 上にコードされている 6 個の BPA 分解に関わる酵素遺伝子をクローニングして AO1 株に導入した。この遺伝子組換え体における *bisdAB* 発現量の測定と BPA 分解の安定性調査を行っている。また、4-HAP 分解に関与する 4-hydroxyacetophenone monooxygenase（HAPMO）をコードしている ORF の検索を行い、現在までに相同性の高い ORF を 4 つ確認している。この 4 候補遺伝子をクローニングし、4-HAP 分解能を調査するする予定である。

bioremediation, bisphenol A, *Sphingomonas sp.* (monooxygenase)

講演番号：2C31p14
講演日時、会場：3 月 27 日 16:43～ C 校舎 31 会場

海洋性フタル酸ジエチルヘキシル分解菌の分離と分解系遺伝子の解析

Isolation of di-2-ethylhexyl phthalate-degrading marine bacteria, and analysis of the phthalate-degrading gene cluster

○小西 健太、岩木 宏明、長谷川 喜衛 (関西大　化学生命工)
○Kenta KONISHI, Hiroaki IWAKI, Yoshie HASEGAWA (Kansai Univ.)

【目的】

海洋環境下におけるフタル酸エステルの生分解については十分な知見が得られていない。本研究では、海洋性細菌によるフタル酸分解機構についての知見を得るためにフタル酸ジエチルヘキシル資化性菌の分離、同定、および分解系遺伝子の解析を行った。

【方法および結果】

五島列島沖、越前沖、小笠原沖から採取した海水サンプルから集積培養法により、フタル酸ジエチルヘキシル資化性菌 4 菌株を分離した。これらの分離菌を 16SrRNA 遺伝子配列に基づき同定した結果、2 株は *Alteromonas* 属(KU24D1, KU24F1 株)、2 株は *Maricurvus* 属(KU24F2 株, KU41G2 株)に属する細菌であることがわかった。分離菌の中から最も生育の良い *Alteromonas* sp. KU24D1 株を選択し、以後の解析に用いた。まず、HPLC による代謝産物の解析およびフタル酸アナログ化合物を用いた簡易アッセイ法[1)]により代謝経路を推定した。その結果、フタル酸ジエチルヘキシルはフタル酸に変換後、4,5-ジヒドロキシフタル酸を経由する経路で、代謝されるものと推定された。次に、分解系遺伝子を解析するため、PCR により 4,5-ジヒドロキシフタル酸デカルボキシラーゼ遺伝子の部分配列(約 250bp)を増幅した。さらに分解系遺伝子全域の取得のため、インバース PCR 法で周辺領域の増幅を試み、約 17kbp の DNA 領域を取得した。この領域の塩基配列を解析した結果、フタル酸からプロトカテキュ酸への代謝に関与すると考えられる酵素遺伝子、および MarR タイプの制御遺伝子、膜輸送タンパク質をコードすると推定される遺伝子が見出された。現在、これらの遺伝子のフタル酸分解への関与を検討するため、酵素遺伝子について、大腸菌発現系の構築を試みている。

1)World J Microbiochnol(2012)28:1321-1325

diethylhexyl phthalate, degrading gene, marine bacteria

講演番号：2C31p15
講演日時、会場：3 月 27 日 16:54～ C 校舎 31 会場

放線菌 RHA1 株のビフェニル代謝に関与するタンパク質の新規同定と解析

Functional analysis of novel protein responsible for PCB/biphenyl metabolism in *Rhodococcus jostii* RHA1

○愛宕 祐基[1]、福田 雅夫[2]、原 啓文[3]、二見 淳一郎[1] ([1]岡山大院・自科、[2]長岡技科大、[3]マレーシア工科大)
○Yuki ATAGO[1], Masao FUKUDA[2], Hirofumi HARA[3], Junichiro FUTAMI[1] ([1]Okayama Univ., [2]Nagaoka Univ. Technol., [3]MJIIT UTM. Malaysia)

Rhodococcudu jostii RHA1 株 (RHA1 株)に存在する二成分制御系 BphS1T1 は、PCB/ビフェニルを感知して分解酵素遺伝子を活性化する必須な転写制御因子である。PCB は研究での使用でさえも禁止されているほど有毒な物質であるが、難分解性のため現在も環境中に多く残留している。本研究ではビフェニルを炭素源とした生育が可能である RHA1 株を用いて、PCB/ビフェニルの生分解経路の解明を目指している。

これまでの研究で、ChIP-chip 法を用いて全ゲノム上での BphT1 制御下遺伝子群の同定を進めた結果、ビフェニルで高発現している遺伝子群との比較から、ビフェニル応答時に BphT1 に依存的な発現が予想される既知分解酵素遺伝子に含まれない 6 つの遺伝子を特定した。さらにこれら 6 つの遺伝子の欠損株をそれぞれ作製し、ビフェニルを唯一炭素源とした最少塩液体培地での生育測定を行ったところ、1 つの遺伝子破壊株 (*ro10225* 遺伝子破壊株) のみで生育能の欠失が認められた。この結果は、既知ビフェニル代謝酵素遺伝子群以外の遺伝子がビフェニル生育に影響を示す初めての結果であり、未知の生理学変化を引き起こしていることを示唆している。また、ビフェニルを唯一炭素源とした培養中の RHA1 株の Ro10225 の分布を確認したところ菌体内だけでなく、菌体外にも Ro10225 を確認した。そこで大腸菌を用いて発現させた組換え Ro10225 タンパク質をビフェニル培養中の *ro10225* 遺伝子破壊株に直接添加し、生育を観察した。その結果、適当な濃度の Ro10225 タンパク質を添加すると、*ro10225* 遺伝子破壊株のビフェニル生育能が復帰することが明らかとなった。ビフェニルを唯一炭素源とした培養中の RHA1 株の培地上清には、Ro10225 タンパク質以外にも Ro10225 タンパク質の分解物らしきものといくつかのタンパク質が確認でき、これらのタンパク質が *ro10225* 遺伝子破壊株のビフェニル生育能の復帰に関与していることが示唆された。

今後、上記の培地上清に存在するタンパク質の RHA1 株における詳細な機能を解析することで、RHA1 株の PCB/ビフェニル分解の全容解明に繋がることが期待される。

Rhodococcus, RHA1, BphS1T1

講演番号：2C31p16
講演日時、会場：3 月 27 日 17:15～ C 校舎 31 会場

Anaerobic Benzene-Degrading Mechanism of *Azoarcus* sp. DN11
○YU ZHAI[1], Chiho SUZUKI-MINAKUCHI[1], Lii Mien Yee[1], Yuki KASAI[2], Yoh TAKAHATA[3], Kazunori OKADA[1], Hideaki NOJIRI[1] ([1]The Univ. of Tokyo, [2]Chuo Univ., [3]Taisei Corp.)

[Introduction]Monoaromatic hydrocarbons such as benzene, toluene and xylenes, are the main contaminants of gasoline pollution. Among them, benzene is particular health concern because of the high solubility and carcinogenicity. Aerobic benzene degradation has already been well studied. However the contaminated sites are usually anoxic due to low solubility and microbial consumption of oxygen, so it is meaningful to investigate anaerobic benzene degradation by microbes. There are three options proposed for anaerobic degradation of benzene: (a) methylation (b) hydroxylation (c) carboxylation, this study, we used anaerobic benzene degrader *Azoarcus* sp. DN11, which was isolated from gasoline contaminated aquifer, and searched the responsible anaerobic benzene degrading genes.
[Methods & Results] When we checked anaerobic benzene-degrading ability of DN11, toluene was detected as a product of benzene degradation, so it is highly possible that DN11 uses methylation pathway to degrade benzene anaerobically. In order to clarify the putative methyltransferase, the whole genome sequence of DN11 was determined using Mi-seq (Illumina) and 66 contigs were obtained after *de novo* assemble. These contigs were mapped against the partial genome of DN11 which was obtained by Sanger method 7 years ago, and 66 contigs were re-organized to 39. Although there were many repetitive sequences, 5 gaps were closed by Sanger method, finalizing to 34 contigs. After automatic annotation by MiGAP and manual confirmation, 10 genes encoding putative methyltransferases were found. To check the benzene-conversion ability of these enzymes, these genes were heterologously expressed in 4 different host strains (*Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Burkholderia multivorans and Comamonas* testosterone) and conversion of benzene to toluene was tested using resting cells reaction in aerobic condition. Now, we have not obtained the enzyme responsible for initial methylation of benzene by DN11. In addition to aerobic condition, we will try the conversion test in anaerobic condition using *E. coli* and *P. aeruginosa*. We are now trying to determine the transcriptional level of these putative methyltransferase genes under anaerobic benzene degradation condition.

benzene, bioremediation, anaerobic degradation

講演番号：2C31p17
講演日時、会場：3 月 27 日 17:26～ C 校舎 31 会場

Rhodococcus erythropolis IAM1399 のヒ素耐性遺伝子群の機能解析
Characterization of arsenic resistant gene clusters in *Rhodococcus erythropolis*
○宮内 啓介[1]、平田 一真[1]、福田 雅夫[2]、遠藤 銀朗[1] ([1]東北学院大工、[2]長岡技大工)
○Keisuke MIYAUCHI[1], Kazuma HIRATA[1], Masao FUKUDA[2], Ginro ENDO[1] ([1]Tohoku Gakuin Univ., [2]Nagaoka Univ. Tech.)

ヒ素は環境中では主に 3 価の亜ヒ酸および 5 価のヒ酸として存在しており、その毒性のため、ヒ素による土壌汚染、地下水汚染は地球規模で大きな環境問題となっている。細菌はヒ素耐性遺伝子群をもつことでその毒性を回避しており、我々は、高いヒ素耐性をもつ *Rhodococcus erythropolis* IAM1399 のヒ素耐性機構の全容解明を目的として研究を進めている。これまでの研究で、IAM1399 は既知のヒ素耐性遺伝子群と相同性を示す領域を 2 種類（ars1、ars2 領域）もつことが明らかになっている。細菌のヒ素耐性機構の多くは、ヒ酸を亜ヒ酸に還元する ArsC タンパク質、亜ヒ酸を菌体外に排出する ArsB タンパク質、ヒ素耐性遺伝子群の転写を制御する ArsR タンパク質から成っており、それに加えて、亜ヒ酸シャペロンとして働く ArsD タンパク質、ArsB と相互作用する ATPase である ArsA タンパク質をもつ場合もある。IAM1399 株の ars1 領域は *arsR1B1C1* 遺伝子群から、ars2 領域は *arsR2B2C2C3C4-orf11-arsD1A1* から成っているが、それらのヒ素耐性への関与の詳細は不明である。そこで今回の研究では、IAM1399 の ars 領域破壊株の作製とそれらヒ素耐性能の評価、および ars2 領域に存在する *ars* 遺伝子群のヒ素耐性への関与の評価を行った。ars1 および ars 領域の破壊は、相同組換えを用いて行った。各領域の破壊はサザン解析で確認し、確認された株をΔars1 株、Δars2 株、Δars1Δars2 株として以後の実験に用いた。各破壊株のヒ素存在下での生育を測定した結果、ars1、ars2 両領域ともヒ酸耐性に関与していること、亜ヒ酸耐性には ars2 領域の関与が大きいことが明らかとなった。また、ars1ars2 領域二重破壊株はヒ素耐性が失われたことから、この 2 つの領域のみが IAM1399 のヒ素耐性に関与していることが強く示唆された。次に、ars2 領域に存在する各遺伝子のヒ素耐性への関与を調べるために、ars2 領域をプラスミド上にクローニングし、そこから *arsD1A1*、および複数存在する *arsC* 遺伝子を欠失させたプラスミドを作製した。各プラスミドを、ヒ素耐性遺伝子を欠失させた *R. jostii* RHA1ΔarsRBC 株に導入し、ヒ素耐性能を測定した。その結果、*arsD1A1* 遺伝子群が亜ヒ酸耐性に強く関与していることが明らかとなった。また、ars2 領域に 3 種類存在する *arsC* に関しては、少なくとも *arsC2* がヒ素耐性に関与していないことが明らかとなった。

arsenic resistant gene, Rhodococcus

講演番号：2C31p18
講演日時、会場：3 月 27 日 17:37～ C 校舎 31 会場

ナメコ菌床栽培におけるゼオライトの放射性セシウム移行抑制効果
Control of radiocaesium transfer with zeolite in sawdust substrate cultivation of *Pholiota nameko*
○武井 利之[1]、村松 康行[2]([1]福島県林研セ、[2]学習院大学)
○ Toshiyuki Takei[1], Yasuyuki Muramatsu[2] ([1]Fukushima Pref. Forestry Research Center, [2]Gakusyuin Univ.)

［緒言］きのこの菌床栽培における菌床用培地及び菌床の放射性 Cs（^{134}Cs と ^{137}Cs の合計）濃度は、当面の指標値として 200Bq/kg（含水率 12%）と設定されている。福島県ではこれに準拠することはもとより、放射性 Cs 濃度の極めて低い菌床培地を使用するなど、適切な管理のもと生産されたきのこがモニタリング検査を受けながら出荷されている。本研究は生産者と消費者が更に安心してきのこを生産及び購入できることを目指して、きのこ（子実体）に含まれる放射性 Cs 濃度を限りなく低くするための栽培法を検討している。前報告[1)]において、培地から子実体に移行する放射性 Cs を抑制する物質を検索した結果、ゼオライト、水分散プルシアンブルー及び水分散亜鉛プルシアンブルー類似体の効果が極めて高いことがわかった。本報告ではゼオライトの効果的な使用方法を明らかにする目的で、2 種類のゼオライトを使用し、それらの粒度及び添加濃度を変えてナメコを栽培して放射性 Cs の移行抑制効果を比較した結果を報告する。
［実験方法］培地調製とナメコ栽培：菌床用培地は、放射性 Cs を含むオガ粉：フスマ：米ヌカを風乾重量比で 10:1:1 で混合した後ゼオライトを加えて撹拌し、含水率 65%となるように水道水を加えて調製した。これを 800ml 容広口栽培瓶に詰め、殺菌後株式会社キノックス製 KX-008 号を植菌した。培養後発生処理し、第 1 回発生の子実体を収穫した。ゼオライト：クリノプチロライト系としてジークライト株式会社製イタヤゼオライトを使用し、粒度 2-0.5 mm、0.5-0.1 mm、0.1 mm 以下の 3 区に分けた。モルデナイト系として日東粉化学工業株式会社製日東ゼオライトを使用し、粒度 1.9-0.8 mm、0.8-0.1 mm、0.1 mm 以下の 3 区に分けた。各ゼオライトの添加濃度は乾燥菌床用培地に対して 1%(w/w)及び 0.2%(w/w)とした。放射性 Cs の測定：放射性 Cs は PerkinElmer 製 2480WIZARD^2 オートガンマーカウンター（NaI 検出器）を使用して測定した。
［結果及び考察］菌床用培地にゼオライトを添加して栽培し、収穫した子実体の放射性 Cs 濃度を測定した結果、クリノプチロライト系を添加した場合、いずれの粒度でも 1%添加及び 0.2%添加でコントロールのそれぞれ約 1/4 及び約 3/4 であった。一方、モルデナイト系を添加した場合、子実体の放射性 Cs 濃度はいずれの粒度及び濃度でもクリノプチロライト系を添加した場合と類似した値を示した。放射性 Cs の移行抑制に添加時のゼオライトの粒度の影響は少なく、クリノプチロライト系もモルデナイト系も同等の放射性 Cs 移行抑制効果が期待できると考えられた。
1)武井他：日本きのこ学会第 17 回大会発表要旨集 A-7 (2013)

radiocaesium, zeolite, *Pholiota nameko*

講演番号：2C31p19
講演日時、会場：3 月 27 日 17:48～ C 校舎 31 会場

生物学的処理および光触媒・boron-doped diamond 電極ハイブリッド式汚水浄化システムの構築とその殺菌性能および有機物分解能の評価

Evaluation of hybrid wastewater purification system using biological treatment, photocatalyst and boron-doped diamond electrode

○佐藤 俊貴[1]、落合 剛[2,3]、森戸 祐幸[4]、藤嶋 昭[2,3]、鈴木 智順[1,2] ([1]東理大・応用生物、[2]東理大・総研、[3]神奈川科学技術アカデミー、[4]ユーヴィックス株式会社)
○Toshiki SATOU[1], Tsuyoshi OCHIAI[2,3], Yukou MORITO[4], Akira FUJISHIMA[2,3], Tomonori SUZUKI[1,2] ([1]Tokyo University of Science, Department of applied Biological Science, [2]Tokyo University of Science, Research Institute for Science & Technology, [3]Kanagawa Academy of Science and Technology, [4]U-VIX CORPORATION)

【目的】生活汚水による生態系への悪影響などを防ぐため、一般にさまざまな汚水処理の技術が存在するが、それらの処理技術について、処理に要するコストが高いことやトリハロメタン等の有害物質を発生させてしまうといった問題が指摘されている。これらの問題を解決する手段として、光触媒や boron-doped diamond (BDD)電極を利用した化学的処理技術が注目されている。そこで本研究では、汚水に含まれる有機物や微生物を生物学的に処理し、その後、光触媒および BDD 電極を用いることで、より環境への負荷の少ないハイブリッド式汚水浄化システムを構築することを目的とした。

【方法】まず、殺菌性能を評価するために、*Escherichia coli* 懸濁液に対して、酸化チタンに UVA を照射して生じる光触媒反応および BDD 電極による電気分解反応をそれぞれ作用させた。そして、一定時間ごとに *E. coli* 懸濁液を回収し、コロニー計数法により経時的な *E. coli* 生菌数の減少を計測した。次に、当研究室に設置されている循環型汚水浄化装置の処理水に対して、光触媒反応および BDD 電極をそれぞれ作用させ、一定時間ごとに COD および TOC を測定し、有機物分解能を評価した。さらに、どのような細菌が本研究で構築したハイブリッド式汚水浄化システムで殺菌、除去されているのかを調べるために、16S rRNA 遺伝子を用いた PCR-DGGE 法を行った。

【結果】本研究では、光触媒反応および BDD 電極による電気分解反応を併用したハイブリッド式汚水浄化システムの構築に向けた殺菌性能および有機物分解能の評価を行った。その結果、*E. coli* を用いた殺菌性能の評価において、光触媒を単独で作用させた場合は UVA 照射開始 1 時間後に約 90 % 、BDD 電極を単独で作用させた場合および光触媒と BDD 電極を併用した場合は反応開始 1 時間後に約 99.9 %の *E. coli* が死滅した。さらに、有機物分解能の評価において、光触媒を単独で作用させた場合および光触媒と BDD 電極を併用した場合において、COD や TOC の減少をそれぞれで確認することができた。特に、光触媒と BDD 電極を併用した場合の方が高い有機物分解能を示した。以上の結果から、光触媒による酸化反応と BDD 電極による電気分解反応の併用システムが、より高い殺菌性能および有機物分解能を発揮することが示唆された。処理水の細菌叢が本ハイブリッド式汚水浄化システムでどのように変化したのかについても合わせて報告する予定である。

photocatalyst, Boron-doped diamond, wastewater

講演番号：2C25a02
講演日時、会場：3 月 27 日 09:11～ C 校舎 25 会場

Developing drug delivery and therapy platform using virus like particles displaying short chain fragment region and interleukin-2 against colon carcinoma

○Vipin Kumar Deo, Tatsuya Kato, Park Enoch Y (Shizuoka Univ.)

Nano-biomaterials like enveloped virus like particles (VLPs) play important role in rapidly evolving drug delivery systems (DDS) platforms and with specificity to target colon cancer cells. DDS when complemented with activation of immune system can result in a better therapy for patients suffering with colon carcinoma. Here we propose producing VLPs made using group antigen protein (gag) and capsid protein from Rous sarcoma virus in silkworm expression system. Both glycophosphatidylinositol (GPI) anchored short chain fragment region (rscFvs) and hemagglutinin (HA) transmembrane region anchored interleukin-2 (IL2) were displayed on the surface of VLPs. Three types of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus (BmNPV) bacmid, encoding RSV-gag, IL2 and rscFvs cDNA, were co-injected into silkworm larvae to produce VLPs-rscFv-IL2. At 7 days post-injection, hemolymphs were collected and proteins purified using DDDDK affinity column. One milligrams of VLP-rscFv-IL2s was purified from 30 silkworms and there composition was confirmed by standard western blotting by probing the membrane with specific antibodies against gag capsid protein, IL2 and FLAG affinity tag from rscFvs. GPI anchored tumor targeting scFv targets tumor associated glycoprotein-72 (TAG-72) a marker protein, thus providing the specificity to the VLP-rscFv-IL2 platform. The antigenicity and GPI anchor of rscFvs on VLP-rscFv-IL2s was confirmed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using TAG-72 as antigen and Phospho inositol lipase C (PI-PLC), respectively. The rIL-2 (using HA anchor) on VLP-rscFv-IL-2 ability to recognize the IL-2 receptor were also confirmed by ELISA, respectively. The morphology and diameter of the VLP-rscFv-IL2s were confirmed by transmission electron microscope and dynamic light scattering, respectively, showing smooth particle size of approximately 50 nm. Our study has shown that VLPs with HA and GPI anchors produces VLPs with 50% smaller diameter. Here silica disc with average pore size of 7μm was used as a support to culture colon carcinoma cells as a model for tumor. The VLP-rscFv-IL2 specifically bound to colon cancer cells, attracted macrophages (humanTHP-1 cells), and secreted tumor necrosis factor-α (TNF-α) a cytokine necessary to destroy the cancer cells. The expression levels of TNF-α were confirmed by ELISA and confocal scanning laser microscopy showing the potential of VLP-rscFv-IL2 as intelligent nano-biomaterials capable of activating innate immune system and also serve as DDS.

drug delivery system, virus-like particle, silkworm expression system

講演番号：2C25a03
講演日時、会場：3 月 27 日 09:22～ C 校舎 25 会場

細胞膜透過ペプチド：ポリヒスチジン(H16)の細胞内挙動の解析
Analysis of intracellular behavior of "Poly-histidine peptide(H16)"
○小竹 彩香、徳田 佳久、河野 強、岩崎 崇（鳥取大農）
○Ayaka KOTAKE, Yoshihisa TOKUDA, Tsuyoshi KAWANO, Takashi IWASAKI (Tottori Univ.)

【背景・目的】これまでに、我々の研究室では、ヒスチジンのみが連続したポリヒスチジン(H16：HHHHHHHHHHHHHHHH-NH_2)が既存の細胞膜透過ペプチドよりも高い細胞膜透過を示すことを明らかにした。また、H16 の細胞膜透過は、マクロピノサイトーシスを主とするエンドサイトーシス経路であることも明らかにした。しかし、H16 が細胞内に輸送されてからどのような挙動を示すのかは未解明のままであった。そこで本研究では、H16 ペプチドおよび H16 融合タンパク質を用いて、H16 の細胞内挙動の解明を試みた。
【方法・結果】H16 ペプチドの N 末端を Tetramethyl rhodamine (TAMRA：赤色蛍光色素)標識した『TAMRA-H16』と H16 の N 末端に緑色蛍光タンパク質 (GFP)を融合した『GFP-H16』を、それぞれ化学合成及び遺伝子工学的手法により調製した。TAMRA-H16 及び GFP-H16 をヒト繊維肉腫細胞株 HT1080 に処理し、細胞内局在を解析した。その結果、TAMARA-H16 及び GFP-H16 は細胞内へ取り込まれた後、その大部分がゴルジ体及びリソソームに局在することが明らかになった。また、GFP-H16 は調製過程において、Ni 樹脂を用いた精製、および抗 His-tag 抗体による検出が可能であったことから、タンパク質に付加した H16 配列は Protein Transduction Domain (PTD)、および His-tag としての二重機能を持つことが明らかとなった。
以上の解析により、H16 ペプチド及び H16 融合タンパク質の大部分はゴルジ体・リソソームに局在することが明らかになったが、細胞質移行の有無を調べるために、H16 と生理活性ペプチドの複合体を用いて解析した。細胞質においてミトコンドリアを傷害し、アポトーシスを誘導する生理活性ペプチド：Pro-apoptotic domain (PAD：KLAKLAKKLAKLAK)を、H16 の N 末端に融合した『PAD-H16』を化学合成した。HT1080 細胞株に対するアポトーシス誘導活性を、細胞生存率(ミトコンドリアの還元活性)を指標として測定した。その結果、PAD 単独では細胞毒性を示さなかった一方で、PAD-H16 は濃度依存的な細胞毒性を示した(IC_{50}=61.5μM)。しかし、活性が非常に低かったことから、PAD-H16 の細胞質移行(エンドソームからの脱出)が十分でないことが考えられた。
そこで、エンドソーム崩壊ペプチド (INF7：GLFEAIEGFIENGWEGMIDGWYG)を H16 の N 末端に融合した『INF7-H16』を調製し、H16 の細胞質移行(エンドソーム脱出)に与える影響を解析した。その結果、INF7-H16 の共投与は、TAMRA-H16 及び GFP-H16 を細胞質中に拡散させる効果があることを確認した。この結果から、INF7-H16 の共投与は、H16 を融合した生理活性ペプチドまたはタンパク質の細胞質移行を促進し、活性を増強させることが期待された。

cell-peneterating peptide, histidine, protein transduction

講演番号：2C25a04
講演日時、会場：3 月 27 日 09:33～ C 校舎 25 会場

ポリヒスチジン(H16)修飾リポソームの開発と機能解析

Development and functional analysis of "Poly-histidine (H16)" modified liposome

○品川 松美、小竹 彩香、河野 強、岩崎 崇（鳥取大農）
○Matsumi SHINAGAWA, Ayaka KOTAKE, Tsuyoshi KAWANO, Takashi IWASAKI (Tottori Univ.)

【背景・目的】　当研究室では、ヒスチジンのみが連続したポリヒスチジン(H16:HHHHHHHHHHHHHHHH-NH_2)が既存の細胞膜透過ペプチドよりも高い細胞膜透過を示すことを明らかにした。そこで本研究では、薬物輸送(DDS)のキャリアーとして注目されているリポソームの表面を、新しい細胞膜透過ペプチド：ポリヒスチジン(H16)で修飾する事によって、高機能な DDS キャリアーの開発を目指した。

【方法】　Dioleoylphosphatidylcholine (DOPC)とCholesterolを10:1のmol比で混合したリポソームに、緑色蛍光色素Fluoresceinを内包した。そこへ、ポリヒスチジン(H16)のN末端をステアリン酸($C_{17}H_{35}COOH$)で修飾したステアリル化ポリヒスチジン(STR-H16)を導入し、ポリヒスチジン(H16)修飾リポソーム(H16-Lipo)を調製した。ヒト繊維肉腫由来細胞株HT1080におけるH16-Lipoの細胞内取り込みを、共焦点レーザー顕微鏡およびフローサイトメーターにより解析した。この際、リポソームへのSTR-H16の導入条件および、H16-Lipoの細胞内取り込み条件の最適化を行った。H16-Lipoの細胞内取り込み機構を解析するために、上記で決定した最適条件において、血清の存在、温度条件、各種エンドサイトーシス阻害剤がH16-Lipoの細胞膜透過へ与える影響を解析した。また、細胞内に取り込まれた後のH16-Lipoの細胞内局在を調べた。さらに、計6種の培養細胞株を用いて、H16-Lipoの細胞選択性を解析した。

【結果・考察】　H16-Lipoの細胞内取り込みの最適条件化において、STR-H16をリポソームへ20%(DOPCに対するmol比)導入し、細胞に対して3時間処理した際に最も高い細胞内取り込みが測定された。この条件下において、低温条件(4℃)および各種エンドサイトーシス阻害剤は、H16-Lipoの細胞内取り込みをそれぞれ約90%および約15~25%阻害した。一方で、血清の有無にかかわらず、H16-Lipoは一定の細胞内取り込みを示した。また、細胞内へ取り込まれたH16-Lipoはゴルジ体・リソソームに局在することが明らかとなった。細胞選択性について検証した結果、H16-Lipoは付着系細胞株に対して高い細胞内取り込みを示し、特にヒト神経膠腫細胞株U251に対して最も高い細胞内取り込みを示した。

以上の結果から、H16-Lipoの細胞内取り込みには、エネルギー依存的なエンドサイトーシスが複合的に関与していることが示唆された。また、H16-Lipoは血清の影響を受けないことから、血中内での高い滞留性・安定性が期待された。さらに、H16-Lipoは細胞内においてゴルジ体・リソソームに局在することから、これらの細胞小器官をターゲットとしたDDSへの利用が期待される。現在、薬剤を内包したH16-Lipoを調製し、さらなる有用性について検証中である。

cell-penetrating peptide, histidine, liposome

講演番号：2C25a05
講演日時、会場：3 月 27 日 09:44～ C 校舎 25 会場

植物・酵母細胞に対するポリヒスチジンの細胞壁・細胞膜透過の解析
Analysis of cellular uptake of Poly-histidine peptides in plant and yeast cells
○木村 さやか、河野 強、藪田 行哲、岩崎 崇（鳥取大農）
○Sayaka KIMURA, Tsuyoshi KAWANO, Yukinori YABUTA, Takashi IWASAKI (Tottori Univ.)

【背景・目的】これまでに当研究室では、ヒスチジンのみが連続したポリヒスチジン(特に 16 アミノ酸残基以上の鎖長)が既存の細胞膜透過ペプチドよりも高い細胞膜透過を示すことを明らかにした。しかし、上記は動物細胞に対してのみの知見であり、細胞壁を有した植物細胞および酵母に関しては未確認であった。そこで、本研究では植物細胞および酵母に対するポリヒスチジンの細胞壁・細胞膜透過を解析し、細胞壁を有した細胞に対する効率的な細胞内分子輸送技術の開発基盤研究を行う。
【方法・結果】様々な鎖長のポリヒスチジン(6~24 アミノ酸残基)を化学合成し、C 末端をアミド化修飾、N 末端を赤色蛍光色素 Tetramethyl rhodamine (TAMRA)で標識した。これらのペプチドを用いて、ヒスチジン残基数と細胞壁・細胞膜透過の関連性を、植物細胞(タバコ培養細胞：BY-2)および酵母細胞(NMY57)を用いて解析した。その結果、大変興味深いことに、動物細胞に対しては長鎖のポリヒスチジンが高い細胞内移行を示したのに対して、BY-2 および酵母に対しては短鎖のポリヒスチジン(特にヒスチジン 8 残基の H8:HHHHHHHH-NH_2)が高い細胞内移行を示した。一方で、長鎖のポリヒスチジンでは細胞壁への吸着性が高くなり、細胞内移行率が低下した。この原因として、ポリヒスチジンの鎖長が長くなるに従って正電荷が増加し、負電荷を帯びた細胞壁への吸着性が上昇するためと考えた。

そこで、ポリヒスチジンの細胞壁・細胞膜透過において、ポリヒスチジンの電荷および細胞壁の関連性を解析するために、BY-2 を用いて pH5.8(ヒスチジンが正電荷を帯びる条件)と pH7.4(ヒスチジンが正電荷を帯びない条件)の両条件における細胞壁・細胞膜透過の評価を行った。その結果、pH5.8 では短鎖ポリヒスチジンは細胞内移行を示し、長鎖ポリヒスチジンは細胞壁へ吸着した一方で、pH7.4 では短鎖・長鎖ポリヒスチジンともに一切の細胞壁吸着・細胞内移行を示さなかった。さらに、プロトプラスト化処理を行い、細胞壁を取り除いた後にポリヒスチジン処理を行ったところ、全てのポリヒスチジンにおいて一切の細胞壁吸着・細胞内移行は認められなかった。以上の結果から、短鎖ポリヒスチジンの細胞内移行には『①ポリヒスチジンが正電荷を帯びること』と『②細胞壁の存在』の二条件が必要であることが明らかとなった。

さらに、短鎖ポリヒスチジン(H8)の細胞内局在を解析した結果、ポリヒスチジン(H8)は BY-2 細胞内においては核には局在せず、細胞質全域に拡散することが分かった。現在、ポリヒスチジン(H8)に緑色蛍光タンパク質(GFP)を融合した GFP-H8 を調製し、細胞壁を有した細胞に対するポリヒスチジン(H8)を利用した細胞内分子輸送に関する検証を行っている。

cell-penetrating peptide, histidine, cell wall

講演番号：2C25a06
講演日時、会場：3 月 27 日 10:05～ C 校舎 25 会場

FT-IR ATR によるタンパク質三次構造変化の簡易定量化

Simple quantification of tertiary structural change of proteins by FT-IR ATR

鈴木 克生、○吉田 洋一 (宇部興産(株))
Katsuki Suzuki, ○Youichi Yoshida (UBE Industries,LTD.)

【背景と目的】

酵素などの機能性タンパク質は、一般的に熱や極性溶媒に弱く、従って、固定化による凝集抑制や賦活処理によって長寿命化が図られている。このような分野では、タンパク質の劣化度評価が不可欠であり、多くの場合、モデル反応の成績に基づく評価が採用されている。しかし、比活性に基づいた評価は、劣化度とタンパク質物性との相関が不明瞭、または可逆･不可逆的変性の区別が出来ない、といった課題を有している為、経験則に頼る部分が大きかった。そこで本研究では、汎用性高い、各種機能性タンパク質の二次構造変化を赤外分光法(IR)で観察し、より正確、且つ簡便な劣化度評価法の開発を行った。

【方法】

固定化酵素として、Novozym-435 (10 wt% Lipase CALB/ Lewatit VP OC 1600)、1.6 wt% Lipase PS Amano/ Lewatit VP OC 1600、および 2.6 wt% 西洋わさびペルオキシダーゼ/ メソポーラスシリカ、他方、非担持抗体として、抗ニワトリ IgG ウサギ抗体を使用した。それぞれのサンプルを、熱、極性溶媒、または酸処理等で変性させた後、固定化リパーゼはエステル交換反応、固定化ペルオキシダーゼは *o*-phenylenediamine の酸化反応、抗体は直接吸着法 ELISA で、それぞれの比活性、結合活性を測定した。各サンプルの IR スペクトルは ATR 法によって測定し、ガウス関数でバンド半値幅 (FWHM) を導出した。

【結果】

各種変性処理によって比活性が低下した、固定化酵素 (Lipase or Peroxidase)、および非担持抗体 (IgG)の、Amide 領域の IR スペクトルを観察した結果、比活性低下に伴う IR バンドのブロードニングが観察された。そこで、Amide I (or II)バンドの FWHM に対して比活性をプロットした結果、全てのサンプルで、両者間に負の相関が観られた。

他方、Lipase PS Amano を触媒とした場合、触媒中の水分が 1 wt%より少ないと、比活性が大幅に低下する現象(可逆的変性)が観察された。この場合、水分の有無による Amide I バンドの FWHM に変化は無く、従って、FWHM は不可逆的変性の度合いを選択的に示すと推定される。

以上の結果より、タンパク質の二次構造変化を、Amide バンドの FWHM 変化で近似する事で、不可逆的変性の度合いを簡便に数値化出来る事が分かった。

FT-IR ATR, tertiary structural change of proteins, Simple quantification

講演番号：2C25a07
講演日時、会場：3 月 27 日 10:16～ C 校舎 25 会場

蛍光レドックスプローブ Redoxfluor の高感度変異体の開発

Development of highly sensitive mutants of Redoxfluor, the fluorescent redox probe

○北村 万里[1]、寶関 淳[1,2]、阪井 康能[1,2] ([1]京大院農、[2]京大・生理化学)
○BANRI KITAMURA[1], JUN HOSEKI[1,2], YASUYOSHI SAKAI[1,2] ([1]Grad. Sch. of Agric., Kyoto Univ., [2]Res. Unit for Physiol. Chem., Kyoto Univ.)

我々は、以前、細胞内の酸化還元状態を可視化するタンパク質性の蛍光プローブ Redoxfluor を開発した(Yano *et al.* 2010)。Redoxfluor は出芽酵母の酸化ストレス応答性転写因子である Yap1 のストレス応答に関わる C 末端側の cysteine rich domain（c-CRD）をタンデムに接続したセンサー領域と、その N 末端側に CFP 改変体である Cerulean を、C 末端側に YFP 改変体である Citrine を有しており、センサー領域のレドックス依存的な構造変化を CFP-YFP 間の蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）効率として提示することで細胞内レドックス状態を可視化する。Redoxfluor は、グルタチオンの酸化還元状態を検出する roGFP と異なり、活性酸素種やグルタチオンと並び、細胞内の主要なレドックス因子である thioredoxin に対する感受性を有する(Yano *et al.* 2010, Oku *et al.* 2013)。最近、Redoxfluor を用いることで、プロテアソーム阻害が細胞死に引き起こす機構と食品由来の抗酸化剤によるその抑制を明らかにした(Sunita *et al.* 2014)。

本研究では、Redoxfluor の検出感度をさらに向上させるために Citrine の円順列変異を導入し、Cerulean との位置関係を変化させた。円順列変異とは、タンパク質の N 末端と C 末端を接続し、別の位置に新たな N 末端と C 末端を形成させる変異法である。緑色蛍光タンパク質（GFP）およびその改変体に対する円順列変異の導入は、タンパク質全体の構造や蛍光特性をほとんど変化させないことが既に知られている。Redoxfluor において数種類の Citrine の円順列変異を導入したところ、C-probe のレドックスポテンシャル変化させることなく、レドックスに対する FRET 効率のダイナミックレンジを約 3 倍に拡大させた改良型 C-probe を得ることができた。Redoxfluor を用いたレドックス検出は、これまで蛍光顕微鏡を用いる必要があったが、ダイナミックレンジを向上させたことで蛍光プレートリーダーを用いたレドックスモジュレーターのハイスループットな探索等に利用できるものと期待される。

redox, fluorescent probe, protein engineering

講演番号：2C25a08
講演日時、会場：3 月 27 日 10:27～ C 校舎 25 会場

赤・遠赤色光スイッチ型 cAMP 合成酵素の開発

Development as cAMP-synthetic red/far-red light switches

○伏見 圭司[1]、榎本 元[2]、池内 昌彦[2]、成川 礼[1,3]（[1]静大・理学、[2]東大・教養、[3]JST・さきがけ）
○Keiji FUSHIMI[1], Gen ENOMOTO[2], Masahiko IKEUCHI[2], Rei NARIKAWA[1,3] ([1]Shizuoka University, [2]University of Tokyo, [3]JST PRESTO)

【目的】光は、時間的・空間的な分解能が高く、「波長」と「強度」の２つのパラメーターを制御できるツールである。この様な利点から、近年、光受容体となるタンパク質を遺伝学的な手法で特定の細胞や組織に発現させ、光操作により生物活性を制御する光遺伝学（オプトジェネティクス）が急速に発展している。中でも、様々な生物に存在し、多様な生物応答を誘引するセカンドメッセンジャーである cAMP の産生は、アデニル酸シクラーゼ (AC) による合成とホスホジエステラーゼによる分解によって調節され、これらの活性を光遺伝学的に制御する試みが近年報告されている。[1, 2)] シアノバクテリアにおいて、*Anabaena* sp. PCC 7120 に由来する CyaB1 は、GAF / GAF / PAS / CYCc のドメインで構成されている AC である。また、その菌種や *Acaryochloris marina* MIBC11017 に由来するシアノバクテリオクロム (CBCRs) は、ビリン色素を結合する GAF ドメインをもつ光受容体で、ビリベルジン (BV) を結合することで遠赤色光、フィコシアノビリン (PCB) を結合することで赤色光を感知する機能をもつ。[3, 4)] 本研究では、Cya B1 の GAF ドメインを CBCRs の GAF ドメインに置き換えることで、遠赤色光または赤色光で活性をスイッチできる AC を開発することを目的とした。

【方法】各種 CBCRs の GAF ドメインと CyaB1 の AC 活性部位の PAS / CYCc ドメインを連結し、ヒスタグ融合タンパク質として発現するコンストラクトを作製した。各種プラスミド DNA を BV 産生大腸菌または PCB 産生大腸菌に形質転換し、目的のキメラタンパク質を発現させ、精製した。それぞれのキメラタンパク質の光変換を吸収スペクトルの測定によって確認し、これらの情報をもとに、光制御の下で AC 活性を継時的に測定した。

【結果】*Anabaena* に由来する AnPixJ および *Acaryochloris* に由来する AM1_1557、AM1_C0023 のそれぞれの GAF ドメインに置き換えたキメラタンパク質を作製し、光操作によって AC 活性を制御することに成功した。現在、GAF ドメインやリンカー領域の改変を行うことで、より高性能の遠赤色光または赤色光スイッチ型 AC の創出を試みている。

1) Carlos Gasser *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **111** (24), 8803-8808 (2014).
2) Min-Hyung ryu *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **111** (28), 10167-10172 (2014).
3) Narikawa Rei *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **110** (3), 918-923 (2013).
4) Narikawa Rei *et al.*, *Sci. Rep.*, Submitted.

adenylate cyclase, cyanobacteria, optogenetics

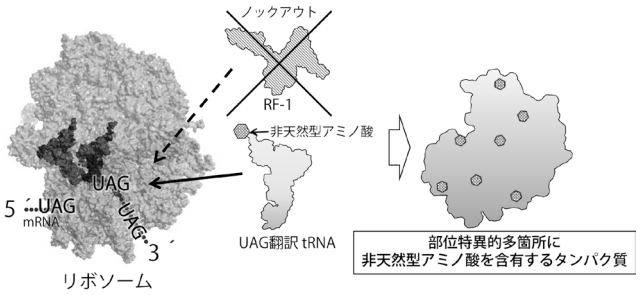
講演番号：2C25a09
講演日時、会場：3 月 27 日 10:38～ C 校舎 25 会場

部位特異的多箇所へのハロゲン化チロシン導入による新規タンパク質安定化法
Protein stabilization with multiple-site integrations of halogenated tyrosines

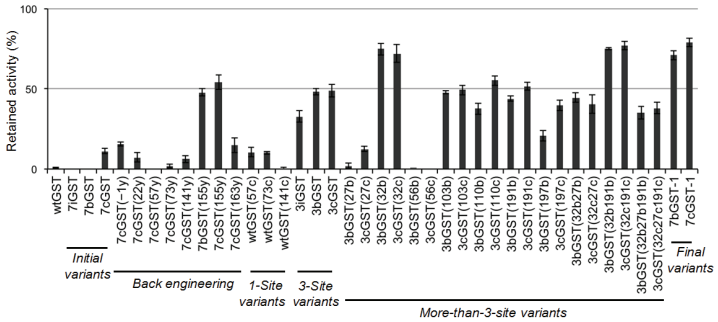
○大竹 和正[1]、山口 純[1]、春木 満[2]、坂本 健作[1] ([1]理化学研究所　ライフサイエンス技術基盤研究センター、[2]日大工)
○Kazumasa OHTAKE[1], Atsushi YAMAGUCHI[1], Mitsuru HARUKI[2], Kensaku SAKAMOTO[1] ([1]RIKEN Center for Life Science Technologies, [2]Nihon Univ.)

われわれは、これまでに翻訳終結因子 1(RF-1)遺伝子を破壊し、UAG 終止コドンを非天然型アミノ酸へと再定義した大腸菌株(RFzero 株)の開発を行ってきた。この株を用いることにより既存の方法では実現されなかった、部位特異的かつ多数箇所へと非天然型アミノ酸を導入したタンパク質の生体内での生産を可能とした(図左)。本発表では、タンパク質工学における重要な課題である安定化変異体の取得に向けた RFzero 株を用いた新規なアプローチについて報告する。

まず、グルタチオン-*S*-トランスフェラーゼ(GST)の 15 残基のチロシン残基のうち 7 箇所をハロゲン化チロシン(3-ブロモチロシン、3-クロロチロシン)へと置換し、わずかに熱安定化した変異体の取得に成功した(図右)。更に、不安定化に寄与する置換の除去、加算的に安定化に寄与する部位の特定を経て野生型 GST に比べて顕著に安定化したハロゲン化 GST の作製に成功した。最終的にハロゲン化を行わなかったチロシン残基には活性または構造安定性に不可欠な部位が含まれており、このハロゲン化 GST の生産は既存の手法では実現されない。さらに、X 線結晶構造解析及び FMO 計算を用いてハロゲン分子が主に、タンパク質内部の空隙を充填し *van der Waals* 力によって構造を安定化していることを明らかにした。本法は、従来の手法とは異なる基盤に基づく安定化法であり、従来の進化工学的手法とも併用可能な筋道だったタンパク質安定化へのアプローチを提供するものである。



RFzero株による非天然型アミノ酸導入の模式図



60℃ 10min 熱処理後の残存活性

1. Sakamoto, K., Murayama, K., Oki, K., Iraha, F., Kato-Murayama, M., Takahashi, M., Ohtake, K., Kobayashi, T., Kuramitsu, S., Shirouzu, M. and Yokoyama S., "Genetic encoding of 3-iodo-L-tyrosine in *Escherichia coli* for single-wavelength anomalous dispersion phasing in protein crystallography", *Structure* **17,** 335-344 (2009).
2. Mukai, T., Hayashi, A., Iraha, F., Sato, A., Ohtake, K., Yokoyama, S. & Sakamoto, K., "Codon reassignment in the *Escherichia coli* genetic code", *Nucleic Acids Res.*, **38**, 8188-8195 (2010).

Protein engineering, Non-natural amino acid, Expanding genetic code

講演番号：2C25a10
講演日時、会場：3 月 27 日 10:49～ C 校舎 25 会場

アルギニン側鎖グアニジノ基に導入したフルオラス Boc 基(FBoc 基）の脱保護条件の検討

Study on the deprotection conditions of the fluorous group for guanidine function of Arg

○赤司 里奈、稲津 敏行（東海大工）
○RINA AKASHI, TOSHIYUKI INAZU (Tokai Univ.)

【はじめに】

ペプチド合成には未解決の問題が残されている。例えば、アルギニン残基の場合、側鎖グアニジノ基の求核性が極めて高く、ω, ω’位を Boc 基で保護した Fmoc-Arg(Boc)$_2$-OH ですら混合酸無水物に導いた際に分子内でアシル化し、δ－ラクタム誘導体を 40%の収率で形成することが知られている[1)]。我々は、パーフルオロオクチル基を有するフルオラス Boc(FBoc)基で“フルオラス障害”を形成し、Fmoc-Arg(FBoc)$_2$-Phe-OBn の合成(イソブチルクロロホルメート)では、ラクタム体の副生を 9%にまで抑えることに成功した。しかしながら、この FBoc 基の脱保護には一般的なペプチド合成の脱保護条件である 95%トリフルオロ酢酸では 24 時間で 92%と実用的ではない。そこで本研究では FBoc 基の脱保護条件の検討を行った。

【実験方法及び結果】

FBoc 基の脱保護に時間が要する原因としてパーフルオロオクチル基が自己集積する“フルオラス障害”により、反応性が抑制させていると考えられる。反応を促進するために、フルオラス基同士の自己集積効果を減少し、また反応速度をプロトン濃度を上げることで高める必要がある。そこで、フルオラス溶媒である Novec($C_4F_9OCH_3$)の添加効果と、水の代わりに塩酸を用いた様々な条件で Fmoc-Arg(FBoc)$_2$-Phe-OBn の脱 FBoc 基の検討を行った(Table1)。

その結果、0.4N-HCl / TFA : H_2O : Novec(90 : 5 : 5)を用いたときに 4 時間で TLC 上原料スポットの消失を確認できた。シルカゲル薄層クロマトグラフィーで単離したところ、Fmoc-Arg-Phe-OH・TFA を 93%の収率で得た。現在、*G*-FBoc 基のペプチド合成への応用について検討している。

Table1 FBoc Group of Deprotecting Conditions.

Fmoc-Arg(FBoc)-Phe-OH —Acid→ Fmoc-Arg-Phe-OH • TFA

Deprotection Condition	Yield(%)			
	1h	2.5h	4h	24h
TFA :H_2O (95 :5)	32	50	67	92
TFA : H_2O : Novec (90 : 5 : 5)	40	61	80	-
TFA: H_2O : CF_3CH_2OH (90 : 5 : 5)	24	51	66	-
0.05-N HCl / TFA : H_2O : Novec (90 : 5 : 5)	45	70	87	-
0.2-N HCl / TFA : H_2O : Novec (90 : 5 : 5)	49	75	88	-
0.4N-HCl / TFA : H_2O : Novec (90 : 5 : 5)	53	80	93	-

1) M. H. S. Cezari and L. Juliano, *Pept. Res.*, 1996, *9,* 88-91.

Protection of Arginine side chain, Fluorous Boc group, Deprotection conditions for FBoc

講演番号：2C25a11
講演日時、会場：3 月 27 日 11:10～ C 校舎 25 会場

米α-アミラーゼ由来ペプチドのアミノ酸置換による抗菌活性の増大とそれらの作用機構の解明

Effect of substituting with arginine and leucine on antimicrobial activity and the mechanism of action of a peptide derived from α-amylase of rice

○野本 貴史、高橋 清志、中道 俊一、落合 秋人、田中 孝明、谷口 正之（新潟大自然研）
○Takafumi NOMOTO, Kiyoshi TAKAHASHI, Syunichi NAKAMICHI, Akihito OCHIAI, Takaaki TANAKA, Masayuki TANIGUCHI (Niigata Univ.)

【目的】当研究室では米のα-アミラーゼ（AmyI-1）の立体構造を解明し、その部分配列である AmyI-1-18 ペプチドが、ヒト病原微生物に対して抗菌活性を発揮することを見出している。そこで本研究では、本ペプチドの抗菌活性を高めるために、塩基性アミノ酸であるアルギニンおよび疎水性アミノ酸であるロイシンによって各アミノ酸を置換した変異体を化学合成した。すなわち、5 種類の 1 アミノ酸置換変異体と 6 種類の 2 アミノ酸置換変異体を化学合成し、それらのヒト病原微生物（歯周病菌、緑膿菌、アクネ菌、う蝕菌、日和見感染真菌など）に対する抗菌活性を、それぞれ比較検討した。また、抗菌活性が増大した変異体の各微生物細胞膜への作用について検討した。

【実験方法】本研究では、本ペプチドを塩基性領域と疎水性領域に分けるように 1 残基のアルギニンで置換した 3 種類の変異体、および 1 残基のロイシンで置換した 2 種類の変異体を化学合成した。また、2 残基のアミノ酸を置換した 6 種類の変異体も化学合成した。各ペプチドの *Porphyromonas gingivalis*、*Pseudomonas aeruginosa*、*Propionibacterium acnes*、*Streptococcus mutans*、*Candida albicans* に対する抗菌活性は、生菌に由来する ATP 量に基づく発光強度を測定することによって評価し、50%増殖阻害濃度（IC_{50}）を算出した。また、活性が増大したペプチド変異体の細胞膜に対する損傷作用を、$diSC_3$-5 を用いた細胞膜脱分極アッセイおよび核酸染色蛍光色素（propidium iodide）を用いたフローサイトメトリーを用いて検討した。

【結果】1 残基のアルギニンで置換した 3 種類の変異体の中で 2 種類の変異体は、歯周病菌、アクネ菌、日和見感染真菌のうち、2 種類の病原微生物に対する抗菌活性が高くなった。また、1 残基のロイシンで置換した 2 種類の変異体は、いずれも歯周病菌とアクネ菌に対する抗菌活性が高くなった。さらに、親ペプチドに比べて抗菌活性が増大した変異体は、細胞膜に対する損傷作用が強くなることが観察された。現在、1 残基置換変異体のう蝕菌と緑膿菌に対する抗菌活性および 2 残基置換変異体の 5 種類の病原微生物に対する抗菌活性を測定中である。

antimicrobial peptide, amino acid substitution, mechanism of action

講演番号:2C25a12
講演日時、会場:3 月 27 日 11:21～ C 校舎 25 会場

納豆抽出物からのカチオン性抗菌ペプチド成分の調製とその特性解析

Preparation and characterization of cationic antimicrobial peptides from natto extract

○幡本 晃太、亀田 光裕、松嶋 健太、落合 秋人、田中 孝明、谷口 正之 (新潟大自然研)
○Kota HATAMOTO, Mitsuhiro KAMEDA, Kenta MATSUSHIMA, Akihito OCHIAI, Takaaki TANAKA, Masayuki TANIGUCHI (Niigata Univ.)

【目的】 抗菌ペプチドは，12-50 のアミノ酸残基から構成されること，正味の電荷が正であり等電点が高いこと，両親媒性であることなどの共通の特性を有していることがわかっている。当研究室では，これまでに米タンパク質のアミノ酸配列から α-ヘリックス構造を有するカチオン性ペプチドを探索し，見出したペプチドを化学合成した。その結果，それらのペプチドは抗菌活性，抗炎症活性，創傷治癒活性などを有していた。[1, 2] また，大豆タンパク質由来ペプチドには，コレステロール代謝改善，抗肥満，食欲抑制効果などの機能を有することが既に報告されている。そこで本研究では，納豆抽出物から主に両性担体（アンフォライト）を用いない等電点電気泳動（autofocusing）によって，化学合成ペプチドに代わる抗菌性を有する天然型カチオン性ペプチド成分を調製することを目的とした。

【実験方法】 本研究では，納豆をすりつぶした後，水可溶性画分を抽出した。その後，遠心分離によって得られた上澄液にエタノールを添加し，生成した沈殿物を遠心分離によって除去した。得られたペプチドを含む上澄液を出発材料とした。次に，出発材料から低分子成分を除去するために透析を行った後，透析内液を凍結乾燥した。得られた凍結乾燥サンプルを，等電点電気泳動装置（Rotofor, Bio-Rad 社製）を用いて 20 の画分に分画し，それぞれの画分の pH と乾燥重量を測定した。また，得られた 20 の画分の歯周病菌（*Porhyromonas gingivalis*），アクネ菌（*Propionibacterium acnes*），および日和見感染真菌（*Candida albicans*）に対する抗菌活性を測定した。抗菌活性は，生菌に由来する ATP 量に基づく発光強度を測定することによって評価した。

【結果】 エタノール沈殿後に得られた出発材料の収率および等電点電気泳動後の 20 画分の重量を合計した収率は，それぞれ納豆抽出物重量の約 50%および約 20%となった。等電点電気泳動後に得られた 20 画分のうち，No.17～20 の 4 つの画分の等電点は 8 以上であった。各画分の抗菌活性を測定した結果，主に等電点が高い画分に *P. gingivalis* と *P. acnes* に対する抗菌活性を検出できたが，*C. albicans* に対する抗菌活性は検出できなかった。現在，抗菌活性を検出できた画分を逆相クロマトグラフィーを用いて精製した後，各ピークに含まれるペプチドを MALDI-TOF/MS を用いて同定する実験を進めている。

1) N. Takei et al., ***Peptides,*** Vol.42, p.55-62 (2013).
2) M.Taniguchi et al., ***Peptides,*** Vol.48, p.147-155 (2013).

natto extract, autofocusing, antimicrobial peptide

講演番号：2C25a13
講演日時、会場：3 月 27 日 11:32～ C 校舎 25 会場

大腸菌細胞内発現系を用いた抗体融合タンパク質の効率化に関する研究

Efficient soluble production of antibody fusion protein in *E. coli* cytosolic expression system

○本間 啓介[1]、加藤 晃代[1]、兒島 孝明[1]、上田 宏[2]、中野 秀雄[1]([1]名大院生命農、[2]東工大資源研)
○Keisuke HOMMA[1], Teruyo KATO[1], Takaaki KOJIMA[1], Hiroshi UEDA[2], Hideo NAKANO[1]
([1]Grad. Sch. Bioagric., Sci., Nagoya Univ., [2]Chem. Res. Lab., Tokyo Tech)

【背景・目的】モノクローナル抗体は医薬や検査薬などとして実用化され、盛んに研究開発されている。さらに単鎖抗体である scFv と検出酵素との融合タンパク質である酵素抗体のような、別の機能を付加させたより高機能化された抗体開発が行われている。

一般的に、大腸菌における抗体の異種発現では、抗体がジスルフィド結合を含むために不溶性である封入体を形成することが多い。この解決策として不溶性タンパク質からリフォールディングを行う方法やペリプラズムにおける分泌発現などの方法が一般的にとられている。しかし、リフォールディング系および分泌発現系においては、scFv に融合させるタンパク質の性質によっては scFv 単独発現の場合よりも効率が低くなることが知られる。したがって、これが大腸菌細胞質内において大量生産可能になると非常に有用である。

そこで今回はそのような高機能抗体を大腸菌内で可溶性タンパク質として発現させることを目指し、モデルとして、scFv に機能性タンパク質(p15)を融合し、種々の条件検討を行った。

【方法・結果】モデル抗体としてマウス抗リゾチーム scFv 抗体を機能性タンパク質 p15 との融合タンパク質（scFv-p15）として細胞内発現を試みた。まず、宿主として DsbC を細胞内に発現する大腸菌 SHuffle T7 express と BL21(DE3)を比較したところ、前者においてのみ発現が確認された。SHuffle T7 express で可溶性として得られた scFv-p15 は、ELISA により抗原特異的な反応を示した。しかしながら発現した scFv-p15 の大部分が封入体を形成していた。そこで、可溶性タンパク質の発現量向上のために、N 末端に 8～12 残基のアミノ酸から成る様々なタグ配列を付加し、その効果を調べた。さらにシャペロンと共発現させることにより、可溶性発現量の向上を試みた。
その結果、タグ配列・シャペロンの組み合わせにより、scFv-p15 の細胞内可溶性発現量が増大することが分かった。

Escherichia coli, scFv, protein expression system

講演番号：2C25a14
講演日時、会場：3 月 27 日 11:43～ C 校舎 25 会場

大腸菌無細胞/生細胞タンパク質発現系を用いたロシシンジッパー付加による Fab 合成の効率化

Leucine Zipper-fused Fab production in *E. coli in vivo/vitro* expression system

○福井 貫介[1]、山本 広晃[1]、加藤 晃代[1,2]、兒島 孝明[1]、中野 秀雄[1] ([1]名大院・生命農、[2]（公財）科技財団)
○Kansuke Fukui[1], Hiroaki Yamamoto[1], Teruyo Kato[1,2], Takaaki Kojima[1], Hideo Nakano[1] ([1]Grad. Sch. Bioagric., Sci., Nagoya Univ.,, [2]Aichi Sci. Techol. Fundation)

【背景】モノクローナル抗体は、特定のエピトープに特異性高く結合する性質を持ち、生命科学研究に欠かせないツールの１つになっているだけではなく、医薬や検査薬、あるいはセンサーなどへ実用化されつつある。このような産業的利用のため、大腸菌等の微生物で安価かつ大量に生産することが望まれている。

しかしながら、大腸菌を用いて Fab(antigen-binding fragment)生産が行われた報告は少なく、また Fab はその分子ごとに H 鎖、L 鎖間のジルスフィド形成効率が異なり、多くの場合活性型 Fab の収量が低いことが課題となっていた。

そこで、Fab の H 鎖と L 鎖の C 末端に、それぞれ互いに強く結合し、ヘテロダイマーを形成するロイシンジッパーLZA と LZB(1)をそれぞれ付加することにより、大腸菌無細胞発現系および大腸菌細胞内発現系での Fab 合成の効率化を目指した。

【方法・結果】ハイブリドーマ法により得られた抗大腸菌 O157 マウス抗体由来 Fab 抗体の、CH1 と CL の C 末端側に、それぞれ LZA、LZB を付加した Fab-LZ を大腸菌無細胞タンパク質合成系で発現させたところ、Fab 形成効率が向上し、ELISA における結合シグナルも増大した。次に、ジスルフィド結合イソメラーゼである DsbC を細胞内で大量発現する大腸菌 Shuffle T7 Express を用いて、Fab および Fab-LZ を細胞質内発現させた。両 Fab の発現量に顕著な違いは見られなかったが、得られた細胞抽出液の可溶性画分を用いた大腸菌 O157 を抗原とした ELISA を行ったところ、各ロイシンジッパーを H 鎖、L 鎖にそれぞれ付加した Fab-LZ は、通常の Fab より顕著に高い結合シグナルを示した。

また、シャペロンプラスミド pTf16 により Trigger Factor(TF)を共発現させると、ELISA のシグナルを約 1.5～2 倍増大させることができた。

以上より、LZA、LZB の付加および TF の共存は活性型 Fab 合成に有効であることが示された。これらの手法を用いることで、大腸菌を用いて安価かつ大量に Fab 抗体を生産できることが期待できる。

【謝辞】本研究は、知の拠点あいち重点研究プロジェクト２「食の安心・安全技術開発プロジェクト」による成果のひとつである。

1) Coiled -coil structure of the LZA/LZB heterodimer
(Oshea, E. K., et al., 1993)

mouse monoclonal antibody, Fab, *E.coli* expression system

講演番号：2C25a15
講演日時、会場：3 月 27 日 11:54～ C 校舎 25 会場

大腸菌生細胞／無細胞発現系によるウサギモノクローナル抗体の作製

Production of rabbit monoclonal antibody in *E.coli in vivo/vitro* expression system

○加藤 晃代[1,2]、橋村 大[2]、永井 里美[2]、兒島 孝明[2]、中野 秀雄[2] ([1]（公財）科技財団、[2]名大院生命農)
○Teruyo KATO[1,2], Dai HASHIMURA[2], Satomi NAGAI[2], Takaaki KOJIMA[2], Hideo NAKANO[2] ([1]ASTF, [2]Nagoya Univ.)

【背景】モノクローナル抗体は、生命科学分野において必須なツールのひとつであり、診断や臨床分野においてもその重要性は高まっている。当研究グループで開発された SICREX(single-cell RT-PCR linked in vitro expression)法は、細胞 1 個由来のわずか数十コピーの mRNA を対象として、RT-PCR により L 鎖と H 鎖の Hd 部分をそれぞれ増幅させ、連続的に無細胞タンパク質合成系を用いることにより数日でモノクローナル抗体を作製・評価することが可能である。

一方で、得られた抗体を各種診断ツールに応用するためには、大腸菌等の微生物で安価かつ大量に生産することが理想的である。

そこで今回は、SICREX 法で得られたウサギ抗体を scFv、Fab 等のフラグメントとして大腸菌で異種発現させ、活性型抗体取得のための条件を検討した。また、活性型 Fab の形成促進を目的として、互いに強く結合するペプチドであるロイシンジッパーA および B（LZA、LZB）の付加効果を検討した。

【結果および考察】

SICREX 法により、食中毒菌 *Listeria monocytogenes* に対するウサギモノクローナル抗体取得に成功した。これらを scFv または Fab 化し大腸菌 SHuffle T7 express により細胞質内発現させたところ、scFv は活性型として得られ、抗原特異的な反応を示した。一方で、Fab は活性型が得られなかった。そこで、Fab の H 鎖と L 鎖の C 末端側に、それぞれ LZA、LZB を付加し Fab-LZ 複合体として同様に発現させたところ、抗体活性が認められた。非還元 SDS-PAGE 解析によると、Fab-LZ の Hc-Lc 間ジスルフィド結合は形成されていなかった。このことから、LZA および LZB の親和力によって H 鎖と L 鎖が会合し活性型の Fab 形状が保たれているものと考えられた。

以上より、多くの Cys 残基を有し本来複雑な組み合わせのジスルフィド結合を形成することの知られるウサギ抗体を活性型として大腸菌にて組換え調製するためには、scFv 化または Fab-LZ 化が有効であることがわかった。

【謝辞】本研究は、知の拠点あいち重点研究プロジェクト２「食の安心・安全技術開発プロジェクト」による成果のひとつである。

rabbit monoclonal antibody, scFv, Fab

講演番号：2C25p01
講演日時、会場：3 月 27 日 14:00～ C 校舎 25 会場

Long-time refolding による凝集性ニューロセルピンの調製

Preparation of aggregenic neuroserpin by Long-time refolding

○久留宮 綾人、中村 麻子、恩田 真紀 (大阪府大・理・生物科学)
○Ayato Kurumiya, Asako Nakamura, Maki Onda (Dept.of Biol. Sci., Grad. Sch. of Sci., Osaka Pref. Univ.)

【背景と目的】ニューロセルピンは、主に大脳から分泌されるセルピン（serine protease inhibitor superfamily に属する蛋白質群）で、生体内では tPA（tissue-type plasminogen activater）を阻害し、記憶や感情の制御に関与している。本蛋白質の変異体 S49P は mis-folding しやすく、これが小胞体内に蓄積すると認知症を引き起こす。我々は、S49P が引き起こす認知症の治療薬開発のための基盤研究を行うため、凝集しやすく精製が極めて困難な同蛋白質の調製法の確立を試みた。

【方法】mis-folding しやすい S49P は、いかなる宿主を使った発現系でも可溶性画分から得ることができなかった。そこで我々は、S49P を大腸菌系で発現させて封入体として取得し、これを変性させて可溶化した後、refolding することで調製する手法を選択した。まず、界面活性剤を含む buffer で封入体を洗浄し、これを 6 M グアニジン塩酸塩で可溶化して変性蛋白質を調製した。しかし、この変性試料には不純物が多く、refolding 効率が悪かった。そこで、S49P の N 末に付加した 6×His タグを利用し、変性条件下、Ni アフィニティクロマトグフィを行うことで変性試料の純度を高めた。次に、refolding については、変性試料（0.20 mg/ml × 50 ml）を一気に refolding buffer で希釈せず、ペリスタポンプを使って 1 滴ずつ refolding buffer（3 L）に滴下することで、蛋白質の凝集を極力減らした。得られた refolding 蛋白質は極めて低濃度（ca. 3 μg/ml）であるので、Ni-NTA 担体を使ったバッチ法により濃縮し、その後、陰イオン交換クロマトグラフィーで更に精製した。

【結果】refolding 温度については、低温にするほど蛋白質の凝集が抑制されたので、4ºC で実施することにした。refolding 時間については、まずは定法に従って 2-8 時間としたが、この場合の収量は培地 1 L 当たり最大 0.6 mg であった。そこで、S49P が野生型に比べて refolding 速度が 10 倍以上遅いこと（竹原 *et al. J. Mol. Biol.,* 2010）に着目し、refolding 時間を長くした。その結果、refolding 時間を 180 時間にすると、収量は培地 1 L 当たり 2.6 mg にまで向上した。得られた目的蛋白質の諸性質の解析、および結晶化スクリーニングの結果については、発表当日に報告する。

refolding, mis-folding

講演番号：2C25p02
講演日時、会場：3 月 27 日 14:11～ C 校舎 25 会場

コムギ無細胞合成系を基盤とした旨味/甘味受容体タンパク質の合成とモノクローナル抗体の作製
Protein and monoclonal antibody of umami/sweet receptor productions based on the wheat cell-free system

○栄谷 紘一[1]、竹田 浩之[1]、小澤 龍彦[2]、村口 篤[2]、三坂 巧[3]、森下 了[4]、澤崎 達也[1] ([1]愛媛大 プロテオサイエンスセンター、[2]富山大 院 医学薬学研究部、[3]東京大 院 農学生命科学研究科、[4]株式会社セルフリーサイエンス)
○Koichi Sakaedani[1], Hiroyuki Takeda[1], Tatsuhiko Ozawa[2], Atsushi Muraguti[2], Takumi Misaka[3], Ryo Morisita[4], Tatsuya Sawasaki[1] ([1]Ehime Univ proteo science center, [2]Toyama Univ, [3]Tokyo Univ, [4]cell-free science)

特定のタンパク質に対するモノクローナル抗体は、細胞や組織における発現量変化や局在解析、免疫沈降法など、あらゆるレベルのタンパク質解析に必須なツールである。近年、膜タンパク質の細胞生物学的、生化学的機能解析や構造解析の進展が望まれているが、膨大に市販されている抗体の中から有用な膜タンパク質抗体を見出すことは難しいのが現状である。原因として、膜タンパク質の大部分をなす膜貫通領域は疎水性が高すぎるため、抗体作製で広く用いられているペプチド抗原は免疫源として適していない場合が多いなどがあげられる。一方、膜タンパク質抗原を用いれば抗体が得られる可能性は高まるが、組換え膜タンパク質の合成・精製が非常に困難である。我々はリポソームをコムギ無細胞系に添加し、膜タンパク質をプロテオリポソームとして合成する手法を開発した（Nozawa et al. BMC Biotechnol 2011）。本手法を用いれば活性をある程度保った膜タンパク質を、免疫に十分な数 mg オーダーで合成することが可能となった。また、先行研究において、膜タンパク質の中でもファミリーが多い GPCR 全長の良好な合成を数十種類確認できた。

本研究では、受容機構や組織レベルでの発現解析において未解明な部分が多く、食品の嗜好性操作の観点から注目を集めている味覚受容体に着目した。特に、甘味、旨味に対する受容体は 3 種類の T1R1、T1R2、T1R3 の GPCR タンパク質が T1R2-T1R3（甘味）もしくは T1R1-T1R3（旨味）でヘテロ二量体を形成し、それぞれの味を認識している。これら T1R ファミリーは、細胞外に親水性の大きなドメインを保持しているため生細胞系においての合成や精製が一段と困難であると考えられる。リポソーム添加型コムギ無細胞系でそれらの合成を試みた結果、コムギ抽出液 1ml あたり約 0.8mg の収率での粗精製一量体産物の合成に成功した。今回は、マウスに T1R1、ラビットに T1R3 をそれぞれ免疫した。ラビットの B 細胞のハイブリドーマ化は困難であるので、抗体産生細胞から抗体遺伝子を単離する技術 ISAAC 法を用いてラビットのモノクローナル抗体の作製を試みた。それぞれ 1 クローンずつ抗原に対するモノクローナル抗体を取得した。AlphaScreen 法や WB を用いて、それら得られた抗体の特異性とエピトープ部位の確認を行った。その結果より、それぞれ特異的に抗原と反応しており、抗 T1R1 抗体は、細胞外ドメインの N 末端側を認識し、抗 T1R3 抗体は、細胞内の C 末端を認識していることが明らかとなった。また、T1R1、T1R3 を発現させた培養細胞のイムノブロットおよび蛍光免疫染色に関しても使用可能であった。現在、得られた抗体が他のアプリケーションへ適用できるかどうか解析を進めるとともに、抗 T1R1 抗体は細胞外認識であるため、カルシウムイメージングなどの活性評価系を用いて機能性抗体であるかどうかの検証を行っていく予定である。

taste receptor, antibody, wheat cell-free synthesis

講演番号：2C25p03
講演日時、会場：3 月 27 日 14:22～ C 校舎 25 会場

翻訳終結因子 RF-1 欠損大腸菌のタンパク質発現系および無細胞タンパク質合成系を利用したモノメチルリジンのヒストンタンパク質への部位特異的複数導入

Multiple site-specific installations of N^{ε}-monomethyl-L-lysine into histone proteins using the cell-based and cell-free protein synthesis systems from release factor 1 (RF-1)-knockout *Escherichia coli*

○高橋 美穂子[1,2]、柳沢 達男[1,3]、向井 崇人[1,2]、佐藤 心[1,2]、若森 昌聡[1,2]、白水 美香子[1,2]、坂本 健作[1,2]、梅原 崇史[1,2,4]、横山 茂之[2,3]（[1]理研 CLST、[2]理研 SSBC、[3]理研 横山構造生物学研、[4]さきがけ）

○ Mihoko Takahashi[1,2], Tatsuo Yanagisawa[1,3], Takahito Mukai[1,2], Shin Sato[1,2], Masatoshi Wakamori[1,2], Mikako Shirouzu[1,2], Kensaku Sakamoto[1,2], Takashi Umehara[1,2,4], Shigeyuki Yokoyama[2,3] ([1]RIKEN CLST, [2]RIKEN SSBC, [3]RIKEN Struct. Biol. Lab, [4]PRESTO, JST)

リジンの N^{ε}-メチル化はエピジェネティクスに関わるヒストンタンパク質の重要な翻訳後修飾である。ヒストンメチル化酵素が触媒する特定の位置のリジンメチル化については解析が進んでいるが、複数メチル化修飾の機能や役割はよくわかっていないことから、メチルリジンを複数含むヒストンタンパク質の簡便な調製法が必要とされている。近年、チロシル tRNA 合成酵素(TyrRS)-$tRNA^{Tyr}$ やピロリジル tRNA 合成酵素(PylRS)-$tRNA^{Pyl}$ を利用したアンバー(UAG)コドンサプレッション法により様々な非天然型アミノ酸をタンパク質内に導入することが可能になってきた。一方でタンパク質内の複数カ所に非天然型アミノ酸を UAG コドンで導入することは翻訳終結因子 RF-1 が存在する通常の大腸菌発現系では困難であった。我々は RF1 を欠損させた大腸菌株（RFzero）を開発し、TyrRS-$tRNA^{Tyr}$ および PylRS-$tRNA^{Pyl}$ ペアと組み合わせることによりヨードチロシンなどの非天然型アミノ酸やアセチルリジンなどの修飾アミノ酸をタンパク質内の複数カ所に導入してきた（Mukai *et al*., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 2011, **411**, 757-761）。今回、大腸菌 RFzero の発現系および無細胞タンパク質合成系と PylRS-$tRNA^{Pyl}$ ペアを利用してモノメチルリジンの誘導体[N^{ε}-(*tert*-butyloxycarbonyl)-N^{ε}-methyl-L-lysine（BocKme1）]をヒストン H3 の複数カ所に導入し、その後化学的処理を施すことにより保護基である Boc を外し、1~4 個のモノメチルリジンが特定の位置に導入されたヒストン H3 タンパク質を効率良く調製することに成功した。本研究の技術によりタンパク質メチル化やエピジェネティクスに関する研究が推進されると期待される。

genetic code expansion, translational modifications, pyrrolysyl-tRNA synthetases

講演番号：2C25p04
講演日時、会場：3 月 27 日 14:33～ C 校舎 25 会場

酵母シグナルペプチドライブラリからの *Phanerochaete chrysosporium* 由来エンドグルカナーゼ分泌シグナルの選択
Selection of signal peptide for secretion of *Phanerochaete chrysosporium* endoglucanse from yeast signal peptide library

○森 昭博[1]、原 翔一[1]、菅原 知宏[1]、兒島 孝明[1]、岩崎 雄吾[1]、河原崎 泰昌[2]、佐原 健彦[3]、扇谷 悟[3]、中野 秀雄[1]([1]名大院・生命農・生命技術、[2]静岡県大院生活健康・食栄、[3]産総研)
○Akihiro Mori[1], Shoichi Hara[1], Tomohiro Sugahara[1], Takaaki Kojima[1], Yugo Iwasaki[1], Yasuaki Kawarasaki[2], Takehiko Sahara[3], Satoru Ohgiya[3], Hideo Nakano[1] ([1]Dept. Bioeng., Grad. Sch. Bioagr. Sci., Nagoya Univ., [2]Grad. Sch. Nutri. Environ Sci. Univ. Shizuoka, [3]AIST)

【目的】異種タンパク質の分泌生産量を向上させる手段の 1 つとして、シグナルペプチド(SP)配列の最適化が挙げられる。通常シグナル配列ライブラリと目的タンパク質(Protein of Interest:POI)を融合させる場合、制限酵素サイト配列などに由来する固定された介在配列が、SP 配列と POI の間に存在していた。これは POI の N 末端に余分な配列が存在してしまうことを意味し、分泌効率そのものに影響を与えてしまう可能性や、POI の機能などへの悪影響も懸念される。本研究室では、既に介在配列なしに多数の SP を POI に融合させる方法として、SPOT（Signal Peptide Optimization Tool）法を報告している。SPOT 法では、1 つずつの SP の DNA に対するプライマーを新たに合成する必要がなく、簡便に SP-POI の組み合わせを最適化できる。本発表では SPOT 法を用いて、セルラーゼの一種である *Phanerochaete chrysosporium* 由来エンドグルカナーゼの分泌生産に最適な SP を介在配列なしに選択した結果を報告する。

【方法】
リモートカッター制限酵素の認識サイトが付加されたプライマーにより、酵母ゲノム由来 60 種類の SP を PCR で増幅後、各 DNA 断片の濃度が均一になるように混合し、リモートカッター制限酵素 *Bpu*E1、*Acu*I、*Bse*R1 で切断した。これに成熟エンドグルカナーゼの N 末端と相同なリンカー配列を付加後、In-Fusion Cloning Reaction を利用して酵母発現ベクター及びエンドグルカナーゼ遺伝子と融合した。このライブラリを *Saccharomyces cerevisiae* に導入し、上清に分泌されたエンドグルカナーゼの活性により分泌量を評価した。

【結果】
SPOT 法にて、エンドグルカナーゼの高分泌には YGP1、SED1、SUN4 に由来する SP が適していることを見出した。これらは WT の SP と比較して、それぞれ 2.1、1.6、1.4 倍の分泌量向上効果を示した。一方で、SPOT 法を開発する際に POI のモデルとして用いた LacA を高分泌させた AGA2、CRH1 由来の SP は WT に比べて低い分泌量にとどまった。このことから、分泌させる POI により、最適な SP が異なることが示された。

yeast, signal peptide, endoglucanase

講演番号：2C25p05
講演日時、会場：3 月 27 日 14:44～ C 校舎 25 会場

カイコ *N* 型糖鎖付加経路改変に向けたカイコ内のヒト由来糖転移酵素発現に関する研究

Expression of human-glycosyltransferases in silkworms targeting for modification of *N*-glycosylation pathway

○加子 夏未[1]、加藤 竜也[1,2]、近藤 幸子[3,4]、矢木 宏和[3]、加藤 晃一[3,4,5]、朴 龍洙[1,2]（[1]静岡大学大学院農学研究科応用生物化学専攻、[2]静岡大学 グリーン科学技術研究所、[3]名古屋市立大学、[4]グライエンス、[5]自然科学研究機構・岡崎統合バイオサイエンスセンター）

○Kako Natsumi[1], Tatsuya Kato[1,2], Sachiko Kondo[3,4], Hirokazu Yagi[3], Kouichi Kato[3,4,5], Enoch Y. Park[1,2] ([1]Dept. Appl. Biol. Chem., Fac. Agric., Shizuoka Univ., [2]Research Institute of Green Science and Technology, [3]Nagoya city Univ., [4]GLYENCE, [5]National Institutes of Natural Sciences Okazaki Institute for Integrative Bioscience Center)

【背景・目的】近年、抗体医薬はがん治療の効果や副作用の少なさなどの利点から、精力的に開発が進められている。外来タンパク質の大量発現が可能なカイコは抗体生産系として有用であると期待されているが、生産される糖タンパク質の *N* 型糖鎖は昆虫細胞と同様に高マンノースもしくはパウチマンノース型が大部分であり、哺乳動物細胞でみられる混合型や複合型糖鎖は殆ど認められない。これがカイコを用いたタンパク質発現系の欠点となっている。本研究ではその欠点を改善するために、カイコ体内でそれぞれヒト由来 β-1,2-N-acetylglucosaminyltransferaseII（hβ2GnTII）及びヒト由来 β-1,4-galactosyltransferaseI（hβ4GalTI）の発現を行い、カイコの N 型糖鎖合成経路改変を試みた。

【方法・結果】PCR で増幅した hβ2GnTII または hβ4GalTI 遺伝子を、カイコで発現可能な Bombyx mori nucleopolyhedrovirus（BmNPV）バクミドに挿入し、組換え BmNPV バクミドを構築した。これら糖転移酵素は、カイコ由来アクチンプロモーターまたは Orgyia pseudotsugata multicapsid nuclear polyhedrosis virus 由来 second immediate early regulatory 遺伝子（OpIE2）プロモーターで発現制御されており、カイコさなぎでそれぞれ発現させた。ウエスタンブロットにより目的タンパク質の発現を確認した。hβ2GnTII を糖タンパク質のモデルタンパク質として使用したヒト由来 IgG1（hIgG1）と共発現し、hIgG1 の精製を行った。精製した hIgG1 を用いたレクチンブロットにより hIgG1 重鎖の *N* 型糖鎖構造変化を確認したところ、レクチンとして末端 *N*-アセチルグルコサミンを認識する GS-II を用いた場合、hβ2GnTII を発現させていない hIgG1 に比べ hβ2GnTII を発現した hIgG1 でバンドの増強が認められた。さらに詳細な N 型糖鎖構造解析を行ったところ、末端 *N*-アセチルグルコサミンを持つ糖鎖の約 15%の増加が確認された。さらに hβ2GnTII と hβ4GalTI をともに hIgG1 と共発現させて、hIgG1 の精製を行った。ガラクトースに特異的に結合する RCA-120 を用いたレクチンブロットを行ったところ、糖転移酵素を発現させていないコントロールに比べ、hβ4GalTI を発現した hIgG1 でバンドの増強が認められ、*N* 型糖鎖へのガラクトースの付加が示唆された。現在、この hIgG1 について *N* 型糖鎖構造の確認を行っている。

silkworm, *N*-Glycosylation, Glycosyltransferase

講演番号：2C25p06
講演日時、会場：3 月 27 日 15:05～ C 校舎 25 会場

組換えカイコを用いた機能性タンパク質固定化シルクの開発

Development of functional protein-immobilized silk using transgenic silkworms

炭谷 めぐみ、藤井-村松 理香、朝岡 愛、皆葉 正臣、渡辺 裕文、中島 健一、飯塚 哲也、立松 謙一郎、瀬筒 秀樹、○石橋 純（農生資研）
Megumi Sumitani, Rika Fujii-Muramatsu, Ai Asaoka, Masaomi Minaba, Hirofumi Watanabe, Ken-ichi Nakajima, Tetsuya Iizuka, Ken-ichiro Tatematsu, Hideki Sezutsu, ○Jun Ishibashi (National Institute of Agrobiological Sciences)

【背景・目的】遺伝子組換えカイコを用いて、機能性タンパク質を融合させたフィブロインを発現させることにより機能性シルクの作製が行われている。共有結合は強固な結合であり、融合フィブロインは安定した分子となる。しかし、融合したタンパク質の機能に基質、受容体等の他の分子との相互作用を必要とする場合、立体障害のために十分な機能を発揮できない可能性がある。また、絹糸腺での外来タンパク質の大量発現の報告はあるが、融合フィブロインの場合、発現量は一般的に比較的少量である。これらの問題を解決するために、非共有結合的にシルクに機能性タンパク質を固定化する技術の開発を試みた。

【方法】野村らが報告したシルク結合ペプチド YN42 を付加したタンパク質を大腸菌で発現し、シルクへの結合および融合した酵素の活性を確認した。YN42 付加酵素を絹糸腺で発現する組換えカイコを作出した。得られた組換え繭の酵素活性、結合の安定性を解析した。

【結果】YN42 融合タンパク質のシルクに対する結合が確認された。UAS の下流に YN42、セリシンシグナルペプチド、EGFP および酵素の融合タンパク質を挿入し、カイコ卵に注射することにより組換えカイコを得た。この組換えカイコに後部絹糸腺で GAL4 を発現する系統と交配し、YN42 融合酵素を後部絹糸腺で発現する組換えカイコを作出した。EGFP の蛍光、RT-PCR、ウエスタンブロッテングおよび酵素活性の検定により融合酵素の発現を確認した。これらの組換えカイコが吐糸した繭は、EGFP の蛍光とともに酵素活性を示した。組換え繭の酵素活性、蛍光は洗浄後にも保持された。

本研究により、組換えカイコを用いたシルクへの機能性タンパク質の非共有結合的固定化が可能になった。本技術は固定化酵素の開発などに幅広い応用が可能であると考えられる。

Nomura Y *et al. Biotechnol Lett* (2011) **33**, 1069–1073

transgenic silkworm, functional silk, silk-binding peptide

講演番号：2C25p07
講演日時、会場：3 月 27 日 15:16～ C 校舎 25 会場

固定化パパインを用いたオリゴチロシンペプチドの合成

Synthesis of oligo-tyrosine peptides by immobilized papain

○三橋 純[1]、中山 勉[1,2]、奈良井 朝子[2] ([1]日獣大院 獣生科、[2]日獣大 応生)
○Jun MITSUHASHI[1], Tsutomu NAKAYAMA[1,2], Asako NARAI[2] ([1]Graduate School of Veterinary Medicine and Life Science, Nippon Veterinary and Life Science Univ., [2]Nippon Veterinary and Life Science Univ.)

【目的】 これまでパパインが触媒するアシル基転移反応を利用した L-チロシンエチルエステル(Tyr-OEt)の重合について検討してきた。合成されるペプチドのうち、水溶性の重合度(DP)2～4 のオリゴチロシンには抗高血圧作用が期待される。反応機構の解析から、本反応の至適 pH は 6.5 付近であり、基質の初濃度が 100 mM 以上になると高重合化が優先的に進行し、オリゴチロシンペプチドの収率が低下することを明らかにした。75 mM Tyr-OEt/ 0.2 M リン酸ナトリウムバッファー(pH 6.5)における反応では、約 80%の収率で DP 2～4 のオリゴチロシンペプチドが得られた。しかしながら、バッチ式の反応系ではパパインの利用効率の低下が考えられる。したがって、パパインを簡便に有効活用することを目的として、固定化パパインを調製し、オリゴチロシンペプチドの合成へ利用することを試みた。

【方法と結果】 フィルター付きエンプティーカラムに CNBr 活性化 Sepharose 4B 樹脂 1g を充填し、0.5 μmol または 1.0 μmol のパパインを含む酵素溶液を添加した。カラムを密閉後、穏やかに振盪しながら一晩、4℃で固定化した。未吸着酵素溶液を回収後、樹脂は 0.2 M Cys を含む緩衝液を用いてブロッキングを行った。未吸着溶液の Bradford 法によるタンパク定量と、Nα-ベンゾイル-L-アルギニン 4-ニトロアニリドを用いた酵素活性測定の結果、未吸着画分には定量限界以下の酵素しか含まれていなかった。よって、添加した酵素のほぼ全量が樹脂に固定化されたと考えられる。次に固定化パパインに 50 mM Tyr - OEt を添加して室温で反応し、継時的に反応液を回収後塩酸で反応を停止した。RP - HPLC で基質と生成物を分析すると、0.5 μmol, 1.0 μmol の固定化パパイン共に反応開始までにそれぞれ 60 min, 40 min の誘導期が認められた。24 hr 反応後にはいずれの反応系でも基質はすべて消費され、75 %近くの基質が DP 2～4 のオリゴチロシンペプチドに変換され、残りの基質からは加水分解物である Tyr が生成されていた。したがって、固定化パパインをオリゴチロシンペプチドの合成に利用できることが明らかとなった。

さらに、使用済みの固定化パパインを 11 mM ジチオスレイトール(DTT)で 30 min 処理した後、改めて 1 mM DTT を含む 50 mM Tyr - OEt を添加して反応を行ったところ、誘導期はそれぞれ 40 min, 20 min まで短縮し、基質の減少速度とペプチドの生成速度が上昇した。このことから、還元剤は固定化パパインを活性化することが示唆された。一方で、24 hr 反応後の生成物組成には顕著な差が見られなかった。今後は固定化パパインの繰り返し利用の有効性についても検討を進める。

peptide synthesis, papain, oligo-tyrosine

講演番号：2C25p08
講演日時、会場：3 月 27 日 15:27～ C 校舎 25 会場

パパインを用いて合成した Tyr-Tyr とチロシナーゼの反応

Tyrosinase-catalyzed oxidation of Tyr-Tyr synthesized by papain

○奈良井 朝子[1]、工藤 直翼[1]、堺 恵一[1]、三橋 純[2]、中山 勉[1,2] ([1]日獣大 応生、[2]日獣大院 獣生科)
○ Asako NARAI[1], Tadasuke KUDO[1], Keiichi SAKAI[1], Jun MITSUHASHI[2], Tsutomu NAKAYAMA[1,2] ([1]Nippon Veterinary and Life Science Univ., [2]Graduate School of Veterinary Medicine and Life Science, Nippon Veterinary and Life Science Univ.)

【目的】 演者らは、パパインによるアシル基転移反応を利用した L-チロシンエチルエステル(Tyr–OEt)の重合において、pH と基質濃度を調節することで Tyr–Tyr を高収率（使用基質の約 67%）で合成できることを明らかにした。さらに、固定化パパインを用いて簡便かつ効率的に Tyr–Tyr を合成する反応系を構築してきた。遊離の Tyr はチロシナーゼによって酸化されると、L-3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA), dopaquinone を経て重合し、黒色メラニン色素を生成する。Tyr 含有ペプチド内の Tyr 残基については、チロシナーゼで酸化されると Tyr 残基間で dityrosine という架橋構造を形成することや、チオール化合物が共存する場合には dopaquinone 残基にチオール基が付加することが知られている。そこで、本研究では Tyr–Tyr とチロシナーゼとの反応および反応生成物について、Tyr 含有ジペプチドの Tyr–Ala, Ala–Tyr と比較し、さらに新規のタンパク質架橋剤、ペプチド性消臭素材、染毛剤などの産業的な応用が可能かどうか調べることを目的とした。
【方法と結果】3 種のジペプチド（Tyr–Tyr, Tyr–Ala, Ala–Tyr）それぞれにマッシュルーム由来チロシナーゼを添加した試料液について、経時的に 200～600 nm で波長スキャンを行った。その結果、いずれのペプチドも Tyr 残基の DOPA 化を示す 280 nm の吸収が増加した。その後、Tyr–Ala は dopachrome 特有の 305, 475 nm における吸収極大が現れたのにつづき、325 nm の吸収が顕著に増大し、それと同時に可視部の吸収は減少していった。Ala–Tyr は 280 nm と 400～550 nm の吸収が緩やかに増加し、325 nm の吸収極大は見られなかった。このことから、ペプチドの N 末端 Tyr 残基の酸化物は dityrosine またはそれに類似した構造に変化している可能性が示唆された。Tyr–Tyr ではわずかに 325 nm の吸収が増加したが、Ala–Tyr と同様に可視部の吸収が維持されていたことから、N, C 両末端の Tyr 残基がチロシナーゼの基質になると考えられた。また、これらの試料液は反応の経過とともに色を呈したが、色調はそれぞれのジペプチドで異なっていた。次に、ジペプチドとチロシナーゼの反応試料を RP–HPLC で分析したところ、基質であるジペプチドの減少と酸化ペプチドの存在が確認された。Tyr–Tyr の酸化物として主要な成分は 1 種類が検出された。さらに、Ala–Tyr, Tyr–Tyr の減少速度は Tyr–Ala よりも大きいことから、これらジペプチドにおいては C 末端に位置する Tyr 残基の方がチロシナーゼにより酸化されやすいことが明らかとなった。また、試料液に Cys を添加すると速やかに試料液が澄んだ色調へ変化し、Cys のチオール基が付加したペプチドが新たに生成していることが RP–HPLC 分析によって示された。

oligo-tyrosine, tyrosinase, papain

講演番号：2C25p09
講演日時、会場：3 月 27 日 15:38～ C 校舎 25 会場

S. cerevisiae 胞子の酵素カプセルとしての応用
Applied usage of *S. cerevisiae* spores as enzyme microcapsules
○中西 秀樹[1]、SHI Libing[1]、ZHAO Qiang[1]、舘川 宏之[2]、高 暁冬[1]([1]江南大・生物工程、[2]東大院・農生科・応生化)
○Hideki NAKANISHI[1], Libing SHI[1], Qiang ZHAO[1], Hiroyuki TACHIKAWA[2], Xiao-Dong GAO[1]
([1]Jiangnan Univ., [2]Tokyo Univ.)

二倍体の出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は栄養飢餓、特に窒素源を枯渇させた条件下において胞子を形成する。*S. cerevisiae* の胞子には栄養増殖細胞にはないキトサン層、ジチロシン層といった構造が存在する。このユニークな構造により、胞子壁はサイズ依存的なバリアーとして働いていると考えられる。つまり、例えば単糖やオリゴ糖など比較的小さな分子は胞子壁を通過できるのに対して、タンパク質などの大きな分子は通過することができない。このため、胞子で発現された可溶性の分泌タンパク質はそのペリプラズム内に保持されることが報告されている。

我々は、この性質を利用すれば胞子壁内に可溶性酵素を固定化できるのではないかと考えた。そこで、栄養増殖時には培地へと分泌されるα-ガラクトシダーゼ（Mel1）を胞子で発現させたところ、Mel1 が胞子壁内に保持され、固定化酵素としてメルビオースを分解できることを確認した。この胞子を利用した固定化法の利点の一つは、発現させた酵素が胞子壁により覆われており、これにより外的ストレスから保護されていることである。実際、胞子壁内に発現させた Mel1 はプロテアーゼや高温などに対して耐性を示すことがわかった。これらの結果は、胞子が酵素のカプセル化に利用できることを示している。

さらに我々は、胞子壁の形成に関与する遺伝子を破壊し、胞子壁の構造を変えることでカプセル化酵素の活性を高められることを見いだしている。これは、おそらく胞子壁の構造をルーズにすることで基質が通りやすくなるためであると考えられる。例えば、Mel1 を発現させた *OSW2* 欠損（*osw2Δ*）胞子は野生型胞子より高い活性を示す。*osw2Δ* 胞子と野生型胞子との活性の差は、二糖であるメルビオースよりも三糖であるラフィノースを基質に用いたほうがより顕著に見られた。現在、胞子壁形成に関与する他の遺伝子に関しても同様の解析を行っており、胞子を利用したカプセル化酵素の更なる改良を目指している。

yeast, spore, enzyme capsule

講演番号：2C25p10
講演日時、会場：3 月 27 日 15:49～ C 校舎 25 会場

糖鎖の酵素合成技術

Enzymatic synthesis of polysaccharide

○柳原 芳充、上田 真澄（三洋化成工業）
○Fusamitsu Yanagihara, Masumi Ueda (Sanyo Chemical Industries)

我々は多糖の酵素法、つまり複数種類の酵素を用いて１ポットで単糖から多糖を合成する技術の開発を行なっており、ヒアルロン酸の酵素合成技術についての発表を行なう。

糖鎖は重要な機能を担う生体高分子と考えられており、多糖やオリゴ糖を工業レベルで生産するためには抽出や細胞を用いた生産方法が主流である。しかし、この方法では得られる糖鎖の種類が限られる、高コスト、構造が不均一などの課題が存在しており、多くの場合産業利用には課題がある。そこで、我々は酵素を用いて糖鎖合成を行なう技術の開発を目指した。まずは、すでに医薬品や化粧品として広範に応用されているヒアルロン酸を対象として選んで技術の開発を始めた。

ヒアルロン酸を酵素合成する場合、①酵素が高コスト、②基質である糖核酸が高コスト、③ヒアルロン酸合成時の副生物（核酸）が酵素反応を阻害するといった課題が存在する。①の酵素コストに関しては昨年の大会で発表した「大腸菌による組換えタンパク質分泌発現技術」（汎用的かつ高発現を狙って開発）による解決を目指している。本大会では、②、③の課題解決を目指した技術開発について紹介する。

ヒアルロン酸合成時の副生物であるＵＤＰと単糖（グルクロン酸、Ｎアセチルグルコサミン）から、ヒアルロン酸合成酵素の基質である糖核酸（ＵＤＰ−グルクロン酸、ＵＤＰ−Ｎアセチルグルコサミン）の再生を行なう反応経路を立案した。この反応経路により、単糖（とリン酸化合物）を主原料として多糖を合成することが可能になる。この際、各酵素のＫｍ（ミカエリス定数）やＫｉ（阻害定数）等に着目して酵素を選定し、各酵素の使用濃度や核酸等の中間体濃度を適切に調整・維持することで、持続的に単糖からヒアルロン酸を合成することに成功した。

合成できたヒアルロン酸の推定分子量は５００万Ｄａを超えており、今後、他の糖鎖の酵素合成にも応用できることが期待される。

glycotechnology, hyaluronan, multiple-enzyme system

講演番号：2C25p11
講演日時、会場：3 月 27 日 16:10～ C 校舎 25 会場

液面固定化システムによる糸状菌胞子の生産に対する疎水性樹脂の効果

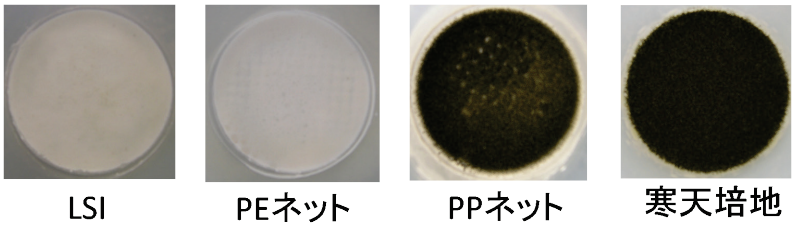
Effect of hydrophobic resin on the production of fungal spores on liquid surface immobilization (LSI) system

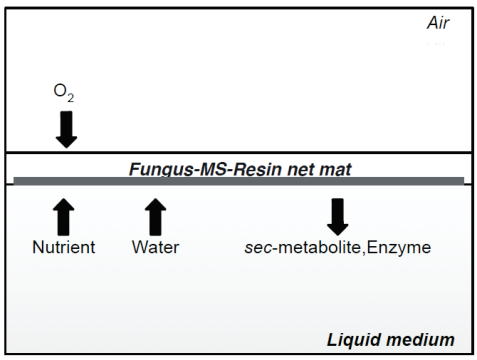
○城戸 良介、小田 忍、大箸 信一（金沢工大ゲノム研）
○Ryousuke KIDO, Shinobu ODA, Shinichi OHASHI (Kanazawa Inst. Technol.)

【目的】糸状菌は、発酵や微生物変換、農業分野や環境浄化などの幅広い産業分野で用いられており、物質生産用の種菌や微生物農薬として、大量の胞子が必要とされている。演者らは、液体培地表面の糸状菌マットを物質生産に利用する液面固定化(LSI)システムを開発したが、この液面糸状菌は自然に近い形態分化を行って大量の胞子を生産する。また、この糸状菌マットに疎水性樹脂 [1]やアニオン交換樹脂微粒子 [2]を抱含させることにより、糸状菌の生理生化学的性質が劇的に変化することを報告してきた。そこで本研究では、疎水性樹脂ネットを液面糸状菌マットの内部に抱含させることにより、胞子生産性がどのように変化するかを調べることを目的とした。

【方法】 1/2 濃度の PD ブロスと中空微粒子(HB-2051、積水化学)、糸状菌胞子懸濁液(10^6 spores/ml)を混合し、polypropylene あるいは polyethylene ネット(厚さ 1 mm、孔径 2.5 x 2.5 mm)を設置した培養器に分注して胞子-微粒子層を形成させた。25 ˚C で所定時間培養後、糸状菌マット表面に生産された胞子数を測定した。

【結果】*Aspergillus niger* NBRC 6341 を用いた場合、コントロール(ネットなし)並びに polyethylene ネット抱含マットで胞子がほとんど生産されなかったことに対し、polypropylene ネット抱含マットでは大量の胞子が生産された(5.7 x 10^4spores/cm^2)。この生産量は 1/2 濃度の PDA 表面に生産された胞子数(8.6 x 10^4 spores/cm^2)の 66.7%に相当した。*Trichoderma* や *Penicillium* 等の他の属種の糸状菌についても同様の検討を加えた。





MS, ballooned microsphre

【参考文献】

(1) Oda, S., *et al*., J. Biosci. Bioeng., **114**, 596-599 (2012).
(2) Oda, S., *et al*., J. Biosci. Bioeng., **115**, 544-546 (2013).

Interface bioreactor, Fungal spore, Hydrophobic resin

講演番号：2C25p12
講演日時、会場：3 月 27 日 16:21～ C 校舎 25 会場

油脂資化性酵母 *Meyerozyme guiliermondii* TY-89 の培養特性

Cultural Characteristics of Lipid Assimilating Yeast, *Meyerozyme guiliermondii* TY-89

○佐藤 香子[1]、竹園 恵[1]、中島 敏明[2]、茂野 俊也[3]、小野寺 正幸[1] ([1]新潟工大院生産開発工学、[2]筑波大院生命環境科学、[3]つくば環微研)
○Kyoko SATOH[1], Satoshi TAKESONO[1], Toshiaki NAKAJIMA[2], Toshiya SHIGENO[3], Masayuki ONODERA[1] ([1]Niigata Inst. Tech., [2]Tsukuba Univ., [3]Lab.Tsukuba Env.Microb.)

【目的】家庭、外食産業、食品工場等から排出される廃食用油の有効活用の一つとして廃食用油を唯一の炭素源並びにエネルギー源として生育する微生物菌体を培養し、安価な家畜用飼料の生産を目指している。今回、油脂資化性酵母 *Meyerozyma guiliermondii* TY-89 株を用いて三角フラスコでの回転振盪培養について実験的検討を行った。

【方法と結果】菌株として油脂分解酵母 *Meyerozyma guiliermondii* TY-89 株を用いた。基本となる培地組成は、C 源として植物油 1%(w/v)、N 源として硫酸アンモニウム 0.2%(w/v)からなる無機塩培地を用いた。グルコース、ペプトン、酵母エキスからなる GPY 培地にて 1 日間前培養し、それを 500mL 容三角フラスコ中の液体培地 50mL へ 1mL 接種し、30℃、120rpm で培養した。菌体量は Whatman 製 glass microfiber filters, Grade GF/B を用いた乾燥菌体重量法によって測定した。

最初に三角フラスコのバッフルの有無について検討した。バッフル有りの三角フラスコを用いた場合は 48 時間で約 6g/L の菌体量を得、pH は 2.3 付近まで低下した。一方、バッフル無しの通常の三角フラスコを用いた場合、96 時間で約 3g/L の菌体量に留まった。なお、pH は 2.5 付近へ低下した。そこで、このバッフルの効果を明らかにするため、通常のバッフル無しの三角フラスコを用いて、予め培地に界面活性剤を添加し、乳化した培地で培養した。乳化剤としては、阪本薬品工業製 SY グリスターCRS-75 を植物油に対して 1%(w/v)添加し、市販のミキサーで撹拌し、培地を乳化した。その結果、バッフル無しでも約 6.0g/L の菌体量を得ることが出来た。pH も 2.3 付近まで低下した。このことから、バッフルにより植物油が微細化され菌体との接触面積が増加することが生育良好の起因の一つと考察された。

次に、N 源について検討した。硫酸アンモニウムの代わりに硝酸アンモニウム、硝酸ナトリウム、尿素について検討したところ、硝酸アンモニウムでは硫酸アンモニウムと同様の生育と pH の推移が認められた。尿素では 72 時間後、約 7.0g/L の菌体量が得られたが、増殖の立ち上がりに遅れが見られ、pH の低下は 4.8 付近までとなった。硝酸ナトリウムを用いた場合 pH は 3.6 付近まで低下したが、菌体量は 96 時間で約 0.4g/L 程しか得られなかった。これらの結果より、N 源としてアンモニウム態 N が望ましいことが判明した。さらに、硫酸アンモニウムと尿素について N 源の濃度を 0.4%としたところ、硫酸アンモニウムの場合は、0.2%と同様な結果に留まり、一方、尿素の場合はほとんど菌体量の増加が認められず、生育阻害がおきているものと思われる。現在、さらなる検討を行っている。

Cultivation, Lipid, Yeast

講演番号：2C25p13
講演日時、会場：3 月 27 日 16:32～ C 校舎 25 会場

亜リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子を用いた抗生物質を利用しない微生物の選択的培養

Selective microbial culture without the use of antibiotics: Application of phosphite dehydrogenase gene as a selection marker for microbial growth

○廣田 隆一、神田 圭輔、小野 敏志、石田 丈典、池田 丈、黒田 章夫（広島大院・先端研）
○Ryuichi HIROTA, Keisuke KANDA, Satoshi ONO, Takenori ISHIDA, Takeshi IKEDA, Akio KURODA (Hiroshima Univ.)

バイオ燃料や物質生産のための微生物培養は、一般に目的とする微生物の高純度培養を前提としており、コンタミネーションを防ぐために培地や機器の滅菌処理、抗生物質の利用が必要である。しかしながら、培養のスケールが大きくなるほど投入エネルギーや薬品調達のコストが高くなり、さらに抗生物質を含む廃液は耐性菌の出現を助長する可能性があるため、その処理は厳重に管理されなければならない。従って実用レベルに即した選択的培養手法は今後も開発され続ける様々な有用微生物の実用化を実現するための重要な課題である。我々は、安価で安全な微生物の選択的な培養方法として、亜リン酸デヒドロゲナーゼ（PtxD）を選択マーカーとした培養技術を開発した。一部のバクテリアを除き、多くの微生物は亜リン酸（H_3PO_3）をリン源として利用できないため、亜リン酸を酸化してリン酸を生じる PtxD は亜リン酸を唯一のリン源とした培地を用いることでポジティブな選択マーカーとして機能する。また、亜リン酸は抗生物質に比べると非常に安価であり安全性にも問題ないため、実用レベルでの培養に適していると考えられる。

本演題では産業上有用な微生物である出芽酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、分裂酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)、藻類(*Synechococcus elongatus*)、大腸菌(*Escherichia coli*)について、当研究室で取得した*Ralstonia* sp. 4506株由来のPtxD（RsPtxD）を導入した実施例の結果について報告する。これら 4 種の微生物を用いた検討において、亜リン酸を唯一のリン源とした最少培地にて良好な選択性を発揮するためには、十分な PtxD 発現量を確保することが必要であり、プロモーターの改善およびコドン使用頻度を宿主生物に最適化することが有効であることが明らかになった。また、*Sz. pombe* および *S. cerevisiae* においては本手法によって他の薬剤耐性や栄養要求性を利用した場合と遜色ない形質転換効率が得られることを明らかにした。現在の課題として、生物種によっては菌体収量が低下するという問題が確認されている。そこで、PtxD 導入株における細胞内リン代謝変動の解析および進化工学的手法による増殖亢進変異株の解析を行っており、本手法の汎用性をより高めるための試みを行っている。その結果についても合わせて報告する。

phosphite dehydrogenase, selection marker, antibiotics

講演番号：2C25p14
講演日時、会場：3 月 27 日 16:43～ C 校舎 25 会場

培養器の気相環境に着目した新規微生物スクリーニングシステムの開発

Development of the new microbe screening system focused on the gas phase in culture vessel.

○高橋 将人、青柳 秀紀（筑波大院・生命環境）
○Masato Takahashi, Hideki Aoyagi (Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)

【目的】

今日まで、単離培養された微生物は、自然界に存在する微生物のわずか 1%にすぎない。残された 99%の微生物種の培養を可能にするため、特別な機器などを用いた単離法や培養法が開発されてきた。一方、近年のメタゲノム解析技術の発展により、培養を介さずに難培養性微生物の検出が可能になったが、未培養微生物の機能解析を行う際、依然として単離培養技術は必須である。

我々は従来の培養法を見直すことで、未培養微生物を培養化し、微生物利用の新たな可能性を見出せるのではないかと発案し、種々検討を実施してきた [(1)]。今回は、我々が実験を通じて見出した新奇な現象（手作業のサンプリング操作にともなう短時間［30 sec］の栓の開封が集積される培養微生物群集に影響を与える）を基に、環境サンプルの振盪フラスコ培養中に、培養栓の開封が培養微生物群集に及ぼす影響を解析した。さらに、この新奇な現象を活用した、マイクロプレートを用いた新規微生物スクリーニングシステムの開発を行った。

【方法および結果】

土壌試料を、YPD 培地を用いて、500 ml 容三角フラスコで振盪培養（200 rpm、振幅 70 mm, 50℃）した。その結果、培養中にサンプリングを実施した系とサンプリングを実施しない系で、培養終了後の培養微生物群集の増殖量は同様な値を示したが、得られる培養微生物群集は大きく異なった。一定時間毎にフラスコの培養栓を無菌的に短時間開封する条件を複数設定し、土壌サンプルの培養を行った結果、培養栓を開封する時間間隔の違いにより、得られる培養微生物群集が変化した。また、R2A 培地、NBRC no.802 培地および NBRC no.227 培地を用いた系についても種々検討した結果、同様な現象が認められた（現在、フラスコ気相部の CO_2 濃度の挙動を解析中）。この現象を基に、振盪培養中の培養器内の気相環境（例えば、CO_2 濃度）変化を活用した、24 穴マイクロプレートを用いた新規微生物スクリーニングシステムの開発を試みた。その結果、本システムでは、土壌試料や海水試料において、意図的な気相環境変化を行わない従来法とは異なる培養微生物群集が認められた。

以上の結果は、従来の振盪フラスコ培養における気相環境は重要な培養環境因子であり、その制御は新規な微生物や微生物群集の獲得に有効であることを示唆するものである。

(1)第 66 回日本生物工学会講演要旨集 p. 248

aerobic culture, gas phase, DGGE

講演番号：2C25p15
講演日時、会場：3 月 27 日 16:54～ C 校舎 25 会場

Baliosperumum montanum 由来ヒドロキシニトリルリアーゼの立体選択性および触媒効率の改変
Improvement of stereoselectivity and catalytic efficiency of hydroxynitrile lyase from Baliosperumum montanum by mutagenesis

○川原 寛弘[1,2]、浅野 泰久[1,2] ([1]富山県大工・生工研セ、[2]JST, ERATO)
○Nobuhiro KAWAHARA[1,2], Yasuhisa ASANO[1,2] ([1]Toyama Pref. Univ., [2]ERATO, JST)

【目的】ヒドロキシニトリルリアーゼ(HNL)は、ケトン又はアルデヒドとシアン化合物から医薬品などの中間体として使用できる光学活性シアノヒドリンの合成反応を触媒する。当研究室では様々な植物体の HNL 活性を測定し、*Baliospermum montanum* から *S* 立体選択的 HNL(*Bm*HNL)を発見した[1]。*Bm*HNL は他の HNL に比べ熱耐性に優れ、広範囲の芳香族化合物に対して広い活性を示すことから、種々の光学活性シアノヒドリンの合成に有用である [2]。しかし、産業利用にするためには、その比活性や立体選択性の改良が望まれる。本研究では変異導入による *Bm*HNL の比活性および立体選択性の向上を目的とした。

【方法および結果】

エラープローン PCR や site-directed mutagenesis を用いて *Bm*HNL の変異体ライブラリーを構築した。次に、ハイスループットアッセイを用い、各変異体の HNL 活性を測定してスクリーニングを行ったところ、いくつか高活性を示す変異体を得た。その中で最も高活性を示す *Bm*HNLH103C/N156G 変異体に着目し解析を行った。まず *Bm*HNLH103C/N156G を精製し、ベンズアルデヒドからの(*S*)-マンデロニトリル(MAN)合成の立体選択性を比較した。その結果、鏡像体過剰率は H103C 変異体と比較し、約 50%から 75%に増加していた。また MAN に対する反応動力学定数を求めて Asn156 の機能をより詳細に検討した。その結果、本変異体は H103C 変異体と比較して(*R*)-MAN に対する K_m 値が 5 倍上昇し、k_{cat}/K_m 値が 1/3 程度に減少していた。また(*S*)-MAN に対する K_m 値にはほとんど変化がなく、k_{cat}/K_m 値が 1.6 倍上昇していた。よって、Asn156 の変異により酵素の基質に対する親和性と触媒効率が変化することで(*S*)-MAN に対する立体選択性を向上させることが明らかとなった。

我々は以前に *Bm*HNL に類似した *Manihot esculenta* 由来のα/β-hydrolase 型 HNL にて、His103 の変異が酵素の可溶化に関与していることを明らかにした[3]。また今回の解析よりに Asn156 変異が立体選択性の向上に関与しており、*Bm*HNLH103C/N156G は 2 点変異により、可溶化並びに立体選択性、および酵素活性を向上させたと考えられる。

参考文献

1. Y. Asano et al, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **69** , 2349-2357 (2005).
2. M. Dadashipour et al, *J. Biotechnol.*, **153 (3-4)**, 100-110 (2011).
3. Y. Asano et al, *PEDS.*, **24 (8)**, 607-616 (2011).

nitrile, mutagenesis, stereoselectivity

講演番号：2C25p16
講演日時、会場：3 月 27 日 17:15～ C 校舎 25 会場

インフルエンザウイルスの高頻度変異タンパク質ヘマグルチニンに対するハイスループットな新規阻害剤スクリーニングの系の構築

Development of a high-throughput inhibitor screening system for frequently mutated hemagglutinin of influenza virus

○西岡 良将[1]、山田 純希[1]、三浦 夏子[2]、重盛 智大[1]、黒田 浩一[1]、植田 充美[1] ([1]京都大農、[2]アメリカ国立衛生研究所)
○Ryosuke Nishioka[1], Junki Yamada[1], Natsuko Miura[2], Tomohiro Shigemori[1], Kouichi Kuroda[1], Mitsuyoshi Ueda[1] ([1]Kyoto Univ., [2]National Institute of Health)

【背景と目的】
インフルエンザウイルスの感染には、ヘマグルチニン(HA)とノイラミニダーセ(NA)の二種類の主要な膜タンパク質が関与している。これらの膜タンパク質の高い変異率により、H5N1 亜型のような高病原性の新型インフルエンザウイルスの出現も、数多く報告されている。ところで、NA 阻害剤として現在最も使われている 2 次感染予防インフルエンザ薬であるタミフルへの耐性をもったインフルエンザウイルスの出現もいくつか報告されてきている。したがって、高頻度に変異するインフルエンザウイルスに対し、迅速に対応可能である新規な方法を構築する必要がある。我々は、これまで 2 次感染に関わる NA とその変異体の高速作成と阻害剤評価系を創製してきた[1]。現在、HA に対して臨床的に使用されている薬剤はない。HA は 1 次感染に重要なタンパク質として、ウイルスの細胞への侵入、融合の際に重要な役割をしており、HA の働きを阻害することでインフルエンザウイルスの宿主細胞への感染の 1 次作用自体を予防することができる。本研究では、インフルエンザウイルスの HA とその変異体を酵母細胞表層に提示できる細胞表層工学を用いる[2]ことで、新規薬剤開発を目指すスクリーニング系の構築を試みた。
【方法と結果】
細胞表層工学を用いて、酵母細胞表層に H1N1 亜型由来である HA を酵母細胞表層での発現に成功した。また、提示した HA について、赤血球凝集反応測定により酵母表層上での活性を確認し、その総合的な能力も評価してきた。さらに、HA に対する阻害剤スクリーニング系への応用を行っているので、まとめて報告する[3]。

[1] Yamada J *et al*. Influenza and RNA Viruses: Emergence, Classification and Management (Nova science publisher), 91-100 (2014)
[2] Kuroda K, *et al*. Methods in Molecular Biology, 1152, 137-155 (2014)
[3] Nishioka R, *et al*. submitted

Influenza virus, cell surface engineering, high-throughput screening

講演番号：2C25p17
講演日時、会場：3 月 27 日 17:26～ C 校舎 25 会場

H5 亜型高病原性鳥インフルエンザウイルスの迅速診断キットの開発

Development of rapidly detectable diagnostic kit for highly pathogenic avian influenza virus (H5)

○庄屋 雄二[1]、石田 有希子[1]、豊浦 雅義[1]、丸 勇史[1]、吉國 義明[1]、内田 裕子[2]、西藤 岳彦[2]、金 武祚[1] ([1]（株）ファーマフーズ、[2]（独）農研機構・動衛研)
○YUJI SHOYA[1], AKIKO ISHIDA[1], MASAYOSHI TOYOURA[1], ISAFUMI MARU[1], YOSHIAKI YOSHIKUNI[1], YUKO UCHIDA[2], TAKEHIKO SAITO[2], MUJO KIM[1] ([1]Pharma Foods International Co., Ltd, [2]NIAH, NARO)

【目的】H5亜型高病原性鳥インフルエンザウイルス(HPAIV)は、家畜伝染病予防法上の法定伝染病であり、度々我が国に侵入し養鶏農場の大きな脅威となっている。また、変異によりヒトに対して致死率の高いパンデミックウイルスとなる危険性がある。更には、ウイルスの国内への侵入には野鳥が関わっている為、HPAIVの侵入を防ぐことは非常に難しい。一方で、HPAIVは抗原変異が著しいため、H5亜型特異的な診断キットの開発が難しく市販されていない。そこで我々は、H5亜型特異的なモノクローナル抗体を開発し、それを用いた迅速且つ簡便なHPAIV診断キットの開発を行った。その結果について報告する。

【方法】1997年以降に分離された公共データベースに登録されているHPAIVヘマグルチニン(HA)のアライメント解析により高度保存領域を特定した後、三次元構造解析によりH5亜型特異的抗原部位を同定した。この部位に対する合成ペプチドをニワトリに免疫した後、ファージディスプレイ法を利用して、モノクローナル抗体を得た。得られたモノクローナル抗体を用いてサンドイッチELISAにより検出系の開発を行った。これらの成果を元に、H5亜型特異的診断キットの作製を行った。

【結果】2812 種類の HPAIV が有する HA のアライメント解析の結果 99.4%が保存されている部位を同定した。同定された部位に対するニワトリモノクローナル抗体を作製し、亜型間での特異性を確認したところ、H5 亜型のみに陽性を示し、H5 を除く H1~H16 亜型に対しては陰性であった。また、国内外で発生した変異 H5 亜型に対しても全て陽性を示した。以上の結果より、本抗体は H5 亜型に特異的かつ、変異 H5 亜型にも反応性を示す抗体であることが判明した。更に本抗体を利用したサンドイッチ ELISA 検出系を確立した。現在、イムノクロマトグラフィーを利用した検出キットの作製に着手している。本キットは、国内外、特に HPAIV 発生国での早期検出、拡散防止に貢献できるものである。

【謝辞】
本研究は文科省「社会システム改革と研究開発の一体的推進」プログラムの助成を受けて実施されたものです。

avian influenza virus, antibody

講演番号：2C25p18
講演日時、会場：3 月 27 日 17:37～ C 校舎 25 会場

Ralstonia sp.NT-80 由来エステラーゼの部位特異的アミノ酸置換と機能解析
Functional analysis for the esterase from *Ralstonia* sp. NT-80 by Site-directed mutagenesis
○久保田 和貴、太田 友彦、岩間 祐介、並木 謙太、月村 亘、赤沼 元気、石塚 盛雄 (中央大学)
○Kazuki KUBOTA, Tomohiko OHTA, Yusuke IWAMA, Kenta NAMIKI, Wataru Tsukimura, Genki AKANUMA, Morio ISHIDUKA (Chuo Univ.)

我々はこれまでに *Ralstonia* sp.NT-80 由来エステラーゼ(Est80)の単離精製、および遺伝子クローニングに成功している。大腸菌内で発現し、精製した本酵素の機能解析によりカルボン酸エステル、特に三種のラクトン化合物に対して高い特異性を有していることが明らかにされた。ラクトン化合物は医薬品や香料等の合成中間体として利用されていることから、ラクトン特異的に作用する本酵素は有用な研究対象であると言える。一方、本酵素は熱に対して不安定であり、45°C で 1 時間加熱すると 60%まで活性が低下し、50°C の加熱でほぼ失活する。この問題に対して我々は、PCR エラーを利用した変異導入を試み、5 つのアミノ酸置換が起こった変異体の作製に成功した。機能解析の結果、作製した変異酵素は熱安定性や有機溶媒耐性などが向上していることが明らかになった。しかし、このアミノ酸置換が本酵素の立体構造にどのような変化を起こし、機能向上をもたらしているのかは不明である。そこで本研究では、5 つのアミノ酸置換をそれぞれ単独で導入した場合の影響について明らかにすることを目的とした。

Quick Change 部位特異的変異導入法によって作成した変異酵素を粗精製し、熱安定性への影響を検証した結果、5 つのアミノ酸置換のうち R29C、R96H、N212D の 3 種の変異が熱安定性を向上させ、Q82L、R286H の 2 種の変異は熱安定性を低下させることが観察された。そこで、熱安定性を低下させる 2 種のアミノ酸置換を除く変異酵素を作製し、5 重変異酵素よりもさらに熱安定性が向上することを確認した。

また、本酵素は疎水性が非常に高いため、37°C で発現させると大腸菌内で凝集し、不溶性となる。そこで機能を保持したまま可溶化させるために、低温・低速度で発現を抑制させて長時間発現誘導を行い、界面活性剤 EMALGEN LS-114 を用いることで本酵素の可溶性向上に成功した。Histidine タグ付き融合蛋白質として発現された酵素を Ni-NTA affinity によって精製し、酵素 1 mg 当たりの比活性を算出した結果、ほとんどの変異酵素で比活性の減少が観察された。これはアミノ酸置換による構造変化によってタンパク質構造が硬化し、触媒反応を行う際の構造変化が柔軟に行えなくなったため、反応速度や活性が低下したものと予想される。これらの検証結果に加え、精製した変異酵素の機能解析について同様に検証を行った結果についても併せて報告する。

Esterase, mutagenesis, *Ralstonia*

講演番号：2C25p19
講演日時、会場：3 月 27 日 17:48～ C 校舎 25 会場

細胞増殖抑制活性を有する非天然アミノ酸含有ジペプチド誘導体の構造と活性との相関

Difference in mode of action for cytostatic activity of non-natural dipeptide derivatives

○田村 丹[1]、岩崎 崇[2]、森 信寛[2]、有馬 二朗[2] ([1]鳥取大院農、[2]鳥取大農)
○Akira TAMURA[1], Takashi IWASAKI[2], Nobuhiro MORI[2], Jiro ARIMA[2] ([1]Grad. Sch. of Agric Tottori Univ., [2]Fac of Agric. Tottori Univ.)

【目的】非天然アミノ酸である D-アミノ酸や人工アミノ酸を含有するペプチドには、特異な生理活性を示す例があり、多様な機能や生理活性が期待できる素材であると考えられている。しかしそのようなペプチドは、自然界に殆ど存在していないため、その構造と活性との相関は未だ網羅されていない。我々はこれまでに D-アミノ酸誘導体をアシル供与体として、L-アミノ酸誘導体をアシル受容体として優先的に利用してアミノリシス反応を触媒する酵素、放線菌由来 D 体特異的アミド加水分解酵素（DAH）を取得した。また、DAH の酵素反応液から、腫瘍細胞に対して細胞増殖抑制活性を有するジペプチド誘導体 : D-Phe-Gly-OBzl 及び D-Nle-L-Leu-OBzl を見出した。本研究では両化合物の細胞に対する作用の違いに焦点を当て、構造と活性の相関を解析した。

【方法】D-Phe-Gly-OBzl 及び D-Nle-L-Leu-OBzl は、D-Phe-OMe と Gly-OBzl、または D-Nle-OMe と L-Leu-OBzl を基質とした DAH の酵素反応液から、ODS カラムを使用して抽出・精製した。両化合物の構造置換体、D-Phe-L-Leu-OBzl および D-Nle-Gly-OBzl は、D-Phe-OMe と L-Leu-OBzl、または D-Nle-OMe と Gly-OBzl を基質とした DAH の酵素反応液から、ODS カラムを使用して抽出・精製した。D-Phe-Gly-OBzl や D-Nle-L-Leu-OBzl の腫瘍細胞に対する影響は、それぞれで処理した細胞におけるアポトーシスの割合と時間推移を解析することで評価した。アポトーシスを起こした細胞の割合は、ホスファチジルセリンが細胞膜外に移行し、且つ細胞膜破壊が起こっていない初期アポトーシス表現型を示した細胞数の割合を、アネキシン V 染色を用いて算出した。

【結果】D-Phe-Gly-OBzl もしくは D-Nle-L-Leu-OBzl で処理をした細胞に対し、アネキシン V 染色を用いて、アポトーシスを起こした細胞の割合の時間推移を検討した結果、D-Phe-Gly-OBzl では上昇しているのに対して、D-Nle-L-Leu-oBzl ではほぼ横ばいになった。更に構造置換体である D-Phe-L-Leu-OBzl、D-Nle-Gly-OBzl で Jurkat を処理すると、D-Nle-Gly-OBzl のみでアポトーシスを起こした細胞の割合が時間経過とともに上昇した。以上のことから Gly の構造がアポトーシス誘導において重要な役割を担っていると推測している。現在、さらに構造と作用の関係の詳細を調べるべく、D-Phe-Gly-OBzl および D-Nle-L-Leu-OBzl の光学異性体も合成中である。

D-Amino acid, tumor cell, peptide

講演番号：2C25p20
講演日時、会場：3 月 27 日 17:59～ C 校舎 25 会場

Bacillus sp. TB-90 由来ウリカーゼ高活性化変異体 P287G の構造機能解析

Structural and Functional Analysis of *Bacillus* sp. TB-90 Urate Oxidase Mutant P287G

○林 祐太[1]、伊藤 貴文[1]、西矢 芳昭[2]、岸本 高英[3]、日ビ 隆雄[1] ([1]福井県大生物、[2]摂南大理工、[3]東洋紡敦賀バイオ)
○Yuta Hayashi[1], Takafumi Itoh[1], Yoshiaki Nishiya[2], Takahide Kishimoto[3], Takao Hibi[1] ([1]Fukui Prefecture Univ., [2]Setsunan Univ., [3]Toyobo Co., Ltd.)

Bacillus sp.TB-90 由来のウリカーゼ(BUO)は、分子量 38, 000 のサブユニットからなるホモ 4 量体の酵素で、極めて特異的に尿酸の酸化反応を触媒することから尿酸の定量分析に広く用いられている。また臨床分析への応用の他に、高尿酸血症の治療薬、美白用化粧品、毛髪染色の反応開始剤などの用途に利用されている。

野生型 BUO の X 線結晶構造解析の結果、サブユニット界面に存在し酵素活性中心の形成に関わるインターフェースループ II (277-300)は高い温度因子を示した。さらにループへのイオン結合やアミノ酸残機置換の影響を調べると、本ループが活性中心から十分離れ、かつ表面に露出した位置にあるにもかかわらず、そのフレキシビリティが酵素活性に重要であることが示唆された。そこで、本ループ上にあるβターン構造を安定化すると予想された Pro 287 に着目し、グリシン残基に置換した変異体酵素 P287G を作製した結果、高活性化することを見出した（特許第 4890132)。そこで、P287G 変異体 BUO の高活性化機構を明らかにするため、本酵素活性の温度依存性、限定加水分解および X 線結晶構造解析を実施した。

変異体酵素 P287G の比活性は、測定した 15℃～55℃の温度領域で野性型 BUO に比べて 1.3～1.9 倍に増大していた。本変異体酵素の熱安定性には大きな変化はなく、酵素活性の温度依存性にも違いはなかった。P287G および野生型 BUO の k_{cat} を求め、Eyring プロットを作成した結果、本高活性化の原因が活性化エンタルピー($\Delta H^{\ddagger}$)の低下ではなく、活性化エントロピー($\Delta S^{\ddagger}$)の増大（+28 J/mol/K）にあることが示唆された。そこで、P287G 変異体が酵素の溶液構造に与える変化を調べるため、V8 プロテアーゼを用いた限定加水分解を行った。その結果、Glu197 もしくは Glu191 の C 末端側でプロテアーゼによる特異的な切断を受けていること、さらにこの切断は特異的阻害剤の結合により保護されることから、本ループは基質等の結合に伴い切断を受けないよう固定されることが示唆された。また、P287G 変異体では野生型と比較して有意に切断の速度が大きく、リガンド結合に伴う構造変化が生じやすく、ループの揺らぎが大きいことが示唆された。P287G の変異による構造変化の詳細を調べるため、X 線結晶構造解析を行っている。一般に、$\Delta S^{\ddagger}$ と $\Delta H^{\ddagger}$ の変化は互いに補償しあうが、アミノ酸部位特異的置換に伴って生じた $\Delta S^{\ddagger}$ の増大による酵素活性化の報告例はほとんどなく、その分子機構の解明は酵素触媒高活性化のデザインに役立つと期待される。

Urate Oxidase, protein engineering, enzyme analysis

講演番号：2C22a01
講演日時、会場：3 月 27 日 09:00～ C 校舎 22 会場

シイタケ由来菌体外酸性プロテアーゼ遺伝子のクローニング

Gene cloning of extra cellular acid-protease from *Lentinula edodes*

○福田 泰久、岩永 卓也、松下 朋加、寺下 隆夫、白坂 憲章（近大農）
○Yasuhisa FUKUTA, Takuya IWANAGA, Tomoka MATSUSHITA, Takao TERASHITA, Norifumi SHIRASAKA (Kindai Univ.)

【背景と目的】きのこ類微生物の最大の特徴は、きのこ（子実体）形成という形態的変化であるが、生化学的なメカニズムは未解明である。当研究室では、各種プロテアーゼ群の活性化と不活化が、子実体形成に深くかかわり、形態変化の制御因子として働いていることを報告してきた。

Lentinula edodes（シイタケ）は、①菌体外に酸性プロテアーゼ、栄養菌糸中に②酸性プロテアーゼと③メタルプロテアーゼ、子実体中に④酸性プロテアーゼと⑤メタルプロテアーゼ、さらに、子実体の開傘（担子胞子形成時）に誘導される⑥酸性プロテアーゼの計 6 種類のプロテアーゼを生産し、その詳細な酵素化学的諸性質が報告されている。しかしながら、これらのプロテアーゼ群をコードする塩基配列、アミノ酸配列、また、きのこ生長過程における種々のプロテアーゼ遺伝子の発現時期は未解明であった。

本演題では、上記に示したプロテアーゼ群の内、①菌体外酸性プロテアーゼ遺伝子のクローニングと、シイタケ生活環における本遺伝子の発現時期について報告する。

【方法と結果】*Lentinula edodes* 森 465 株を供試菌株として用い、ポテトデキストロース液体培地で、明所、24℃、50 日間静置培養した。酵素反応はヘモグロビン（pH3.0 条件下）を基質として、フォーリンチオカルト法によるチロシンの遊離量を測定することにより、酵素活性を算出した。培養液を回収後、硫安分画、各種クロマトグラフィーを用いて、菌体外酸性プロテアーゼを精製した。本酵素の N 末端アミノ酸配列を 15 残基解析したところ、T-I-L-Y-A-G-V-N-E-S-G-G-E-F-G であり、ForestGEN *L. edodes* ゲノムアノテーションシステム上における AUGUSTUS01_g3732.t1 遺伝子と 100%配列が一致した。本遺伝子のアミノ酸配列を BLAST 検索したところ、*Fomitiporia mediterranea*、*Leucoagaricus gongylophorus*、*Galerina marginata* などが由来の endo-cellulase と高い相同性を示した。現在、本酵素の詳細な性質を解明するために、本遺伝子の異種遺伝子発現条件を検討している。

【謝辞】本研究は、JSPS 科研費 26870730 の助成を受けたものである。

Lentinula edodes, acid-protease, endo-cellulase

講演番号：2C22a02
講演日時、会場：3 月 27 日 09:11～ C 校舎 22 会場

膵島分離に用いる *Clostridium histolyticum* 由来の臨床用組換え neutral protease の調製と、新規特異的基質の設計

Preparation of clinical recombinant neutral protease of *Clostridium histolyticum* for islet separation and design of a novel specific substrate for the enzyme

○前田 浩[1,2]、村山 和隆[3]、渡邉 君子[1]、後藤 昌史[1,4]、山形 洋平[1,2]（[1]東北大学 NICHe、[2]東京農工大学農、[3]東北大学医工、[4]東北大学医）

○Hiroshi MAEDA[1,2], Kazutaka MURAYAMA[3], Kimiko WATANABE[1], Masafumi GOTO[1,4], Youhei YAMAGATA[1,2] ([1]Tohoku Univ. NICHe, [2]Tokyo Univ. of Agri. and Tech., [3]Tohoku Univ. BME, [4]Tohoku Univ. Med)

【背景】 膵島移植とは、インスリン依存糖尿病（1 型糖尿病）に対する治療法の一つである。ドナー膵臓より、酵素を用いて細胞外マトリックスタンパク質を分解し、インスリンを産生するβ細胞を含む膵島のみを分離し、レシピエントの肝内門脈にカテーテルによって注入する細胞移植に分類される、膵臓移植とは異なり低侵襲性な治療法である。膵島は移植後に生着し、血糖値に応じてインスリンを分泌することで、インスリン注射からの離脱による QOL の向上が見込める糖尿病の根治療法である。この膵島移植の成否は膵臓から良質な膵島を大量に分離できるかにかかっている。

膵島分離には *Clostridium histolyticum* の培養上清から調製された酵素剤が用いられていた。この酵素剤には collagenase I/II (ColG, ColH)、neutral protease (NP) が含まれているとされていた。その後、酵素剤の精製度が向上し、2 種のコラゲナーゼと thermolysin (TL) が用いられはじめたが、従来とは異なる膵島分離傾向を示した。我々は、この差異が NP と TL の基質特異性の違いによるものと考えた。

【目的・方法】 我々は臨床用 NP の生産および NP の基質特異性の解明を第一の目的とした。さらに市販の *C. histolyticum* の培養上清由来の酵素剤中に含まれる各酵素量を算出する為に、NP 特異的基質を設計することを第二の目的とした。

NP の発現には *Bacillus subtilis* を宿主として用い、BSE 問題を回避するために動物由来の成分を含まない培地を用い、その培養上清からの精製を試みた。また、種々の生理活性ペプチドに対する切断性から基質特異性を推定した。

【結果】 4.8 L の組換え *B. subtilis* 培養上清より 12.9 mg のエンドトキシンフリーな NP 精製標品を得た。生理活性ペプチドに対する切断性より、NP は P_1’ 位の Ala と Pro を除く疎水性アミノ酸を認識すること、P_3’ 位のアミノ酸をも認識することが明らかとなった。次いで NP の基質特異性より減光基質である FA-Gly-Phe-Tyr-amide を設計し、酵素剤に含まれると考えられる他のプロテアーゼでは切断されない NP 特異的基質であることを確認した。さらに NP と TL の本基質と種々のペプチド基質に対する分解特性から、TL は NP に比べ基質特異性が広く、このことが TL を膵島分離に用いた際に過分解が起こる原因の一端であることが示唆された。

平成 21-25 年度 文部科学省・橋渡し研究支援推進プログラム「アカデミアの TR 拠点が創出する膵島移植確立のための戦略的アプローチ・安全で高性能な細胞分離用酵素剤の臨床応用」

neutral protease, *Clostridium histolyticum*, islet separation

講演番号：2C22a03
講演日時、会場：3 月 27 日 09:22～ C 校舎 22 会場

カルパインの基質切断部位の特異性解明に向けた網羅的解析

A proteomic approach for elucidation of calpains' substrate specificities

○大内 史子[1]、進藤 真由美[2]、秦 勝志[1]、小野 弥子[1]、反町 洋之[1] ([1]都医学研・カルパイン PJ、[2]都医学研・基盤技術研究センター)
○Fumiko Shinkai-Ouchi[1], Mayumi Shindo[2], Shoji Hata[1], Yasuko Ono[1], Hiroyuki Sorimachi[1] ([1]Calpain PJ, Tokyo Metropolitan Inst. of Med. Sci., [2]Basic Technology Res. Center, Tokyo Metropolitan Inst. of Med. Sci.)

カルパインは細胞質内カルシウム依存的 Cys プロテアーゼで、多くの生理機能を果たす。その作用機序は基質の限定的切断に担われ、カルパインの基質特異性が大きく寄与している。これまでに報告された切断部位周辺配列の position-specific scoring matrix（PSSM）法や機械学習による解析から、カルパインの基質認識配列の選択性はアミノ酸一次配列からは明示されないことが判明している。その一方で、カルパインによる限定分解は、生理的条件下では必ず特定の部位が切断されることが観察されており、多くの切断可能な部位から生理的な切断部位が選択される機構は未解明である。そこで、まず予測通りに多くの部位で基質を分解するのかについて *in vitro* で確認した。

高純度の精製タンパク質 14 種類をそれぞれカルパイン 1 または 2 により徹底分解した結果、限定分解されて比較的大きな断片が検出されたタンパク質（I 型基質, 3 種）、分子量 3,000 以下のペプチドのみが生成されたもの（II 型基質, 10 種）、消化抵抗性のもの（1 種）に分類された。得られたペプチド配列を nanoLC-質量分析システムにより解析し、約 2,000（全ペプチド結合の約 4 割に相当）のカルパインによる切断部位が同定でき、これらには予測された切断部位が多く含まれていた。以上より、カルパインは生理的条件下での限定分解から予想されるより多くの部位で基質を切断することが確認された。また、II 型基質の切断部位は分子全体に分布し、検出頻度の高い切断部位は、立体構造上では分子表面のループやαヘリックスの端など非構造的な領域に分布していた。以上から、カルパインによる限定分解は酵素・基質濃度や作用時間と基質の高次構造の安定性とのバランスによって成立していると考えられた。即ち、高次構造が安定な基質ではドメイン間のリンカー部位などが切断対象となるが、切断の結果構造が不安定化するような基質では、さらに切断が進んでいくと考えられた。また生理的条件下では、局在や他の分子との相互作用などの影響も大きいと考えられた。

一方、普遍的に発現する主要なカルパインにはカルパイン 1、2 の二種が存在するが、これまでに基質特異性の差は見出されておらず、機能も重複すると考えられてきた。上述の徹底分解により得た両カルパインによる切断部位前後の配列を抽出し、各部位におけるアミノ酸の出現頻度を比較したところ、両者のアミノ酸嗜好性はよく類似しており、報告されている切断部位周辺配列ともほぼ一致した傾向を示した。しかし、詳細な比較の結果、産生ペプチドの平均鎖長はカルパイン 2 が 1 よりも有意に長いこと（13.8 vs 14.5 aar, p <0.001）、各サブタイプに特異的な切断部位が約 15%存在することを見出した。また、これらのサブタイプ特異的切断部位の比較から、カルパイン 1 特異的な切断部位は基質の C 末端近傍に多いことが明らかとなった。以上より基質選択性の違いによりサブタイプ間で機能を分担する可能性が示唆された。

Calpain, substrate specificity, limited proteolysis

講演番号：2C22a04
講演日時、会場：3 月 27 日 09:33～ C 校舎 22 会場

筋特異的カルパイン CAPN3 の分子間相補による活性化

Activation of CAPN3 through inter-molecular complementation

○小野 弥子[1]、進藤 真由美[1]、土井 奈穂子[1]、北村 ふじ子[1]、Gregorio Carol C.[2]、反町 洋之[1]（[1]公財・東京都医学総合研究所、[2]アリゾナ大学医学部）
○Yasuko Ono[1], Mayumi Shindo[1], Naoko Doi[1], Fujiko Kitamura[1], Carol C. Gregorio[2], Hiroyuki Sorimachi[1] ([1]Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science, [2]University of Arizona)

細胞内システインプロテアーゼであるカルパインは、脊椎動物においてスーパーファミリーを形成する。その一員である CAPN3/p94 には、骨格筋に発現し、非常に強い自己分解活性を持つという特徴がある。また、肢帯型筋ジストロフィー2A 型(LGMD2A)の責任遺伝子産物であることから、自己分解活性も含めたプロテアーゼ活性の生理機能が注目されている。更に、近年、CAPN3 がそのプロテアーゼ活性に依存しない機能（非酵素機能）を持つことが明らかとなり、総合的な生理機能の理解が必要とされている。

我々は、LGMD2A 患者の中で、特定の点変異の複合ヘテロ接合体が各点変異のホモ接合体よりも症状の緩和傾向を示すという興味深い例に着目し、CAPN3 の活性実体について再検討した。特に、点変異の分子内での位置が、自己分解前後の CAPN3 においてどのような関係にあるかに注目した。その結果、CAPN3 には以下二点の新奇特性が存在することを見出した。CAPN3 は自己分解によって、それぞれプロテアーゼドメインの一部を含む N 末端断片（N_{31K}: プロテアーゼドメイン前半に相当）と C 末端断片（C_{58K}: プロテアーゼドメイン後半以降の分子全体）に分かれるが、1) N_{31K} 及び C_{58K} は、それぞれ単独では不活性であるが、分子間相補によりプロテアーゼ活性を再構築する。2) N_{31K} 及び C_{58K} は、全長の CAPN3 のプロテアーゼ活性欠失変異体と相互作用し、その自己分解を引き起こす。つまり、CAPN3 の自己分解過程において、その分解産物同士、あるいは分解産物と未分解分子間がさらに相互作用し、自己分解活性が得られることになる。このように、プロテアーゼ活性が分子内だけでなく分子間でも相補的に構築されるという現象は、非常に希有な例である。この知見をもとに、LGMD2A の発症機構及び遺伝子型-表現型相関について新たな視点が確立されることが期待される。

calpain, skeletal muscle, muscular dystrophy

講演番号：2C22a05
講演日時、会場：3 月 27 日 09:44～ C 校舎 22 会場

アンギオテンシン変換酵素 2 基質の開発と応用
Development of ACE2 substrate and its application

○高橋 砂織[1]、畠 恵司[1]、熊谷 久美子[2] ([1]秋田県総食研、[2]（株）ペプチド研)
○Saori Takahashi[1], Keishi Hata[1], Kumiko Kumagae[2] ([1]Akita Res. Inst. Food & Brewing, [2]Peptide Inst. Inc.)

レニン・アンギオテンシン系は昇圧系として重要な役割を持っている。腎臓で生合成されたレニンは、様々な刺激で血中に放出され、アンギオテンシンノーゲンよりデカペプチド、アンギオテンシン I（AI）を生成する。AI はアンギオテンシン I 変換酵素（ACE）によりオクタペプチド、アンギオテンシン II（AII）となり血管収縮を引き起こす他、副腎からのアルドステロン分泌を促進し、結果として血圧上昇を引き起こす。一方、肺、心臓や腎臓には ACE のホモローグであるアンギオテンシン変換酵素 2（ACE2）の存在することが知られている。ACE2 は AI より A1-9 をまた、AII より A1-7 を生成する。A1-7 及び A1-９は AII とは反対に血管弛緩を引き起こし、血圧降下をもたらす。一方、ACE2 は膜タンパク質であり、重症急性呼吸器症候群（Severe Acute Respiratory Syndrome, SARS）の原因となるコロナウイルス類が持つスパイクタンパク質の受容体であることが知られている。したがって、ACE2 の活性化因子や阻害因子はこれら疾患の予防や治療に寄与することが期待される。本研究では、ACE2 活性測定方法について検討するとともに、阻害物質の探索系を構築し各種食材より ACE2 作用物質の探索をおこなった。

これまで、ACE2 の活性測定にはカスパーゼ用の基質である MCA-Tyr-Val-Ala-Asp-Pro-Lys（Dnp）や MCA-Ala-Pro-Lys（Dnp）などが用いられてきた。しかしながら、これらの基質は ACE2 の基質特異性を加味して合成されておらず、より効率的な基質開発が望まれていた。そこで、ACE2 の AII 認識部位アミノ酸配列を基に N 末端に 2-(*N*-methylamino)benzoyl（Nma)基をまた、C 末端に N^{ε}(2,4-dinitrophenyl)-L-Lys(Lys(Dnp))を導入した各種蛍光消光基質(Nma-Xaa-Pro-Lys(Dnp))を合成し、ACE2 との反応性を検討した。その結果、Nma-His-Pro-Lys(Dnp)が ACE2 の最も優れた基質であることが示された。本基質と組換え型 ACE2（CALBIOCHEM）を用いて、至適ｐH、塩濃度や界面活性化剤濃度などを検討し ACE2 阻害活性測定条件を設定した。各種食材の抽出液を用いて ACE2 活性に及ぼす影響を検討した結果、ある種の山菜や野菜類の抽出液に ACE2 阻害活性の存在が確認された。今後、阻害物質の精製及び構造解析を進める予定である。

Angiotensin coverting enzyme, Angiotensin converting enzyme 2, Angiotensin

講演番号：2C22a06
講演日時、会場：3 月 27 日 10:05～ C 校舎 22 会場

Clan PA に属する Exopeptidase family S46 の構造機能相関の解明

Elucidation of structure-function relationships of exopeptidase family S46 belonging to clan PA

○鈴木 義之[1]、阪本 泰光[2]、田中 信忠[3]、小笠原 渉[1] ([1]長岡技科大生物、[2]岩手医大薬学、[3]昭和大薬学)
○Yoshiyuki SUZUKI[1], Yasumitsu SAKAMOTO[2], Nobutada TANAKA[3], Wataru OGASAWARA[1] ([1]Dept. of Bioeng., Nagaoka Univ. of Tech., [2]Sch. of pharm., Iwate Med. Univ., [3]Sch. of pharm., Showa Univ.)

【目的】*Pseudoxanthomonas mexicana* WO24 株由来 Dipeptidyl aminopeptidase BII (DAP BII) はペプチド鎖をジペプチド単位でアミノ末端から分解するエキソペプチダーゼであり、広い基質特異性を有し、イミド結合も切断する。本酵素は新規なエキソペプチダーゼ Family である Family S46 に属する。Family S46 酵素は、歯周病菌 *Porphyromonas gingivalis* や多剤耐性菌 *Stenotrophomonas maltophilia* 等の細菌に存在し、これら細菌のペプチド代謝機構に重要な酵素であると考えられている (Ohara-Nemoto,Y. *et al. J. Biol. Chem.* 2012)。Family S46 は、所属酵素が総じてエンドペプチダーゼである Clan PA に分類され、当該 Clan における唯一のエキソペプチダーゼ Family である。しかしながら、Family S46 酵素の三次元構造は明らかになっておらず、触媒三組残基は Ser が実験的に同定されているにとどまっている。本研究は、DAP BII の構造機能相関の解明により、Clan PA の Endo/Exo 分解機構に関する知見を得る事を目的として、触媒三組残基の同定、立体構造解析および N 末端認識残基の同定を行った。

【結果と考察】DAP BII の触媒残基を推定するために、NCBI の PSI-blast 検索で得られた相同タンパク質と DAP BII のアミノ酸配列でマルチプルアライメントを作成した。その結果、DAP BII の触媒残基候補として H86、S657 および 5 つの Asp (D195、D214、D224、D522 および D574) を推定した。触媒残基の同定のために、His および Ser 候補について Ala 置換体、Asp 候補について Ala および Asn 置換体を作成した。これら置換体に対する生化学解析により、触媒三組残基が H86-D224-S657 であると同定し、活性中心の位置を特定した (Suzuki, Y. *et al. Sci. Rep.* 2014)。

DAP BII の結晶化と X 線回折測定を試み、成功した (Sakamoto, Y. *et al. Acta Crystallogr. F Struct. Biol. Commun.* 2014)。位相決定にも成功し、DAP BII の立体構造解析を成した (Sakamoto, Y. *et al. Sci. Rep.* 2014)。その結果得られた立体構造において本酵素が Clan PA 酵素に共通な触媒ドメインと、Family S46 酵素にのみに存在するαヘリクスドメインを有することを明らかにした。触媒三組残基 H86-D224-S657 は、触媒活性に適した位置に配置されており、生化学解析の結果が裏付けられた。複合体の構造解析の結果、基質 N 末端を認識する N215、W216、N330 および D674 を見いだした。これら残基の Ala 置換体に対する生化学解析の結果、これら N 末認識残基が基質認識に大きな寄与を果たしていることが明らかになった。

Peptidase, Family S46, Structure-function relationship

講演番号：2C22a07
講演日時、会場：3 月 27 日 10:16～ C 校舎 22 会場

米ぬか由来の歯周病菌プロリルトリペプチジルペプチダーゼ阻害タンパク質

Inhibitor from rice for prolyl tripeptidyl peptidase from periodontal pathogen

○安形 博菜[1]、西村 仁[1]、中嶋 義隆[1]、伊藤 潔[2]、芳本 忠[1] ([1]摂南大理工、[2]摂南大薬)
○Hirona Agata[1], Hitoshi Nishimura[1], Yoshitaka Nakajima[1], Kiyoshi Ito[2], Tadashi Yoshimoto[1] ([1]Fac.Sci. Tech., Setsunan Univ., [2]Fac. Pharm. Sci., Setsunan Univ.)

〔目的〕日本人の６０％が歯周病菌に感染しており、口臭や歯が抜ける病気である。更に脳に感染すると重篤となることが知られており、予防薬が求められている。歯周病菌の主たるものは *Porphylomonas gingivalis* で、嫌気性菌で糖を利用できず、エネルギー源としてアミノ酸を利用する特殊な菌である。そのため同菌は種々のプロテアーゼやペプチダーゼを持っている。歯肉コラーゲンを分解してアミノ酸を栄養とするためにはアミノペプチダーゼによる分解が必要である。一般にコラーゲンは-（Gly-X-Pro）n-配列で、アミノペプチダーゼは X-Pro 結合を切ることはできない。そのため、プロリルトリペプチジルペプチダーゼ（PTP、Ｎ末から３番目がプロリンのとき切断する酵素）が分解の律速酵素となり、PTP 阻害剤が兵糧攻めとして働くことが考えられる。これまで *P. gingivalis* の酵素遺伝子を大腸菌で高発現に成功し酵素を結晶化してＸ線結晶構造解析で酵素の立体構造を明らかにしてきた[1]。更に、特異的な化学合成阻害剤を研究してきた[2]。今回、歯周病の予防薬を目指し天然物に阻害剤を求めた結果、米ぬかに強い阻害作用を見出した。
〔方法〕阻害活性は歯周病菌の PTP を用い Ala-Phe-Pro-β-naphythylamide を基質として測定した。アミノ酸配列はTOF-MSで決定し、コメの遺伝子データベースで検索した。該当した遺伝子のcDNAを大腸菌による発現に適した配列で人工合成した後,pET-23dベクターに連結し,Rosetta-gami B(DE3)pLys 株で発現させた。
〔結果〕スクリーニングの結果、米ぬか抽出物に高い PTP 阻害活性を見出した。抽出物より硫安分画、疎水およびイオン交換クロマトグラフィーにより精製した。SDS-PAGEから分子量は44K と推定された。この阻害物質はPTP に拮抗阻害するが、他のプロリン特異性ペプチダーゼ(プロリルオリゴペプチダーゼ、ジペプチジルペプチダーゼ４、プロリルアミノペプチダーゼ）には全く阻害を示さなかった。
SDS-PAGEゲルから抽出しトリプシン分解の後TOF-MSによるアミノ酸配列決定を行い、データベースから得られたアミノ酸配列を含む組換えタンパク質(His6タグ付き)を大腸菌で産生させた後，Ni-アガロースで精製し，組換えタンパク質が*P. gingivalis*のPTP活性を阻害することを確認した
　以上、米ぬかから歯周病菌の PTP を阻害するタンパク質を見出し、更に大腸菌で遺伝子を発現させ PTP を阻害したことから、歯周病予防の可能性を開くものである。
１、*J.Mol.Biol.*, 362, 228-240 (2006), 2, *J.Mol.Biol.*, 375, 708-719 (2008)

Prolyl tripeptidyl peptidase, periodontitis, rice inhibitor

講演番号：2C22a08
講演日時、会場：3 月 27 日 10:27～ C 校舎 22 会場

エリンギ由来セリンペプチダーゼ：特定の非触媒ドメイン残基の酸化と変異がアミノリシス活性を変える

Serine peptidase from *Pleurotus eringii*: Oxidation or mutation of residue in non-catalytic domain promotes change in aminolysis activity

○東海 彰太[1]、余米 良介[2]、森 信寛[2]、有馬 二朗[2] ([1]鳥取大院農、[2]鳥取大農)
○Shota TOKAI[1], Ryosuke YOGOME[2], Nobuhiro MORI[2], Jiro ARIMA[2] ([1]Grad. School of Agric. Tottori Univ., [2]Fac. of Agric. Tottori Univ.)

【背景・目的】エリンギから単離された Family S9 に属するセリンアミノペプチダーゼは、加水分解と拮抗してアミノリシス反応を触媒し、ペプチド類を合成する。本酵素の基質特異性の拡大は、様々なペプチド類の合成を可能にする一つの手段となり得る。一方で、本酵素は過酸化水素等で酸化されると基質特異性が変化する性質を持ち、酸化型酵素の MALDI-TOF MS 解析や特定された酸化領域（Leu193-Arg211）の変異解析から、酸化される残基 Met203 が特定された。本残基は、多くの Family S9 酵素が共通で持つ基質の立体障害 β-プロペラドメインに位置する。そこで本研究では、Met203 の機能解明を通した基質特異性の改変やアミノリシス活性の向上を目指し、Met203 の酸化や部位特異的変異によるアシル酵素中間体形成後の反応への影響を検討した。
【方法・結果】
Met203 の側鎖構造が及ぼす活性への影響を検討するため、本残基を Ala、Ser、Leu、Phe、Asp、Lys に置換した。L-Phe-pNA 及び L-Leu-pNA に対する pNA 遊離活性を調べたところ、Ala や Ser に置換した変異酵素では、L-Leu-pNA に対する活性が極端に低下し、酸化処理と似た効果が確認された。また、Asp と Lys に置換した変異酵素では、野生型酵素と比較して L-Phe-pNA に対する活性が上昇し、Phe への置換では両基質に対する活性が大きく低下した。続いて酸化型酵素を調整し、野生型及び変異酵素と並べて、L-Phe-NH_2 及び L-Tyr-NH_2 に対するアミノリシス反応を測定した。その結果、M203S、M203K、M203D 変異酵素と酸化型酵素では、野生型酵素より高いアミノリシス活性が観察され、一方で、M203F 変異酵素のみ野生型酵素と同程度の活性を示した。M203F 変異酵素では、触媒ドメインの残基と π-π 相互作用し、本酵素の β-プロペラドメインと触媒ドメインの隙間は閉じた状態にあると考えられる。更には、M203F 変異酵素の L-Phe-pNA に対する *K*m 値は野生型酵素と同じであり、反応回転数のみが低下した。これらの結果から、Met203 付近は生成物の通り道であり、Met203 の酸化や部位特異的変異による特異性変化は、側鎖の嵩が低くなることで、生成物の触媒部位からの放出が円滑になった結果であると考えられた。現在は、鎮痛効果を持つジペプチド Tyr-Arg（Kyotorphin）等の合成能の上昇を期待し、これら酵素のアミノリシス活性の詳細な検討を行っている。

oxidation, aminolysis, *Pleurotus eringii*

講演番号：2C22a09
講演日時、会場：3 月 27 日 10:38～ C 校舎 22 会場

D-アミノ酸アミド加水分解酵素の構造と誤作動"ペプチド結合形成能"との相関
Relationship between side-reaction "peptide bond formation activity" and structure of D-stereospecific amidohydrolase
○宮谷 一紗、森 信寛、有馬 二朗（鳥取大農）
○Kazusa MIYATANI, Nobuhiro MORI, Jiro ARIMA (Tottori Univ.)

【背景・目的】*Streptomyces sp.* 82F2 由来 D 体特異的アミド加水分解酵素（DAH）は、Ser ペプチダーゼに属しており、弱アルカリ性の条件下ではアミノリシス反応を触媒してペプチドを生成する。この反応は水存在下でも加水分解反応と拮抗して進行するため、生理活性ペプチドの生産ツールとしての利用が期待されている。一方で、DAH は D 体アミノ酸誘導体をアシル供与体として、L 体アミノ酸誘導体をアシル受容体として選択的に利用して D-,L-配列を有するペプチドを選択的に合成する。即ち、基質として認識するアミノ酸誘導体の種類の幅が限られており、ペプチドの生産ツールとしての利用にはさらなる改善が求められる。DAH の立体構造解析から見出された活性部位付近に存在するポケットに、2 つの Ile 残基（Ile266, Ile338）が存在する。これまでに、2 つの Ile 残基を Ala に置換すると、アミノリシス活性の向上が観察された。これはポケットのスペースの拡大に伴う性質の変化であると推定された。本研究では、これらの 2 つの Ile 残基の位置に着目し、様々な構造置換によるアミノリシス活性への影響について評価した。
【方法・結果】ポケットを構成する Ile266 および Ile338 を Gly, Ala, Phe, Ser, ,Asp に置換し、合計 10 種類の変異酵素を作成した。アシル酵素中間体の形成に付随して起こる D-Phe-pNA の pNA 遊離活性では、全ての変異酵素で pH 6.5 における活性が低下し、pH 8.5 での活性が保持された。従って、変異酵素全てにおいて、弱アルカリ条件下では、アシル酵素中間体の形成が効率よく行われることが示された。これらの変異酵素を用いて、Ac-D-Phe-OMe をアシル供与体、1,8-Diaminooctane をアシル受容体として酵素反応を行った結果、Ile266 および Ile338 をそれぞれ Ala, Gly, Ser に置換した変異酵素では、野生型酵素と比較して、アミノリシス反応の生成物（D-Phe と 1,8-diaminooctane の重合物および N,N'-(octane-1,8-diyl)bis(2-acetamido-3-phenylpropanamide)の生成量が顕著に増加していた。この結果より、変異型酵素ではより長鎖の基質をアシル受容体として認識する傾向が明らかとなった。現在、基質の長さとアミノリシス活性の相関について解析中である。

D-amino acid, peptide bond formation, serine peptidase

講演番号：2C22a10
講演日時、会場：3 月 27 日 10:49～ C 校舎 22 会場

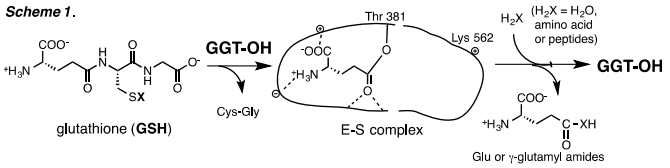
ヒトγ-グルタミルトランスペプチダーゼ (GGT) の反応機構依存的阻害剤 －活性回復を指標とした基質特異性の評価－

Mechanism-Based Inhibitor of Human Gamma-Glutamyl Transpeptidase － Evaluation of Substrate Specificity by Enzyme Reactivation－

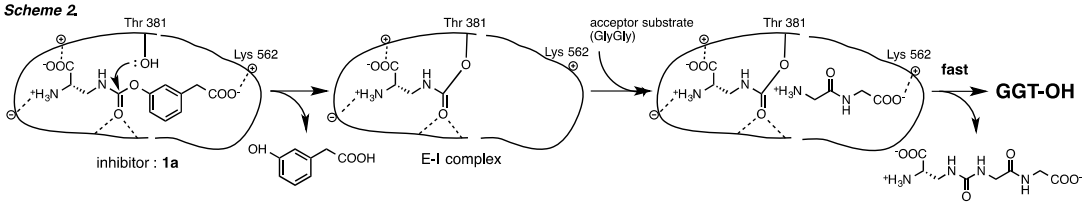
○尾崎 文音、李 春杰、渡辺 文太、平竹 潤 (京大化研)
○Ayane OZAKI, Chunjie RI, Bunta WATANABE, Jun HIRATAKE (Kyoto Univ.)

【背景と目的】ヒト γ-グルタミルトランスペプチダーゼ (GGT) はグルタチオン代謝に関わる重要な酵素で、抗ガン剤耐性や動脈硬化症などの病態と深く関係している。GGT は、Thr を触媒残基として γ-グルタミル酵素中間体 (E–S 中間体)を経る 2 段階の反応機構で γ-グルタミルアミド結合を加水分解または γ-グルタミル基転移活性を示すが、その本来の生理的反応や意義はよくわかっていない (Scheme 1)。そこで、我々は、ヒト GGT の反応機構依存的カーバメート型阻害剤 (**1a**)を開発した。阻害剤 **1a** は酵素の触媒残基 Thr と反応し共有結合を形成することで、反応中間体に類似した酵素–阻害剤複合体 (E–I 複合体)を形成する (Scheme 2)。本研究では、阻害酵素に γ-グルタミル基のアクセプター基質やそのアナログを与え、酵素の活性回復を指標に GGT のアクセプター基質特異性を評価した。

【方法】ヒト GGT を阻害剤 **1a** で阻害し、ゲルろ過カラムで E–I 複合体と阻害剤を分離した。単離した不活性な E–I 複合体を、アミノ酸やジペプチド等のアクセプター基質 (0.05–20 mM)または末端カルボキシ基を持つフェニル酢酸、馬尿酸などの基質アナログ (20 mM) の存在下、pH 7.0、25°C にてインキュベートし、阻害酵素の活性回復速度を測定した。



【結果・考察】アクセプター基質である Gly-Gly または cystine の存在下、酵素活性の回復が著しく加速されたことから、γ-グルタミル基転移反応に類似した反応機構依存的な活性回復が見られたと考えられる (Scheme 2)。さらに cystine は、Gly-Gly に比べて活性回復を 10 倍以上加速したことから、GGT のきわめて良好なアクセプター基質であることが確かめられた。一方、フェニル酢酸は、酵素活性の回復を 1/10 に遅らせたことから、酵素の Cys-Gly 結合サイトに適合する良好な構造であると考えられる。また、過去に、GGT を活性化すると報告された馬尿酸 (*N*-benzoylglycine) では、活性の回復速度は全く変わらず、酵素の活性化が起きている証拠は得られなかった。以上のことから、GGT は Cys-Gly に類似したジペプチド (Gly-Gly) のみならず、とりわけ cystine に対する γ-グルタミル基転移反応に適した酵素であることが確認された。その他のアミノ酸に対する特異性についても報告し、GGT の生理学的意義について考察する。



Gamma-glutamyl transpeptidase, Inhibitor, Reactivation

講演番号：2C22a11
講演日時、会場：3 月 27 日 11:10～ C 校舎 22 会場

Lactobacillus otakiensis 由来 D-分岐鎖アミノ酸ラセマーゼの性質と生体内での役割

Characterization and in vivo role of D-branched chain amino acids racemase from *Lactobacillus otakiensis*

○前田 純平[1]、牟田口 祐太[2]、清水 泰博[1]、大島 敏久[3]、土居 克実[1]([1]九大院・生資環、[2]秋田県大・生資科、[3]大工大・工)

○Junpei MAEDA[1], Yuta MUTAGUCHI[2], Yasuhiro SHIMIZU[1], Toshihisa OSHIMA[3], Katsumi DOI[1] ([1]Kyushu Univ., [2]Akita Prefectual Univ., [3]Osaka Institute of Technology)

【目的】長野県木曽地方で生産される無塩乳酸発酵食品であるすんき漬けから単離された *Lactobacillus otakiensis* は、対数増殖期に D-分岐鎖アミノ酸(D-*allo*-Ile, D-Leu, D-Val)を培地中に分泌する。これら D-分岐鎖アミノ酸は、分岐鎖アミノ酸特異的ラセマーゼによって合成されると考えられる。既に、当研究室により *L. otakiensis* から分岐鎖アミノ酸特異的ラセマーゼと推測される分子質量約 50 kDa と 90kDa の 2 種のタンパク質が分離され、これらの N 末端アミノ酸配列が決定されている[1)]。本研究では、これら 2 種のタンパク質の D-分岐鎖アミノ酸合成能を検討し、同時に転写解析を通して分岐鎖アミノ酸特異的ラセマーゼの生体内での役割を明らかにすることを目的としている。

【方法】50 kDa と 90 kDa の推定ラセマーゼをコードする遺伝子(*50PR*, *90PR*)を pET21a にそれぞれクローニングし、大腸菌 BL21 star (DE3)中で発現を行った。得られた組換えタンパク質を Ni-NTA カラムで精製し、活性測定に用いた。活性測定の際に生じる D-アミノ酸の定量は、アミノ酸を OPA-NAC によって誘導体化し、UPLC を用いて行った。次に、分岐鎖アミノ酸特異的ラセマーゼの転写解析のために、*L. otakiensis* 培養菌体から経時的に全 RNA を抽出し、定量的 RT-PCR を行った。

【結果・考察】2 つの推定ラセマーゼ (50PR, 90PR)のうち、50PR は D-分岐鎖アミノ酸合成能を持ち、90PR はその活性をもたないことが明らかとなった。そこで、50PR の酵素学的性質についてさらに検討したところ、50PR は分岐鎖アミノ酸特異的にエピマー化反応を触媒した (図 1)。また、定量的 RT-PCR により、*50PR* 遺伝子は培地中に D-分岐鎖アミノ酸が分泌される対数増殖期ではなく、定常期において転写量が約 2.5 倍増加していた。この結果から、対数増殖期と定常期において D-分岐鎖アミノ酸の用途が変化していると推測した。現在、*L. otakiensis* の定常期における D-分岐鎖アミノ酸の局在を解明するため、細胞壁中の D-分岐鎖アミノ酸分析を行っている。さらに *50PR* ノックアウト株の作製、DNA マイクロアレイ解析を通して、*L. otakiensis* における分岐鎖アミノ酸特異的ラセマーゼの役割と D-分岐鎖アミノ酸代謝経路の解明に取り組んでいる。

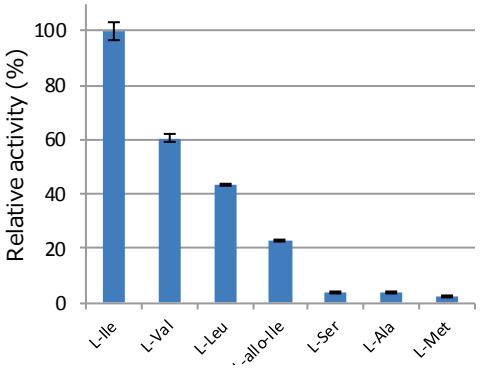


図 1. 50PR の基質特異性

1) Mutaguchi *et al*, *J.Bacteriol*, **195**, 5207-5215

Lactobacillus, D-branched chain amino acids, Racemase

講演番号：2C22a12
講演日時、会場：3 月 27 日 11:21～ C 校舎 22 会場

微生物における真核生物型セリンラセマーゼの分布と生化学的解析

Distribution and characterization of eukaryotic serine racemases in bacteria

○窪田 高秋、島村 繁、小林 徹、出口 茂（海洋研究開発機構）
○Takaaki KUBOTA, shigeru Shimamura, tohru Kobayashi, shigeru Deguchi (JAMSTEC)

【目的】 近年の分析技術の向上に伴いアミノ酸の異性体分析が容易になると、D-アミノ酸は環境や生体中において、自然ラセミ化率を超えて著量に存在することが明らかになってきた。驚くことに海洋は溶存有機物中のアミノ酸 D/L 比が 30%を超すという、他の環境よりも高濃度で D-アミノ酸が存在する。このうち D-セリンはそのほとんどが 0.001 μm 以下の低分子成分として存在し、これは他の細胞壁成分由来の D-アミノ酸とは大きく異なる。近年では特に真核生物において、遊離の D-セリンが脊椎動物の中枢神経系において NMDA 型グルタミン酸受容体の発現部位に存在し、その生理的なコアゴニストとして神経伝達を調節していることや、植物においても花粉管成長に関与することが報告され、注目されている。その一方で海洋環境の D-セリンについては従属栄養性微生物に由来することが示唆されているが、それが海洋生物に及ぼす影響や、合成経路については全く分かっていない。そこで我々は、海洋における D-セリンの代謝と役割を明らかにするためにまずは海洋微生物における D-セリン生合成酵素の探索と解析を試みた。
【方法・結果】 データベースに記載されている微生物ゲノムに対して、既知の酵素アミノ酸配列を用いた網羅的 BLAST 解析を試みたところ、これまで微生物型のセリンラセマーゼ（SR）と呼ばれていた配列よりも、むしろ真核生物型 SR とされてきた配列が、海洋性微生物（α・γプロテオバクテリアおよびバクテロイデス細菌）などに広く存在することを見出した。見出した配列の一つ、海洋性細菌 *Roseobacter litoralis* Och 149 株由来の SR ホモログの遺伝子について大腸菌を用いてクローニングし、組換え酵素による機能解析を行った結果、本酵素は予想通りセリンのラセミ化活性を示し、真核生物型 SR と同様、セリン分解活性を併せ持つ二機能性酵素であることがわかった。また本酵素は Mg^{2+}および ATP によって活性化され、この特徴は植物よりもヒトなどの動物由来 SR に良く似ていた。本発見は、これまで予想されていたよりも多くの海洋性微生物がセリンのラセミ化活性を有することを示唆しており、これらの微生物における D-セリンの生産やその役割については興味が持たれる。

serine racemase, D-amino acid, marine bacteia

講演番号：2C22a13
講演日時、会場：3 月 27 日 11:32～ C 校舎 22 会場

セリンラセマーゼが触媒する D-セリンデヒドレーション反応の触媒機構
Catalytic mechanism of D-serine dehydration catalyzed by serine racemase
○松岡 舞、伊藤 智和、邊見 久、吉村 徹（名大院生命農）
○Mai MATSUOKA, Tomokazu ITO, Hisashi HEMMI, Tohru YOSHIMURA (Grad. Sch. of Bioagr Sci., Nagoya Univ)

真核生物型セリンラセマーゼ（SR）は、pyridoxal 5´-phosphate（PLP）に依存して、D 及び L-Ser のラセミ化反応とデヒドレーション反応を触媒する。両反応はいずれも Ser-PLP 複合体から C_α-H が引き抜かれることによって始まる。ラセミ化反応では、C_α-H の引き抜き後に、形成した中間体の C_α への再プロトン化が PLP 平面に対して C_α-H が引き抜かれた側とは反対側から起こる。デヒドレーション反応では C_α-H 引き抜きの後に、基質 OH 基の脱離が起こる。現在知られている大部分の SR は、基質が L-Ser、D-Ser いずれの場合もほぼ等しいラセミ化活性を示す一方で、デヒドレーション活性においては、D-Ser デヒドレーション活性が L-Ser デヒドレーション活性と比べ顕著に低いことが知られている。この理由の一つとして、SR が D-Ser デヒドレーション活性をそもそも有さず、D-Ser はラセミ化反応を経て L-Ser へと変換された後にデヒドレーション反応を受ける可能性が議論されていた。

我々は細胞性粘菌由来セリンラセマーゼ（DdSR）を用い、Ser デヒドレーション反応の同位体効果を検証することで、SR による Ser デヒドレーションの反応メカニズムを調べた。重水中で酵素反応を行った場合、もし D-Ser のデヒドレーション反応がラセミ化反応を経るのであれば、その際 C_α 位に重水素付加が起こる可能性が高い。その結果、デヒドレーション反応では重水素の引き抜きが必要となる。すなわち、D-Ser のデヒドレーションがラセミ化を経て起こるのであれば、重水中での反応において D-Ser デヒドレーション反応は L-Ser デヒドレーション反応と比べ、顕著な同位体効果を示すと予想された。

L-Ser デヒドレーション反応の溶媒同位体効果、即ち $k_{cat}(\text{in } H_2O)/k_{cat}(\text{in } D_2O)$ 値を測定したところ 1.78 となった。一方、 D-Ser デヒドレーション反応の $k_{cat}(\text{in } H_2O)/k_{cat}(\text{in } D_2O)$ 値 は 2.19 であり、L-Ser、D-Ser いずれの基質においてもその同位体効果はほぼ等しかった。DdSR は 4 種類の Thr 異性体、L- Thr 、L-*allo*- Thr、 D- Thr 、D-*allo*- Thr に対してもデヒドレーション活性を示すが、これら Thr 異性体に対する k_{cat} 値を測定したところ、C_β 位の OH 基の配向が R である基質（L- Thr、D-*allo*- Thr）の活性が、S である基質（D- Thr、L-*allo*- Thr）と比べて 100 倍以上高かった。これらの結果から、我々は SR が触媒する D-Ser デヒドレーション反応はラセミ化反応を経由しないこと、活性中心における基質 OH 基の配向の差異が両セリンに対するデヒドレーション活性に影響を与えている可能性があることを予想した。

serine racemase, PLP, catalytic mechanism

講演番号：2C22a14
講演日時、会場：3 月 27 日 11:43～ C 校舎 22 会場

Volvox 目緑藻における Alanine racemase の存在

Existence of alanine racemase in Volvocine algae

○二重作 和宏[1]、小田 真弓[1]、谷川 実[1]、西村 克史[1,2] ([1]日大理工、[2]日大短大)
○Kazuhiro Futaesaku[1], Mayumi Oda[1], Minoru Tanigawa[1], Katsusi Nisimura[1,2] ([1]Nihon Univ., [2]Nihon Univ Junior College.)

【緒言】

Volvox 目緑藻は単細胞で生活する *Chlamydomonas* 属から群体を形成する *Gonium* 属, *Pandorina* 属, *Eudorina* 属，*Pleodorina* 属を経て，細胞数約 2000 の群体を形成する *Volvox* 属に進化したと考えられている. Volvox 目緑藻の進化の過程で D-Alanine 耐性と Alanine racemase 活性がどのように変化してきたのかを調べることがわれわれの目的である．本研究では，Volvox 目緑藻を培養し，D-Alanine 耐性と Alanine racemase 活性を調べた.

【方法】

Chlamydomonas reinhardtii (*C. reinhardtii*) と *Gonium pectorale* (*G. pectorale*) は Tris Acetate Phosphate (TAP) Medium を用いて，*Pandorina morum* (*P. morum*)，*Eudorina elegans* (*E. elegans*)，*Pleodorina californica* (*P. californica*), *Volvox carteri* (*V. carteri*) は Standard Volvox (SV) Medium を用いて, また TAP 培地あるいは SV 培地に 1 g/L D-Alanine を加えた培地を用いて，それぞれの緑藻を培養した．培養後，集めた細胞を超音波破砕し，遠心分離した後の上清を無細胞抽出液とした．得られた無細胞抽出液中の Alanine racemase 活性を DAO と Peroxidase を用いて調べた.

【結果】

C. reinhardtii，*G. pectoral*，*P. morum*，*E. elegans*，*P. californica*，*V. carteri* は，すべて Alanine racemase 活性を示した．*C. reinhardtii* と *G. pectoral* は TAP＋D-Alanine 培地中で，*P. morum*，*E. elegans*，*P. californica*，*V. carteri* は SV＋D-Alanine 培地中で良好に生育したため，Volvox 目緑藻は D-Alanine 耐性をもつことがわかった．また，D-Alanine を加えた培地を用いて培養した場合には，どの緑藻の場合にも Alanine racemase 活性の上昇がみられた.

現在, *C. reinhardtii* の生育における培地中と細胞内の D-Alanine 含量を測定している. また, Alanine racemase 活性を OPA/NAC 法を用いて確認するとともに，L-Alanine を加えた培地中における Alanine racemase 活性の検討を行っている.

Alanine racemase, D-alanine, Volvocine algae

講演番号：2C22a15
講演日時、会場：3 月 27 日 11:54～ C 校舎 22 会場

緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* 由来アラニンラセマーゼ遺伝子のクローニングと発現
CLONING AND EXPRESSION OF ALANINE RACEMASE GENE FROM THE GREEN ALGA *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII*

○平戸 祐喜[1]、佐久田 綾[1]、小田 真弓[1]、谷川 実[1]、西村 克史[1,2] ([1]日大理工、[2]日大短大)
○Yuki Hirato[1], Aya Sakuta[1], Mayumi Oda[1], Minoru Tanigawa[1], Katsushi Nishimura[1,2] ([1]Nihon Univ., [2]Nihon Univ. junior college)

【目的】

緑藻*Chlamydomonas reinhardtii* は，葉緑体の遺伝子発現や機能，鞭毛の構築と運動性，脂質生産，概日時計等の基礎的な生物学的プロセス解析のモデル生物である。われわれは，*C. reinhardtii* がD-alanine耐性を有することとアラニンラセマーゼ活性を示すことを見出した[1)]。*C. reinhardtii* アラニンラセマーゼの遺伝子情報から推定されたアミノ酸配列は，報告されているPyridoxal 5'-phosphate（PLP）依存性のアラニンラセマーゼ（Fold type I，III）と他のPLP依存性酵素（Fold type II，IV，V）と低い相同性を示した。このことから，*C. reinhardtii* アラニンラセマーゼはPLP依存性酵素として新奇のタンパク質構造をもつと考えられた。

本報告では，酵素タンパク質の結晶化による立体構造解析と生理的役割の解明を目的として，*C. reinhardtii* のアラニンラセマーゼの遺伝子クローニングと発現，また，酵素学的諸性質について述べる。

【方法及び結果】

C. reinhardtii より抽出したmRNAを用いてFirst strand cDNAを合成し，それを鋳型としてアラニンラセマーゼ遺伝子（*alr*）を増幅した。増幅産物をベクターpET41bへ挿入し，得られたプラスミドpET41b/*alr*を用いて*Escherichia coli* BL21 (DE3)を形質転換した。しかし，アラニンラセマーゼの発現は確認できなかった。そこで大腸菌のコドンに最適化したアラニンラセマーゼ遺伝子（*alr'*）を合成し，pET41bに挿入後，*E. coli* BL21 (DE3) を形質転換した。得られた形質転換体の無細胞抽出液のSDS-PAGEによって，アラニンラセマーゼタンパク質の大量発現を確認した。分子質量45 kDa（推定分子質量44,999）のタンパク質バンドをPVDF膜へ転写し，プロテインシ―ケンサ―によって解析した。N末端アミノ酸配列はMRALVSKARLAHであり，アラニンラセマーゼ遺伝子から推定されたアミノ酸配列と一致した。現在，形質転換体から精製したアラニンラセマーゼの酵素学的諸性質を検討している。

1) Nishimura *et al.* Amino Acids, 32, 59-62 (2007)

Alanine racemase, D-amino acid, *Chlamydomonas reinhardtii*

講演番号：2C22p02
講演日時、会場：3 月 27 日 14:11～ C 校舎 22 会場

シイタケ(*Lentinula edodes*)における GABA 生成に関与する酵素について

Study on the enzyme related with GABA formation in *Lentinula edodes*

○岩本 和子、福田 泰久、白坂 憲章（近畿大農応生化）
○Kazuko IWAMOTO, Yasuhisa FUKUTA, Norifumi SHIRASAKA (Div. Appl. Biochem., Agr. Sci., Kin-ki Univ.)

γ-アミノ酪酸 (GABA) は自然界に広く分布する非タンパク質構成アミノ酸の一種であり、血圧上昇抑制、利尿作用、糖尿病の予防などに効果があるといわれていることから、近年、機能性食品素材として注目を集めている。一般的に、GABA はピリドキサール 5'-リン酸依存酵素であるグルタミン酸デカルボキシラーゼ (GAD) による L-グルタミン酸の脱炭酸反応によって生成されることが明らかになっており、これまでに動物、植物、細菌、菌類由来の GAD が精製され、その性質が報告されている。一方、食用きのこにおいても GABA が多く含まれているという報告があるにも関わらず、含量や生成経路について詳細に検討された例は少なく、食用きのこを含む担子菌由来 GABA 蓄積に関与する酵素についての報告はほとんどない。そこで、食用きのこ中の GABA 含量を明らかにするとともに、GABA 生合成に関与する酵素を精製し、その性質を明らかにすることを試みた。

市販シイタケ子実体を 50mM 酢酸バッファー (pH4.0) とともに破砕後、遠心分離より得られた上清を硫安塩析、陰イオン交換クロマトグラフィー (DEAE Toyopearl 650M、Mono QTM 5/50 GL)、陽イオン交換クロマトグラフィー (CM Toyopearl 650C) を用いて精製し、収率 7.14%、精製倍率 9.28 倍で、電気泳動的に単一の酵素を得た。精製酵素の分子量は SDS-PAGE より約 49kDa、HPLC-GPC より約 131kDa であったことから、本酵素は二量体であることが示唆された。得られた酵素の最大活性は pH6.0 で 37℃のときに観察され、pH4.0-7.0 付近で 37℃まで安定であった。金属化合物の影響では、Ag^{+}と Hg^{2+}で活性が阻害され、Li^{+}では活性が促進された。基質特異性については、一般的に GAD が L-グルタミン酸にのみ作用するのに対し、本酵素は L-グルタミン酸の他に、L-アスパラギン酸、アミノアジピン酸、イボテン酸、ノルバリン等に対しても活性が見られ、L-グルタミン酸を基質とした *Km* 値は 25.99 mM で、*Vmax* 値は 2.60 mmol/min であった。精製酵素の内部アミノ酸配列を解析し、相同性を森林研究所より提供されている ForestGEN の *Lentinula edodes* データベース内で検索したところ、Phosphatidyl serine decarboxylase (Psd) と 100%の相同性を示した。また、psd 遺伝子の塩基配列 (1323 bp) を基にプライマーを設計し、cDNA クローニングを行ったところ、担子菌以外の他種由来の既知の GAD 配列と比較して相同性は低かった。

【謝辞】本研究は、JSPS 科研費 26450237 の助成を受けたものである。

GABA, psd, *Lentinula edodes*

講演番号：2C22p03
講演日時、会場：3 月 27 日 14:22～ C 校舎 22 会場

好熱好酸性古細菌 *Sulfolobus tokodaii* シスタチオニン γ - シンターゼ基質複合体の X 線結晶解析
X-ray crystallographic analysis of cystathionine gamma-synthase complex from aerobic thermoacidophilic crenarchaeon, *Sulfolobus tokodaii*

○佐藤 暖[1]、川村 あやか[1]、花田 尚子[1]、山田 哲也[2]、志波 智生[1]、稲垣 賢二[2]、原田 繁春[1]（[1]京都工繊大院応生、[2]岡山大院環境生命）
○Dan SATO[1], Ayaka KAWAMURA[1], Shoko HANADA[1], Tetsuya YAMADA[2], Tomoo SHIBA[1], Kenji INAGAKI[2], Shigeharu HARADA[1] ([1]Dept. Appl. Biol., Grad. Sch. Sci. and Technol., Kyoto Inst. Technol., [2]Grad. Sch. Environ. Life Sci., Okyama Univ.)

Sulfolobus tokodaii は高温・酸性下で生育できる古細菌であり、硫化水素を直接代謝できることから、工場の排気ガス処理などに産業利用されている。また、そのタンパク質は高い耐熱性を持つと考えられ、農業・食品・医薬品など様々な応用が期待されている。メチオニンやシステインなどの含硫アミノ酸は全ての生物にとって必須の構成要素であるが、その代謝経路は多様性に富んでいる。*S. tokodaii* はシステインをメチオニンへ代謝する経路（トランスサルフレーション経路）を持ち、その代謝中間体であるシスタチオニンはホモセリン誘導体とシステインの縮合反応によって作られる。この反応は pyridoxal 5'-phosphate (PLP)要求性酵素であるシスタチオニンγ-シンターゼ（CGS）によって触媒される。CGS は細菌や植物にしか存在しないため、抗生物質や除草剤のターゲットとして注目されている。本研究では、立体構造に基づいた構造・機能相関を明らかにするとともに、新規の抗生物質や除草剤リード化合物の設計を目指して好熱好酸性古細菌 *S. tokodaii* のシスタチオニンγ-シンターゼ（StCGS）の X 線結晶構造解析を行った。StCGS 遺伝子を大腸菌に導入して大量発現させ、菌体破砕後に熱処理を行い、得られた上清からヒドロキシアパタイトカラムとゲルろ過カラムを用いて StCGS を精製した。

CGS では、PLP 近傍に位置するチロシン残基が、基質のアミノ基からプロトンをひき抜くと考えられる。この残基は極めて重要で CGS のみならず他のトランスサルフレーション酵素でも保存されているが、StCGS ではフェニルアラニン残基に置き換わっている。そこで活性測定を行ったところ、確かに酵素活性（脱離反応および縮合反応）が検出できた。このことは、StCGS では他の酵素にはないユニークな反応機構が存在することを示唆している。また、このフェニルアラニンをチロシンに置換した変異体（F97Y 変異体）では基質特異性が大幅に変化した。

StCGS の結晶化を試みたところ、酸性条件（54 % (*v*/*v*) MPD, 0.2 M $MgCl_2$, 0.1 M 酢酸緩衝液 pH 3.6）および中性条件（20% PEG3350, 0.2 M クエン酸ナトリウム, 0.1 M Tris-HCl pH 8.0）で結晶を得ることができた。測定した X 線回折強度データをもとに、大腸菌 CGS をモデルに分子置換で StCGS の構造を決定した。StCGS は、ホモテトラマー構造をしており、各サブユニットに結合している PLP はリジン残基とシッフ塩基を形成していた。野生型とF97Y 変異体を比較すると、PLP とのスタッキングや近傍のアミノ酸残基の位置が変わっており、それが活性の違いに影響を与えていると予想された。続いて、反応機構を明らかにするため、高温下で基質と短時間反応させたのち共結晶を行ったところ、システインおよびホモセリン誘導体との複合体を得ることに成功した。

Sulfur containing amino acid metabolism, PLP-enzyme

講演番号：2C22p04
講演日時、会場：3 月 27 日 14:33～ C 校舎 22 会場

高度好熱菌 *Thermus thermophilus* 由来のホモイソクエン酸脱水素酵素の基質・補酵素複合体の結晶構造
Crystal structure of homoisocitrate dehydrogenase from *Thermus thermophilus*, complexed with substrate and coenzyme
○高橋 賢人、富田 武郎、葛山 智久、西山 真（東大生物工学セ）
○Kento TAKAHASHI, Takeo TOMITA, Tomohisa KUZUYAMA, Makoto NISHIYAMA (BRC, The Univ. of Tokyo)

(目的)

ホモイソクエン酸脱水素酵素(HICDH)は、リジン生合成 AAA 経路の第 4 番目の、ホモイソクエン酸(HIC)から 2-オキソアジピン酸(2-OA)に変換する脱炭酸脱水素反応を触媒する。酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 由来の HICDH(ScHICDH)は、本来の基質である HIC に対し高い基質特異性を有する一方、高度好熱性細菌 *Thermus thermophilus* 由来の HICDH(TtHICDH)は、HIC だけでなく TCA 回路におけるイソクエン酸(IC)も基質として認識することがわかっている。我々は、TtHICDH を酵母の HICDH と同様にホモイソクエン酸に特異的な酵素へと変換すると共に、ロイシン生合成における 3-イソプロピルリンゴ酸(IPM)を認識するよう基質特異性を変換することにも成功している。これまでに HICDH 野生型、および IPM へ基質特異性が変化した改変酵素のアポ型の結晶構造は決定してきたが、基質や補酵素を結合した結晶構造は決定できていなかった。本研究では、TtHICDH の寛容な基質認識機構を明らかにするため、HIC・NADH 複合体構造を決定した。

(方法と結果)

TtHICDH の組換えタンパク質を大腸菌で発現・精製し、結晶化スクリーニングを行った。その結果、基質 HIC、還元型の補酵素 NADH 共存下で良質な結晶を得ることに成功した。分子置換法による構造決定の結果、HIC・NADH を結合した三者複合体の結晶構造を 2.5 Å の分解能で決定することに成功した。HIC のγ-moiety の認識には Ser72 と Arg85 が重要な役割を果たしていた。我々は TtHICDH を IPM を認識するよう実験室内分子進化させた LR5-1 において、S72I および R85M の改変が IPM への基質特異性の変換に重要であることを示しており、本研究の結果はそれに呼応する結果と言える。また IC 複合体の分子モデリングの結果、HIC より 1 炭素鎖短い IC は Arg85 とイオン結合を形成することが示唆された。一方、TtHICDH から 7 アミノ酸の置換により HIC だけに特異性を示すようになった改変体(7ScHICDH)の分子モデリングの結果、ScHICDH では、TtHICDH と異なり Ser98 と Ser108 が HIC の特異的な認識に重要な役割を担うことが示唆された。以上の結果から HICDH を含むβ-脱炭酸脱水素酵素ファミリーが、限られた数のアミノ酸置換により機能分化してきたことが示された。

Thermus thermophilus, homoisocitrate dehydrogenase, crystal structure

講演番号：2C22p05
講演日時、会場：3 月 27 日 14:44～ C 校舎 22 会場

NAD 生合成経路 NadA/NadB/NadC 複合体の可能性
The possibility of complex assembly among NadA, NadB and NadC in NAD biosynthetic pathway
○木村 あすみ[1]、芦田 裕之[2]、丸田 隆典[1]、石川 孝博[1]、澤 嘉弘[1] ([1]島根大学生資、[2]島根大学・総合科学研究支援セ)
○Asumi Kimura[1], Hiroyuki Ashida[2], Takanori Maruta[1], Takahiro Ishikawa[1], Yoshihiro Sawa[1] ([1]Shimane Univ., [2]Dep.Mol.Func.Genomics, Interdiscipl.Cent.Sci.Res., Shimane Univ.)

【目的】 多くの原核生物の NAD 生合成経路では、L-アスパラギン酸を出発物質として L-アスパラギン酸オキシターゼ（LAO）あるいは L-アスパラギン酸デヒドロゲナーゼ（AspDH）が初発酵素（NadB）として働くことが知られている。NadB の反応生成物は、共にイミノアスパラギン酸（ImAsp)であるが、この生成物は非常に不安定で水分子と接触すると半減期 144 秒でオキサロ酢酸とアンモニアに加水分解される。また、この経路の 2 番目に働くキノリン酸シンターゼそ(QS, NadA）は、酸素に極めて不安定な 4Fe-4S クラスターを持っていることが知られている。これらの理由から、QS は、NadB と複合体を形成し、生じた ImAsp を疎水性分子間トンネルで QS の活性中心まで輸送し、QS 側からアクセスしてくるジヒドロキシアセトンリン酸（DHAP)との縮合反応によってキノリン酸を生成すると予想されている。これまで LAO、AspDH, QS の X 線構造解析や生化学的解析はいくつか報告されているが、複合体に関する解析はまったく行われていない。

今回は、LAO:QS 複合体の形成を確認するために、超好熱性アーキア *Pyrococcus horikoshii* 由来の LAO, QS を用いて、各種クロマトグラフィーにより複合体形成の解析を行ったので報告する。

【方法・結果】 *P. horikoshii* 由来 *nadA*、*nadB* 、nicotinate-nucleotide pyrophosphorylase（*nadC*)の各遺伝子を pET Duet, pCold ベクター等に組込んだ発現系を構築し、*nadAB*、*nadABC* の組み合わせで共発現が確認できる条件を決定し複合体形成の可能性について検討した。大腸菌で各コンストラクトを発現後、超音波破砕、超遠心分離、熱処理（ 80°C, 30 min), DEAE-Toyopearl による精製を行った。LAO 活性はフェリシアンカリウム法で測定を行った。

Superdex 200 Increase ゲル濾過クロマトグラフィーから LAO は 3 量体、QS は単量体であることが推定された。QS 4Fe-4S クラスター特有の UV-VIS スペクトルは確認できなかった。NadAB 共発現体でのゲル濾過クロマトグラフィーや DEAE-Toyopeal クロマトグラフィーの溶出パターン、LAO 活性, SDS-PAGE により複合体の確認を行ったところ、いずれのクロマトグラフィーにおいても、LAO, QS が分離されて溶出されたことより、複合体を形成している可能性は極めて低いと考えられた。

L-Asp-NAD 生合成経路において、3 番目に働く NadC が NadB と複合体を形成している可能性が示唆されれたので、LAO+QS+NadC の組み合わせで複合体形成の可能性を検討している。

L-Aspartate oxidase, Quinolinate synthetase, Nicotinate-nucleotide pyrophosphorylase

講演番号：2C22p06
講演日時、会場：3 月 27 日 15:05～ C 校舎 22 会場

高度好熱菌 *Thermus thermophilus* におけるアミノ酸シグナル応答機構の解析
Study on amino acid signal transduction mechanism of *Thermus thermophilus*
○久保田 哲央、松下 創、富田 武郎、葛山 智久、西山 真（東大生物工学セ）
○Tetsuo Kubota, Hajime Matsushita, Takeo Tomita, Tomohisa Kuzuyama, Makoto Nishiyama (BRC, The Univ. of Tokyo)

大腸菌において Lrp (Leucine-responsive regulatory protein)はロイシンなどのアミノ酸と結合することでアミノ酸の代謝経路を含む様々な異化や同化に関わる遺伝子の転写調節を行っている。様々な生物のゲノム解析が進む中、 Lrp ホモログが細菌や古細菌などの原核生物に広く存在することがわかってきた。Lrp は N 末端側の DNA 結合ドメインと C 末端側のアミノ酸結合ドメイン (RAM ドメイン)からなるが、高度好熱菌 *T. thermophilus* のゲノム上には Lrp ホモログは存在せず、代わりにアミノ酸結合ドメインのみからなる機能未知 stand-alone RAM ドメインタンパク質 SraA をコードする遺伝子 *TTC0493* が存在している。本研究では SraA がアミノ酸を分子シグナルとして感知し、他のタンパク質との相互作用を介してアミノ酸シグナルを伝達する機能を持つと予想し、SraA が相互作用するタンパク質の同定を行うとともに、SraA の機能解析を行った。

SraA の N 末端に Strep タグを融合したタンパク質を高発現する *T. thermophilus* の組換え株を作製し、SraA のアフィニティ精製を行った。その結果、野生株では見られない約 36 kDa のタンパク質が観察された。このタンパク質の MS 解析を行った所、トリプトファン生合成の 2 番目の酵素 TTC1491 (アントラニル酸ホスホリボシルトランスフェラーゼ: TrpD) として同定された。大腸菌を用いて N 末端 Strep タグ付き SraA と C 末端 His タグ付き TrpD を共発現させ、精製した結果、SraA と TrpD が共精製され、両者が直接相互作用していることが示唆された。SraA と TrpD の会合状態をゲルろ過クロマトグラフィーにより解析した結果、SraA は単独では二量体と十量体の平衡状態で存在するが、トリプトファン存在下においては十量体形成が促進されることが明らかとなった。共精製した SraA/TrpD はゲルろ過では容易に解離するが、トリプトファン存在下では SraA 十量体と TrpD の安定なヘテロ複合体の形成が観察された。等温滴定カロリメトリーを用いて SraA/TrpD/トリプトファン間の相互作用の熱力学的パラメータを測定した結果、トリプトファンは SraA に対して協調的に結合すること、トリプトファン存在下では SraA と TrpD の結合が強固になることが示された。TrpD の活性測定を行った結果、トリプトファン存在下でのみ SraA が TrpD の活性を抑制することが示唆された。このことから SraA はトリプトファン存在下で多量体化し、TrpD と相互作用することによってその活性抑制を起こすことが明らかになった。以上の結果から *T. thermophilus* において SraA を介した新規なトリプトファン生合成のフィードバック調節機構が提示された。

Thermus thermophilus, amino acid signalling

講演番号：2C22p07
講演日時、会場：3 月 27 日 15:16～ C 校舎 22 会場

超好熱・好酸性古細菌 *Sulfolobus acidocaldarius* におけるリジン生合成経路の調節機構
Regulatory mechanism of lysine biosynthesis in thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus acidocaldarius*
○秋山 渚、富田 武郎、葛山 智久、西山 真（東大生物工学セ）
○Nagisa AKIYAMA, Takeo TOMITA, Tomohisa KUZUYAMA, Makoto NISHIYAMA (BRC, The Univ. of Tokyo)

【背景】古細菌 *Sulfolobus acidocaldarius* はα-アミノアジピン酸（AAA）を中間体とする AAA 経路によってリジンを生合成するが、後半部を構成する遺伝子がクラスターを形成しそれらの発現が転写因子 LysM によって制御される一方で、初発酵素ホモクエン酸合成酵素（HCS）を始めとして前半部に関わると推測される遺伝子は全てゲノム上に散在しており、各遺伝子の機能および制御機構は不明である。我々はこれまでに *S. acidocaldarius* のゲノム上に 3 つの HCS ホモログを見出し、それぞれの機能解析を行うことで Saci_1304 が HCS として機能することを明らかにしてきた。SaHCS はリジンによるフィードバック阻害を受けるものの、その阻害効果は限定的であり、より強い阻害には LysM が必要であった。SaHCS は既知の HCS には見られない RAM (Regulation of amino acid metabolism)ドメインをその C 末端側に有している。RAM ドメインは通常 LysM を含む Lrp 様転写因子が有するアミノ酸結合ドメインであり、このことから SaHCS が RAM ドメインを介してリジンによるフィードバック阻害を受けること、および LysM と相互作用することが示唆された。そこで本研究では SaHCS と LysM の相互作用を解析し、リジン生合成の制御機構を解明することを目指した。
【方法・結果】*S. acidocaldarius* を宿主として His タグを付加した SaHCS を発現し、その Ni^{2+}-NTA カラム溶出画分について LysM 抗体を用いた Western-blotting 解析をした結果、LysM が検出された。このことから SaHCS と LysM が細胞内で複合体を形成していることが示唆された。次に大腸菌を宿主とし、His タグを付加した SaHCS およびストレプタグを付加した LysM を共発現させた。Strep-tactin カラムおよび続く Ni^{2+}-NTA カラムによる精製を行った結果、SaHCS と LysM が共精製されたことを SDS-PAGE により確認した。SaHCS の RAM ドメインのみからなる組換えタンパク質と LysM を共発現した場合にも、両者は共精製された。これらのことから、SaHCS と LysM の RAM ドメイン同士が相互作用していることが示された。また *S. acidocaldarius* から調製したタグ付き SaHCS はリジンによる阻害を受けるのに対して、大腸菌から調製した SaHCS の RAM ドメイン欠失体はリジンによる阻害を受けなかった。以上の結果から、ヘテロ複合体を形成する LysM および SaHCS の RAM ドメインがリジンを感知し、SaHCS 触媒ドメインのリジンによる活性阻害を担っていることが示された。

Sulfolobus acidocaldarius, amino acid biosynthesis, homocitrate synthase

講演番号：2C22p08
講演日時、会場：3 月 27 日 15:27～ C 校舎 22 会場

リジン生合成酵素 LysY とキャリアタンパク質 LysW の複合体結晶構造解析
Crystal structure of LysY-LysW complex
○清水 哲、富田 武郎、葛山 智久、西山 真（東大生物工学セ）
○tetsu SHIMIZU, takeo TOMITA, tomohisa KUZUYAMA, makoto NISHIYAMA (BRC, The Univ. of Tokyo)

当研究室では高度好熱性細菌 *Thermus thermophilus* のリジン生合成経路が従来の経路とは異なり 2-オキソグルタル酸を出発物質として α-アミノアジピン酸(AAA)を経由すること、さらに AAA 以降の反応において 54 残基からなるキャリアタンパク質 LysW をアミノ基の保護基として用い、効率的に反応を進めていることを明らかにしてきた。LysW を介した生合成経路は他の好熱性細菌、古細菌におけるリジン生合成だけでなく、放線菌の二次代謝にも関与していることが明らかになりつつある一方で、それらの代謝酵素群と LysW との相互作用に関する構造生物学的知見はほとんどないのが現状である。そこで本研究では、*T. thermophilus* におけるリジン生合成酵素 LysY と LysW 誘導体の複合体結晶構造解析を行うことで、キャリアタンパク質を介した生合成マシナリーにおける新たな知見を得ることを試みた。

LysW、LysY、LysX、LysZ を大腸菌 BL21 CodonPlus (DE3)を宿主として発現し、各種クロマトグラフィーにより精製した後、LysW、AAA を基質として LysX、LysZ、LysY による *in vitro* 反応を行うことで生合成中間体である LysW-γ-AAA-semialdehyde (LysW-AASA) を調製した。LysY·LysW-AASA 複合体結晶化はハンギングドロップ蒸気拡散法により行い、ミクロシーディング法により良質の結晶を得た。高エネルギー加速器研究所のビームライン BL-3A にて最大分解能 1.8 Å で LysY/LysW-AASA 複合体結晶の回折データを取得し、LysY および LysW をサーチモデルとした分子置換法により LysY·LysW-AASA 複合体結晶構造を決定することに成功した。得られた構造は非対称単位中に 2 分子の LysY と 1 分子の LysW-AASA を含んでおり、結晶化条件に添加した $NADP^+$の電子密度も確認された。LysW-AASA の C 末端部分(Glu47-Glu54)の電子密度は観察されなかったが、基質ポケット入り口付近に位置する Arg209、Arg83、His78 側鎖の構造が、LysW-AASA の結合に伴い変化していることが明らかとなった。特に Arg209 については構造変化により LysW-AASA の Glu33 カルボキシル基とイオン結合を形成しており、静電的な相互作用を介した LysW の認識に重要なアミノ酸残基であることが示唆された。加えて LysY の Lys275 と LysW-AASA の Glu21 の間にもイオン結合の形成が観察された。興味深いことに、Lys275 を含むβ11-α10 ループは LysY ホモログにおいて ArgC ホモログの同ループと比べ長い傾向が見られ、この部分が LysW 認識において重要な役割を担っていることが示唆された。現在 LysY について上記の残基の変異体の作製および LysW-AASA との相互作用解析を行っており、その結果についても併せて発表する予定である。

Thermus, lysine, carrier protein

講演番号：2C22p09
講演日時、会場：3 月 27 日 15:38～ C 校舎 22 会場

Thermus thermophilus 由来リジン生合成系酵素 LysK の結晶構造解析
Crystallographic analysis of LysK involved in lysine biosynthesis of *Thermus thermophilus*
○藤田 理美、長谷部 文人、CHO Su-Hee、富田 武郎、葛山 智久、西山 真（東大生物工学セ）
○Satomi FUJITA, Fumihito HASEBE, Su-Hee CHO, Takeo TOMITA, Tomohisa KUZUYAMA, Makoto NISHIYAMA (BRC, Ther Univ. of Tokyo)

バクテリアは一般に、ジアミノピメリン酸(DAP)を経由する DAP 経路でリジンを生合成することが知られているが、当研究室において、バクテリアである *Thermus thermophilus* がα-アミノアジピン酸(AAA)を経由してリジンを生合成することが明らかにされている。AAA 以降の反応は、キャリアタンパク質 LysW が基質のα-アミノ基に結合することによって生合成中間体が保護された形で LysX、LysZ、LysY、LysJ、LysK による 5 段階の反応が進行する。LysW が負電荷を帯びているのに対し、結晶構造が明らかになっている生合成酵素群の触媒残基周辺が正に帯電していることから、LysW は各酵素と静電的な相互作用によって認識され、酵素間を受け渡されることで効率的に反応が進行すると推測される。これまで、*T. thermophilus* 由来の LysZ、LysY や、LysX のオルソログである *Sulfolobus* 由来 ArgX において、LysW との複合体の結晶構造解析が行われ、これらの酵素による LysW の認識様式は明らかにされつつあるが、リジン生合成経路の最終反応を担う LysK については酵素単体の結晶構造も未だ明らかにされていない。そこで私たちは、LysK の結晶構造を決定し、その効率的な触媒機構を明らかにすることを目指した。

大腸菌を用いて LysK と LysW の組換えタンパク質を発現させ、精製した。結晶化条件のスクリーニングの結果、リジンおよび LysW を添加した条件下で LysK の結晶を得た。2.4 Å 分解能の X 線回折データを取得し、LysK と 43%の相同性を有する *Sphaerobacter thermophilus* の Sthe_0214 をモデルとした分子置換法により、リジンを結合した LysK の結晶構造を決定することに成功した。

非対称単位には 2 分子の LysK が含まれ、そのうちの 1 分子が活性中心にリジンを結合していた。LysK の活性発現に必要な金属を結合する残基は、zinc-peptidase-like superfamily に属する他の酵素でも保存されていた。LysK において活性中心は分子表面から奥深くに存在し、LysK の表面から活性中心に結合したリジンまでは 11 Å 程度の細い通り道があった。この通り道に LysW の保存された C 末端アミノ酸配列 ^{50}EDWGE^{54} を含む extension ドメインが伸びた構造で認識されて、その末端の Glu54 のγ-カルボキシル基に結合したリジンが LysW より切り離されると考えられる。LysK においても通り道の入り口周辺は分子表面が正に帯電していることが明らかになり、負に帯電する LysW の球状ドメインをこの領域が認識している可能性が示唆された。今回の成果は LysW が生合成酵素間でどのように受け渡されるかを解明するための大きな一歩であり、相互作用機能の向上による効率的なリジン発酵系酵素の開発につながることが期待される。

lysine biosynthesis, *Thermus thermophilus*, crystal structure

講演番号：2C22p10
講演日時、会場：3 月 27 日 15:49～ C 校舎 22 会場

紫外吸収分光法と X 線結晶構造解析によるリジル-tRNA 合成酵素と L-リジンの結合の解析およびその誘導適合機構に対する洞察
UV absorption spectroscopic and X-ray crystallographic analysis of the binding of L-lysine with lysyl-tRNA synthetase and insights into the induced-fit mechanism of the binding
○滝田 禎亮[1]、三上 文三[2]、井上 國世[1] ([1]京大院・農・食生科、[2]京大院・農・応生科)
○Teisuke Takita[1], Bunzo Mikami[2], Kuniyo Inouye[1] ([1]Div. Food Sci. Biotechnol., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]Div. Appl. Life. Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)

【目的】アミノアシル-tRNA 合成酵素は、対応するアミノ酸と tRNA を結合させるアミノアシル化反応を精度よく触媒する。我々は、*Bacillus stearothermophilus* リジル-tRNA 合成酵素（*Bs*LysRS）の L-lysine (Lys)活性化反応について以下のことを明らかにしてきた：(1)本反応では、Lys が結合したのちに ATP が結合する；(2)本酵素（WT）の Trp 蛍光強度は Lys 結合により減少し、その反応はストップトフロー法で観測できないほど速い；(3)本酵素はホモダイマーでサブユニット当たり 2 つの Trp 残基をもつが、上記蛍光減少は W314 に起因する；(4)Lys 結合は、W314 の UV 吸収スペクトル変化もおこす；(5) 変異体 W314F と W314F/W332F は Lys 結合によりほぼ同一の UV 吸収差スペクトル（UVADS：負のピークを 2 つ持つ W 型）を示す；(6) X 線結晶構造では、酵素に結合した Lys の α−アミノ基の近傍に E269、ε−アミノ基の近傍に E418、その中間に E231 と Y271 が存在する。本研究の目的は、(5)の UVADS が Y271 に起因するかどうか調べ、さらに Lys 認識における上記 4 残基の役割とその誘導適合機構に関する知見を得ることである。【方法】Y271F、W314F/W332F、W314F/W332F/Y271F を作成し SDS-PAGE で単一バンドにまで精製した。酵素活性は、pH 8.0、37 ˚C における Lys 依存的 ATP-PPi 交換反応で評価した。UVADS 測定は、ダブルタンデムキュベットシステムを付けた島津吸光計 UV-2200 を用い、pH 8.0、30 ˚C で行った。Lys アナログとして、*S*-(2-aminoethyl)-L-cysteine (SAEC)、D-lysine (D-Lys)、L-ornithine (Orn)、cadaverine (Cad)、6-aminohexanoic acid (Aha)、glycine (Gly)、L-norleucine (Nor)を用いた。X 線回折データは、Spring-8 で得た。【結果と考察】Lys に対する K_m 値は、WT と W314F/W332F では同程度であったが、Y271F と W314F/W332F/Y271F では、約 500 倍上昇した。W314F/W332F/Y271F は、W314F/W332F と異なり、Lys 添加により UVADS を示さなかった。これにより、(5)の UVADS が Y271 に起因することが明らかになった。W314F/W332F は、SAEC、Orn、D-Lys、Cad 添加では W 型 UVADS（Y271 のブルーシフト）を示したが、Aha 添加では逆向きの M 型 UVADS（レッドシフト）を示し、Gly や Nor 添加では顕著な UVADS を示さなかった。W 型 UVADS の 2 つのピークの強度から算出した K_d 値と、Trp 蛍光を指標に求めた K_d 値は比較的よく一致した。W314F/W332F と Aha の複合体の X 線結晶構造を決定し、大腸菌 LysRS と Lys の複合体と比較したところ、α-アミノ基の有無により、E231 の側鎖が移動することが示唆された。これらの結果と、報告されている分光学的データをもとに、以下の酵素分子種における上記 4 残基の相互作用について考察する：(1) リガンドの結合していない WT；(2) WT·Lys 複合体；(3) WT·Aha 複合体。

aminoacyl-tRNA synthetase, substrate binding, induced-fit

講演番号：2C22p11
講演日時、会場：3 月 27 日 16:10～ C 校舎 22 会場

超好熱アーキア *Thermococcus litoralis* DSM 5473 の L-アスパラギン酸オキシダーゼ：性質と反応速度論的解析

Characterization and kinetic analysis of L-aspartate oxidase from hyperthermophilic archaeaeon, *Thermococcus litorlis*　DSM 5473

○鷲尾 翼[1]、老川 典夫[1,2]([1]関大・理工学研究科、[2]関大・化学生命工)
○Tsubasa WASHIO[1], Tadao OIKAWA[1,2] ([1]Graduate School of Sci. and Eng., Kansai Univ., [2]Fac. of Chem., Mat. and Bioeng., Kansai Univ.)

先にわれわれは、超好熱アーキア *Thermococcus litoralis* DSM 5473 のゲノム上にコードされている L-アスパラギン酸オキシダーゼホモログ遺伝子(*Tl-nadB*)を大腸菌で発現させ、本遺伝子が L-アスパラギン酸オキシダーゼ(EC:1.4.3.16, *Tl*-LASPO)活性を有していることを明らかにした。*Tl*-LASPO は本菌のアスパラギン酸代謝の中心的役割を果たすと考えられるが、その性質は不明のままである。そこで本研究では、*Tl*-LASPO の酵素科学的性質の解明と反応速度論的解析を行うことを目的とする。

Tl-nadB を pET21b にライゲーション後、得られた pET21b/*Tl-nadB* を *Escherichia coli* BL 21(DE3)に形質転換した。*E. coli* BL 21(DE3)- pET21b/*Tl-nadB* を 37℃、16 時間、振とう培養後、得られた菌体を超音波破砕し遠心後上清を粗酵素液とした。粗酵素液を 80℃、15 分間熱処理後、Ni-NTA、ハイドロキシアパタイトの各種カラムクロマトグラフィーを用い粗酵素液から *Tl*-LASPO を精製した。酵素活性は L-Asp を基質として好気条件下 70℃で反応を行い、生成する H_2O_2 をペルオキシダーゼとフェノールおよび 4-アミノアンチピリンとの反応により生じる 500 nm の吸光度変化から定量し測定した。酵素活性 1 U は、70℃で 1 分間に 1 μmol の H_2O_2 を生成する酵素量とした。

精製酵素をゲル濾過カラムクロマトグラフィーで分析した結果、*Tl*-LASPO の分子質量は約 139 kDa であることが明らかとなった。一方一次構造から計算されるサブユニットの分子質量は約 52 kDa であることから、*Tl*-LASPO はホモトリマーであることが明らかとなった。*Tl*-LASPO の最適 pH は 8.0 であり、検討した反応温度(30℃～70℃)では 70℃で最大活性を示した。*Tl*-LASPO は、80℃以下の温度で 1 時間熱処理した場合には活性の低下は見られず、90℃での活性半減期は約 40 分と高い耐熱性を示した。また *Tl*-LASPO は、pH 5.0 以上の幅広い pH 範囲で安定であった。本酵素は L-Asp 以外の各種 L-アミノ酸や D-Asp を基質とせず、高い基質特異性を示した。L-Asp の基質濃度を変化させ活性を測定し 70℃、60℃、50℃、37℃での反応におけるカイネティクスパラメーターを決定した結果、各反応温度でのパラメーターはそれぞれ 70℃：K_m=7.47 (mM), k_{cat}=9.46 (s^{-1}), k_{cat}/K_m = 1.26 (s^{-1}・mM^{-1})；60℃：K_m=10.2 (mM), k_{cat}=5.62 (s^{-1}), k_{cat}/K_m = 0.55 (s^{-1}・mM^{-1})； 50℃：K_m=14.4 (mM), k_{cat}=3.57 (s^{-1}), k_{cat}/K_m = 0.28 (s^{-1}・mM^{-1})； 37℃：K_m=21.1 (mM), k_{cat}=1.54 (s^{-1}), k_{cat}/K_m = 0.073 (s^{-1}・mM^{-1})となった。これらの結果から、*Tl*-LASPO の K_m 値は反応温度が上昇するにつれて減少し、*Tl*-LASPO と L-Asp との親和性は高温域でより高く、触媒効率(k_{cat}/K_m)も高温域でより高くなることが明らかとなった。

L-aspartate oxidase, *Thermococcus*, thermostable enzyme

講演番号：2C22p12
講演日時、会場：3 月 27 日 16:21～ C 校舎 22 会場

Pyrococcus horikoshii 由来 L-アスパラギン酸オキシダーゼの基質認識
Substrate recognition by L-aspartate oxidase from *Pyrococcus horikoshii*.
○小川 真梨奈[1]、芦田 博之[2]、丸田 隆典[1]、石川 孝博[1]、澤 嘉弘[1] ([1]島根大学生物資源科学、[2]総合科学研究支援センター)
○MARINA OGAWA[1], HIROYUKI ASHIDA[2], TAKANORI MARUTA[1], TAKAHIRO ISHIKAWA[1], YOSHIHIRO SAWA[1] ([1]Shimane Univ., [2]Dep.MolFunc.Genomics,Interdiscipl.Cent.Sci.Res.,Shimane Univ.)

【目的】 多くの原核生物において、L-アスパラギン酸オキシダーゼ（LAO, EC1.4.3.16）は、NAD 生合成経路の初発酵素 (NadB) として L-アスパラギン酸（L-Asp）からイミノアスパラギン酸への酸化反応を触媒している。LAO は、基質 L-アスパラギン酸に対する特異性が極めて高く、高感度の L-Asp 定量試薬として用いることのできる有用酵素であり、これまで、主に大腸菌由来の LAO (EcoLAO) で研究が行われていたが、精製中や保存中に分断化し失活することが問題となっていた。また、アミノ酸オキシダーゼは、アミノ酸定量用酵素として極めて有用であるが、その種類が少ないのが問題となっている。

今回、X 線結晶構造解析されている EcoLAO と L-Asp のドッキング・シミュレーションおよびリガンド・インターアクション解析より、基質 L-Asp と相互作用すると推定される 4 つのアミノ酸残基を同定した。今回、この情報を基に超好熱性アーキア *Pyrococcus horikoshii* 由来 LAO (PhoLAO) の相同アミノ酸残基の変異体を作製し解析を行ったので報告する。

【方法・結果】 PhoLAO Ala 置換変異体（Q45A、H213A、T226A、E227A）は QuickChange 法で作製した。大腸菌で発現後、野生型(WT) と同じく 80℃、30 分の熱処理、DEAE-Toyopearl クロマトグラフィー、Superdex 200 によってほぼ均一までに精製した。LAO の活性測定は、70°C でフェリシアン化カリウムの還元に伴う 405 nm の吸光度の減少速度を追跡することにより行った。

E227A では Asp に対する大幅な活性低下が見られたが、Q45A では WT の約 2 倍、H213A では約 2.5 倍の活性上昇が見られた。基質特異性については、WT が Asp にのみ反応性を示すのに対し、Q45A では Asp (100%) 以外では Asn (6%)が最高で、その他 Phe (5%), Trp (5%), L-Tyr (4%)、L-Val (4%) など芳香族・疎水性アミノ酸が反応性を示すようになった。H213Aも芳香族アミノ酸、Trp (5%)を最高に幅広い基質特性を示すようになった。WT, Q45A, H213A の Asp に対する触媒効率 (kcat / Km) は、それぞれ 2.39、4.33、0.63 であった。

そこで次に MOE の Residue Scan 機能で 400 種 Gln45 / His213 変異酵素ライブラリから L-Asn に対して親和性の高い変異酵素の *in silico* screening を行ったところ、7 種の変異酵素候補 (Q45I/H213H, Q45Y/H213W, Q45R/H213W, Q45W/H213H, Q45F/H213H, Q45E/H213W, Q45A/H213W) が WT より高い親和性を示した。そこで、これら 7 種の変異体をインバース PCR 法で作製した。7種変異体の基質特異性、カイネティクス解析は現在進行中である。これらの結果を基に、LAO の基質認識について考察を行う予定である。

L-aspartate oxidase, substrate recognition, substrate specificity

講演番号：2C22p13
講演日時、会場：3 月 27 日 16:32～ C 校舎 22 会場

糸状菌 *Trichoderma viride* 由来 L-リシン α-オキシダーゼの異種発現系の構築と X 線結晶構造解析について

Recombinant expression and crystal structure of L-lysine α-oxidase from *Trichoderma viride*

○天野 万里[1]、橋本 義輝[2]、齋藤 結希[2]、小林 達彦[2]、近藤 裕輝[3]、今田 勝巳[3]、日下部 均[4]、田村 隆[1]、稲垣 賢二[1] ([1]岡山大院・環境生命、[2]筑波大院・生命環境、[3]大阪大院・理、[4](株)エンザイム・センサ)

○Marie Amano[1], Yoshiteru Hashimoto[2], Yuki Saitoh[2], Michihiko Kobayashi[2], Hiroki Kondo[3], Katsumi Imada[3], Hitoshi Kusakabe[4], Takashi Tamura[1], Kenji Inagaki[1] ([1]Grad. Sch. Environ. & Life Sci. Okayama Univ, [2]Grad. Sch. Life. & Environ. Sci. Tsukuba Univ, [3]Grad. Sch. Sci. Osaka Univ, [4]Enzyme Sensor Co. Ltd)

【目的】L-リシン α-オキシダーゼ(LysOX)は糸状菌 *Trichoderma viride* から生産される L-アミノ酸オキシダーゼ(LAO)の一種であり，L-リシンの酸化的脱アミノ化反応を触媒するフラビン酵素である。LAO は一般的に基質特異性が低いものが多い中，本酵素は L-リシンに対して高い基質特異性を持ち，温度や pH に対しても安定であることから食品工業分野においてバイオセンサーとして利用されている。また，顕著な抗腫瘍性を有することも報告されており，医療分野での応用も考えられている。そのため，LysOX の異種宿主による簡便かつ大量発現系の構築及び構造解析は，本酵素の工業化への応用並びに機能改変や安定性向上といった基礎研究への新たな知見をもたらすことが期待される。

【方法】異種発現系の構築では，放線菌 *Streptomyces* 属を宿主として使用し，ニトリルヒドラターゼ遺伝子のプロモーターを有する構成型高発現プラスミドを用いて，組換え発現系の構築を試みた。放線菌 DNA の GC 含量は約 65%と高く，糸状菌由来である LysOX の GC 含量は 52%と異なっていることからコドンの最適化を行い，生産量の向上を図った。

X 線結晶構造解析では精製された組換え酵素を使用し，サンプル(酵素溶液と 4%アガロースゲルを 1:1 で混合)をキャピラリー(直径 0.5 mm ×高さ 80 mm)中で 20℃，2-5 ヶ月かけて結晶化を行い，得られた結晶を L-リシン溶液に浸漬した。この結晶の回析データを SPring-8 beamline BL41XU で収集した。

【結果及び考察】コドンの最適化を行ったもので，500 ml YEME 培地/2 L 坂口フラスコ，28℃で培養した場合，培養日数 18 日目の培養液上清で最大 10.7 U/ml の活性値を確認できた。

結晶化により，1.7 Åの分解能を有する結晶を得ることができ， 本酵素の複合体構造を明らかにすることができた。活性中心では *Calloselam rhodostoma* 由来低基質特異性の LAO で見られる R90, Y372, W465 が LysOX にも高度に保存されており，基質のアミノ酸骨格の結合に関わることが推定された。また，低基質特異性の LAO には見られない残基 Trp371 の存在や基質のアクセス経路表面に酸性残基が多いことなどから，基質特異性に関与する構造特性が明らかとなった。さらに基質認識に関わるとされるアミノ酸残基の存在も確認され，リガンドフリーとの構造比較より，LysOX の基質認識機構について論ずる。

L-Lysine α oxidase, recombinant expression, crystal structure

講演番号：2C22p14
講演日時、会場：3 月 27 日 16:43～ C 校舎 22 会場

Rhodococcus 属放線菌由来低基質特異性 L-アミノ酸酸化酵素の 遺伝子クローニングと発現系の構築
Gene cloning and expression of L-amino acid oxidase with broad substrate specificity from *Rhodococcus* sp. AIU Z-35-1

○村上 佳穂[1]、田港 静[1]、橋本 義輝[2]、小林 達彦[2]、山田 美和[3]、礒部 公安[3]、田村 隆[1]、稲垣 賢二[1] ([1]岡山大院・環境生命、[2]筑波大院・生命環境、[3]岩手大・農)
○Kaho MURAKAMI[1], Shizuka TAMINATO[1], Yoshiteru HASHIMOTO[2], Michihiko KOBAYASHI[2], Miwa YAMADA[3], Kimiyasu ISOBE[3], Takashi TAMURA[1], Kenji INAGAKI[1] ([1]Grad. Sch. Environ. & Life Sci. Okayama Univ., [2]Grad. Sch. Life & Environ. Sci. Tsukuba Univ., [3]Fac. Agri., Iwate Univ.)

【目的】L-アミノ酸酸化酵素(LAO)は，L-アミノ酸の酸化的脱アミノ反応を触媒し，その多くは補酵素として非共有結合型の FAD を有するフラボプロテインである。LAO は蛇毒や昆虫毒，真菌類，藻類など，様々な生物でみられ，低基質特異性 LAO の代表の蛇毒由来 LAO ではその構造も解かれ研究が進められてきた。一方我々は，基質特異性が非常に厳格な L-グルタミン酸酸化酵素や L-リシン酸化酵素の構造解析に成功しており，その結果をもとに LAO に様々な基質特異性をもたらす要因について構造学的観点から明らかにすることを目的に研究を進めて来た。*Rhodococcus* sp. AIU Z-35-1 由来 L-アミノ酸酸化酵素（rzLAO）は現在報告のある中で最も基質特異性の低い LAO であり N^{α}-benzyloxycarbonyl-L- lysine(N^{α}-*Z*-L-Lys)を基質として，N^{α}- benzyloxycarbonyl-L-aminoadipate-σ-semialdehyde(N^{α}-*Z*-L-AASA)を生成し，N^{α}-*Z*-L-AASA の効率的な製造に応用できる。また N^{ε}-*Z*-L-Lys を N^{ε} -*Z*-L-AASA に酸化し，さらに広い範囲の L-アミノ酸も対応するケト酸に酸化する。このように応用も期待される低基質特異性 rzLAO の構造機能解析のため遺伝子クローニングと発現系の構築を行った。【方法及び結果】rzLAO の活性測定は生成するケト酸を MBTH（3-methyl-2-benzothiazolinone-hydrazone）法により定量した。既に明らかになっている rzLAO の N 末端アミノ酸配列から設計した縮退プライマーを用いて *Rhodococcus* sp. AIU Z-35-1 のゲノム DNA から目的遺伝子周辺の領域を PCR 増幅させ，得られた断片のシークエンス解析を行った。また，目的遺伝子の開始コドンから終始コドンまでを，新たに設計したプライマーを用いて PCR 増幅し，TA クローニングにより pTA_rzLAO プラスミドを構築した。この pTA_rzLAO から rzLAO を PCR で増幅し，pUC19 にサブクローニングし，これをもとに rzLAO のシークエンス解析を行った。rzLAO 遺伝子は 1,605 bp であり，535 アミノ酸をコードしていた。 rzLAO のアミノ酸配列は，*R. opacus* 由来 LAO と 81%，マレーマムシ *Calloselasma rhodostoma* の毒液由来 LAO と 27%の相同性を示した。次に rzLAO 遺伝子を大腸菌-*Rhodococcus* シャトルベクターを用いて発現ベクターpREO_rzLAO を構築した。*R. erythropolis* NBRC100887, *R. percolatus* NBRC100626 を形質転換し培養，菌体破砕後に LAO の活性測定と SDS - PAGE を行った。その結果両菌の形質転換体の無細胞抽出液中に LAO 活性が認められ，発現が確認された。現在形質転換体からの rzLAO の精製と性質検討を行っている。1) Arima, J., *et al., FEBS Journal*, 276, 3894-3903 (2009)
2) Isobe, K. and Nagasawa, S. *J. Biosci. Bioeng.,* 104, 218-223 (2007)

L-amino acid oxidase, gene cloning and expression, broad substrate specificity

講演番号：2C22p15
講演日時、会場：3 月 27 日 16:54～ C 校舎 22 会場

海洋細菌 *Marinomonas mediterranea* 由来 L-リシン ε-オキシダーゼの 大腸菌発現系の構築

Recombinant expression of L-lysine ε-oxidase from marine bacterium *Marinomonas mediterranea*

○赤地 周作[1]、松井 大亮[2,3]、浅野 泰久[2,3]、田村 隆[1]、稲垣 賢二[1] ([1]岡山大院・環境生命、[2]富山県大工・生工研セ、[3]JST・ERATO)
○ Shusaku AKAJI[1], Daisuke MATSUI[2,3], Yasuhisa ASANO[2,3], Takashi TAMURA[1], Kenji INAGAKI[1] ([1]Grad. Sch. Environ. & Life Sci. , Okayama Univ., [2]Dept. Biotechnol., Fac. Eng., Toyama Pref. Univ., [3]JST・ERATO)

【目的】海洋細菌 *Marinomonas mediterranea* 由来の L-リシン ε-オキシダーゼ(LodA, EC 1.4.3.20)は、L-リシンの ε 位の酸化的脱アミノ反応を触媒し、2-アミノアジピン酸-6-セミアルデヒドと過酸化水素とアンモニアへ変換する L-アミノ酸オキシダーゼである[1)]。自然界において, LAO は生体内外で有機物の循環に関わる重要な酵素であるため, LAO に関する研究は, 基礎と応用両面から注目される。また, 本酵素は FAD を補酵素として使用しない稀な LAO であり, 構造解析の結果, Trp581 と Cys516 が結合することで, 補因子としてシステイントリプトフィルキノン(CTQ)を持つということを LAO の中では初めて見出した[2)]。本酵素は高い基質特異性及び基質親和力を持つことから L-Lys バイオセンサーとしての応用の他に, 抗腫瘍化合物としての利用, 医薬中間体の生産などと多岐にわたる応用にも期待される。本研究は *M. mediterranea* 由来 ε-LysOX の大腸菌発現系構築を目的として行った。
【方法及び結果】ε-LysOX の本体と ε-LysOX が活性をもつために必要なタンパク質はそれぞれ *lodA*(2.1 kb), *lodB*(1.1 kb)という遺伝子によってコードされており, *lodAB* はオペロンを形成している[3)]。*M. mediterranea* ゲノム DNA から PCR によって全長 3.2 kb の *lodAB* を増幅し, 相同組換えによって pCold1 へ導入し, pCold Ⅰ-*lodAB*(7.7 kb)を作成した。構築したプラスミドを大腸菌宿主 *E. coli* Rosetta(DE3)pLysS へ形質転換し, ε-LysOX の発現を行った。その結果, ε-LysOX の本体である LodA(MW:81 kDa), LodA が活性を持つために必要な酵素である LodB(MW:41 kDa)の共発現に成功した。5 ml LB 培地で培養後, 集菌・菌体破砕したのち, 熱処理(70℃, 30 min)後, Ni-NTA カラムに供することで精製度 290 まで組換え型 ε-LysOX を精製し, 電気泳動的に単一の酵素を得ることができた。この精製酵素を用い, 性質検討を現在行っているところである。酵素活性は反応生成物である過酸化水素 を 4-アミノアンチピリン法を用いて定量した。

1) Gomez *et al.*, *Biochmica et Biophysica Acta* **1764**, 1577-1585 (2006)
2) Okazaki S., *et al.*, *J. Biochem.* **154**, 233-236 (2013)
3) Lucas-Elío P., *et al.*, *J Bacteriol*. **188**, 2493-501 (2006)

L-lysine ε-oxidase, recombinant expression, Cysteine tryptophylquinone

講演番号：2C22p16
講演日時、会場：3 月 27 日 17:15～ C 校舎 22 会場

Arthrobacter globiformis 由来モノアミンオキシダーゼとヒスタミンオキシダーゼの基質認識

Substrate recognition by phenylethylamine oxidase and histamine oxidase from Arthrobacter globiformis.

○竹島 大貴[1]、芦田 裕之[2]、丸田 隆典[1]、石川 孝博[1]、澤 嘉弘[1] ([1]島根大 生資、[2]島根大 総合科学支援セ)
○Daiki Takeshima[1], Hiroyuki Ashida[2], Takanori Maruta[1], Takahiro Ishikawa[1], Yoshihiro Sawa[1] ([1]Shimane Univ., [2]Dep.Mol.Func.Genomics, Interdiscipl.Cent.Sci.Res., Shimane Univ.)

【目的】土壌微生物 *Arthrobacter globiformis* には、フェニルエチルアミンオキシダーゼ(AGAO, AO)とヒスタミンオキシダーゼ(HAO)の二つ銅含有アミン酸化酵素が存在する。AO は、フェニルエチルアミン(PEA)に対して最も高い反応性を示し、チラミン(TYR)などの芳香族アミンに対しても高い反応性を示すが、ヒスタミン(HIS)に対する反応性は乏しい。一方で、HAO はヒスタミンに対して最も高い活性を示すが、触媒効率は PEA や TYR の方が高いという特徴を持つ。また、両酵素とも炭素数 6, 7 の直鎖アルキルアミンも良好な基質にでき、HAO の方が活性が低く、芳香族アミンにより特異性の高い酵素である。このような基質特異性をもつ AGAO と HAO の基質認識と構造の関係を詳細にするため、変異体酵素の酵素学的解析や *in silico* 解析により、基質結合ポケット残基の役割について検討を行ったので報告する。
【方法・結果】AO と HAO のアライメント解析および構造比較解析を行ったところ、きわめて類似した基質結合ポケットを持ち、1 残基(AO:L358, HAO:E378)のみが両者で異なることが明らかとなった。HAO のホモロジーモデルを用いたドッキングシミュレーションでは、E378 残基が HIS のイミダゾール環の認識に働く可能性が示唆された。そこで、AO L358 変異体と HAO E378 変異体を作製した。HAO 型に改変した AO L358E 変異体では、TYR, HIS に対して WT よりも高い基質親和性および触媒効率を示した。基質特異性では HAO に類似した傾向は示さなかったが、直鎖アルキルアミンに対する活性が大きく低下し、PEA や TYR に対する特異性が向上した。一方で、AGAO 型に改変した HAO E378L 変異体は、ヒスタミンに対する基質親和性、触媒効率ともに約 1/3 に低下した。さらに基質特異性においては、TYR に対する活性が最も高くなり、直鎖アルキルアミンに対する活性も上昇し、AO に類似した傾向を示した。この結果から、AO 358 位と HAO 378 位の残基は基質特異性に関与し、HAO E378 残基はヒスタミン認識に重要な残基であることが示唆された。また、358 位前後のアミノ酸配列ごと HAO 型に改変した AO MutArm 変異体は、HIS に対して AO L358E 変異体よりも高い触媒効率を示し、TYR に対しては WT よりも高い触媒効率を示した。さらに、直鎖アルキルアミンに対する活性が向上した。この結果から、358 位前後のアミノ酸配列の改変により反応性を制御できる可能性が示唆された。また、様々なアミノ酸に置換した AO L358変異体の酵素学的解析結果と統合科学計算プログラムである MOE を用いた AO L358 変異体解析結果を比較することで、*in silico* 分子設計法の検討と評価を行った。

Substrate recognition, substrate specificity, phenylethylamine oxidase

講演番号：2C22p17
講演日時、会場：3 月 27 日 17:26～ C 校舎 22 会場

Flavobacterium indicum DSM 17447 の好熱性スレオニンデヒドロゲナーゼ : 性質と反応速度論的解析

Characterization and kinetic analysis of thermophilic L-threonine dehydrogenase from *Flavobacterium indicum* DSM 17447

○井上 淳[1]、老川 典夫[1,2] ([1]関大・理工学研究科、[2]関大・化学生命工)
○Jun INOUE[1], Tadao OIKAWA[1,2] ([1]Graduate School of Sci. and Eng., Kansai Univ., [2]Fac. of Chem., Mat. and Bioeng., Kansai Univ.)

Flavobacterium 属細菌は広く自然界に分布し、16S rDNA に基づきさまざまな種に分類される。*Flavobacterium frigidimaris* KUC-1 は、当研究室で南極の海水から単離された好冷性細菌であり、好冷性のスレオニンデヒドロゲナーゼ、バリンデヒドロゲナーゼを生産するとともに、耐熱性のアルコールデヒドロゲナーゼ、アルデヒドデヒドロゲナーゼ、アスパルターゼをも生産するユニークな *Flavobacterium* 属細菌である。本研究では、*F. frigidimaris* KUC-1 の好冷性、耐熱性酵素遺伝子の他の *Flavobacterium* 属細菌ゲノムにおける分布と 16S rDNA に基づく *Flavobacterium* 属細菌の分類との関連性を解明することを目的とし、*Flavobacterium indicum* DSM 17447 のスレオニンデヒドロゲナーゼ(*Fi*-TDH)の性質を解明することを目的としている。

F. indicum DSM 17447 のスレオニンデヒドロゲナーゼ遺伝子(*Fi-ltd*)は、pET21b ベクターに挿入後、*Escherichia coli* BL21(DE3)に形質転換し発現させた。対照として *F. frigidimaris* KUC-1 のスレオニンデヒドロゲナーゼ遺伝子(*Ff-ltd*)を同様に発現させた。*Fi*-TDH および *Ff*-TDH は Ni-NTA、RESOURCE Q カラムを用いてそれぞれ精製した。酵素活性は L-Thr と NAD^+を基質として用い、生成する NADH に由来する 340 nm の吸光度変化を定量し測定した。酵素活性 1 U は 1 分間に 1 μmol の NADH を生成する酵素量とした。

解読されている全 *Flavobacterium* 属細菌のゲノムを検索したところ、*Ff-ltd* のホモログ遺伝子は *Flavobacterium indicum, Flavobacterium johnsoniae, Flavobacterium psychrophilum* にのみ存在することが明らかとなった。*Fi*-TDH は分子質量は 72 kDa のホモダイマー酵素であり、組み換え *Ff*-TDH(r*Ff*-TDH：分子質量 72 kDa；ホモダイマー)とよく一致した。一方、反応温度の酵素活性に及ぼす影響を解明するため、10℃と 40℃で *Fi*-TDH と r*Ff*-TDH の速度論的解析を行った。10℃での *Fi*-TDH の k_{cat}/K_m は 6.51 (mM^{-1} sec^{-1})、*Ff*-TDH の k_{cat}/K_m は 8.74 (mM^{-1} sec^{-1})であった。また 40℃での *Fi*-TDH の k_{cat}/K_m は 24.8 (mM^{-1} sec^{-1})、*Ff*-TDH の k_{cat}/K_m は 19.2 (mM^{-1} sec^{-1})であった。これらの結果から、*Fi*-TDH は高温域で、*Ff*-TDH は低温域で触媒効率が高い酵素であり、*Fi*-TDH と *Ff*-TDH は異なる温度特性を持つことが明らかとなった。*F. indicum* DSM 17447（最適生育温度：37℃）はインドのアッサム地方の温泉から単離された最適生育温度が *F. frigidimaris* KUC-1（最適生育温度：15℃）より高い好熱性 *Fulavobacterium* 属細菌である。したがって、*Fi-ltd* は *F. indicum* DSM 17447 の生育環境に適応した変異を受け、高温域で高い触媒能を有するようになったと考えられる。

Flavobacterium, L-threonine dehydrogenase, thermophilic enzyme

講演番号：2C22p18
講演日時、会場：3 月 27 日 17:37～ C 校舎 22 会場

極限環境微生物のイソプロピルリンゴ酸脱水素酵素の耐圧性と熱安定性
High-pressure adaptation and thermal stability of 3-isopropylmalate dehydrogenase from Extremophiles.

○濱島 裕輝[1]、永江 峰幸[2,3]、渡邉 信久[2,3]、牧野 龍[1]、今井 竹夫[1]、山田 康之[1]、加藤 千明[4] ([1]立教大学、[2]名古屋大学、[3]名大シンクロトロン、[4]海洋研究開発機構)
○Yuki Hamajima[1], Takayuki Nagae[2,3], Nobuhisa Watanabe[2,3], Ryu Makino[1], Takeo Imai[1], Yasuyuki Kato-Yamada[1], Chiaki Kato[4] ([1]Rikkyo Univ., [2]Nagoya Univ., [3]NUSR, [4]JAMSTEC)

深海に適応している好圧菌は高圧環境に適応するため、その酵素も加圧下の活性が高いことが知られている。ロイシン生合成系の必須の酵素であるイソプロピルリンゴ酸脱水素酵素(IPMDH)を材料に、マリアナ海溝深度 10898 m 由来の絶対好圧菌 *Shewanella benthica* DB21 MT-2 の IPMDH の加圧下の活性を調べた結果、加圧下(200 MPa)における活性は 66%、常圧菌 *Shewanella oneidensis* の IPMDH の 33%よりも耐圧性が高いという差がみられた。この加圧下の活性の差が、どのような構造やアミノ酸の違いに起因しているのか明らかとするため、常圧菌由来の IPMDH に、好圧菌型のアミノ酸配列になるよう 1 アミノ酸置換変異を導入し、加圧下の活性を調べた。

結果、活性中心の裏側に位置する 266 番目の Ser を Ala に置換することで、加圧下の活性が 33 %から 61 %まで上昇する変異酵素を得ることができた。反対に、好圧菌由来の IPMDH の 266 番目のアミノ酸を Ala から常圧菌型の Ser に置換すると、加圧下の活性が 66 %から 42 %まで減少する結果となった。この加圧下の活性の変化の原因を調べるため、常圧菌由来 IPMDH と常圧菌 S266A 変異酵素の結晶構造解析と高圧結晶構造解析を行い、立体構造を比較した。常圧での結晶構造解析では、大きな違いは見られなかった。高圧結晶構造解析の結果、常圧型酵素では、活性中心の裏側の溝に 3 つ水分子が見られるのに対して、変異酵素では溝にこの水分子が観察されなかった。266 番目の 1 アミノ酸の違いが、高圧での活性中心の裏側の溝への水分子の局在に影響を与え、酵素の耐圧性に影響をしていることが明らかとなった。これらの酵素の熱安定性を比較した。結果、熱安定性は常圧菌酵素 60.7℃、常圧菌 S266A 変異酵素 61.4℃、好圧菌酵素 56.5℃、好圧菌 A266S 変異酵素 54.1℃となり、耐圧性と熱安定性の間に相関関係は見られなかった。

そこで、耐圧性と熱安定性の関係をより明らかにするため、すでに熱安定性が明らかな、高度好熱菌 *Thermus thermophilus* の IPMDH と熱安定性が 1 アミノ酸置換により耐熱化した Tt-IPMDH 変異酵素を材料にその耐圧性を調べた。結果、Tt-IPMDH の 60℃,150 MPa における加圧下の活性は、Wild では 51.4%、活性中心近傍の変異で熱安定性を上昇させた L134N 変異酵素では 28.6%と、耐熱性と耐圧性に違いがみられた。

以上の結果から、IPMDH では耐熱性と耐圧性に関しては相関関係がなく、耐圧性に関しては活性中心近傍のアミノ酸の違いが耐圧性の差に大きく関与しており、おそらく活性中心の裏側の水分子のの局在のしやすさが影響していることが明らかとなった。

IPMDH, *Shewanella*, high-pressure

講演番号：2C22p19
講演日時、会場：3 月 27 日 17:48～ C 校舎 22 会場

酵母の抗酸化酵素 N-acetyltransferase Mpr1 の立体構造に基づいた機能向上

Structure based design of N-acetyltransferase Mpr1 for the improvement of enzymatic function.

○平瀬 冴華、那須野 亮、渡辺 大輔、高木 博史（奈良先端大バイオ）
○Saeka HIRASE, Ryo NASUNO, Daisuke WATANABE, Hiroshi TAKAGI (Nara Inst. of Sci. and Tech.)

【背景・目的】当研究室で見出した酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 由来の *N*-acetyltransferase Mpr1 は、アルギニン合成の促進とその後の一酸化窒素生成を介して、細胞の酸化ストレス耐性に寄与している。このようなアミノ酸代謝を介した酸化ストレス耐性機構は報告がなく、この系を強化することで、酵母の酸化ストレス耐性の向上、さらには発酵生産性の高い産業用酵母の育種が期待できる。当研究室ではこれまでに、Mpr1 遺伝子のランダム変異導入ライブラリーを用いたスクリーニングにより、熱安定性が向上した変異型酵素（Phe65Leu-Mpr1）を取得し、パン酵母で発現させることで発酵力の向上に繋げることに成功した。一方、我々は最近 Mpr1 の立体構造と触媒反応機構を明らかにした。そこで本研究では、立体構造に基づいて Mpr1 の理論的な分子設計を行い、活性や安定性の向上した変異型酵素を取得すること、およびそれらの構造機能相関を解析することを目的とした。
【方法・結果】本研究では、大腸菌を用いた組換え酵素として Mpr1 を発現・精製した後、モデル基質である L-アゼチジン-2-カルボン酸（AZC）を用いて *in vitro* で酵素活性を測定した。また、高温（50℃）処理後の残存活性により安定性を評価した。まず、CoA チオレートの安定化により反応を触媒する Asn178 とその近傍にある Ser181 をアニオン安定化能の高い残基に置換した変異型 Mpr1、および基質のカルボキシレートを認識・結合する Asn135 をアニオン結合能の高い塩基性残基などに置換した変異型 Mpr1 を作製した。これらの活性を測定したところ、野生型酵素に比べて著しく低下した。これは側鎖サイズの変化により正常な触媒反応が阻害されたためと考えられた。一方、*N*-acetyltransferase には二量体形成が活性に重要である酵素も報告されている。Mpr1 は溶液中で二量体を形成することから、二量体形成が活性や安定性に重要であると考えた。また、一般的に分子内相互作用はタンパク質の安定性を上昇させる。そこで、二量体の分子間表面かつ分子内ドメイン間に位置する Asn203 にアミノ酸置換を導入し、分子間または分子内相互作用の強化を試みた。その結果、Asn203Lys-Mpr1 は 50℃における活性半減期が野生型酵素の約 3.7 倍に延長し、著しい安定性の向上が認められた。また、ネイティブゲルを用いた電気泳動の結果から、この熱安定性の向上は二量体形成の促進ではなく、分子内相互作用の強化に起因するものと考えられた。また、Phe65Leu との二重アミノ酸置換により、各アミノ酸単独置換以上に熱安定性が向上した。現在、各変異型 Mpr1 を酵母で発現させ、ストレス耐性の強化を試みるとともに、そのメカニズムについて解析を進めている。

N-acetyltransferase Mpr1, structure based design, thermostability

講演番号：2E32a02
講演日時、会場：3 月 27 日 09:11～ E 校舎 32 会場

Neurospora crassa のフィトセラミド型中性スフィンゴ糖脂質合成に関わる新奇糖転移酵素 α-1,2-glucosyltransferase の同定

Identification of a novel α-1,2-glucosyltransferase involved in phytoceramide-type neutral glycosphingolipid synthesis in *Neurospora crass*

○谷 泰史[1,2]、山下 泰典[1]、三原 久明[1]（[1]立命館大・生命科学・生物工、[2]立命館大・R-GIRO）

○Yasushi TANI[1,2], Yasunori YAMASITA[1], Hisaaki MIHARA[1]（[1]Coll. of Life Sci., Ritsumeikan Univ., [2]R-GIRO, Ritsumeikan Univ.）

【目的】

イノシトールリン酸を含むフィトセラミド型酸性スフィンゴ糖脂質は、糸状菌の細胞内外シグナル伝達や分化に関与する。最近、特異なガラ系列構造を有する新たなフィトセラミド型中性スフィンゴ糖脂質 (基本骨格構造 : Galβ1-6Galβ1-Cer) が、*Rhizopus oryzae*、*Neurospora crassa*、*Mariannaea elegans* に存在することが明らかになった。しかし、フィトセラミド型中性スフィンゴ糖脂質の生理機能や生合成経路については未だ不明な点が多い。本研究では、アカパンカビ *N. crassa* における、4 糖構造を有するフィトセラミド型中性スフィンゴ糖脂質の生合成経路に関わる酵素の同定を目的とした。

【方法・結果・考察】

N. crassa は 10, 620 遺伝子を有する。これらの中からフィトセラミド型中性スフィンゴ糖脂質の生合成に関与する遺伝子を同定することを目的として，既に真核生物で明らかにされているスフィンゴ糖脂質合成に関わる糖転移酵素（UDP-galactose:ceramide galactosyltransferase、β-1,4-galactosyltransferase、α-1,4-galactosyltransferase 等）の配列を用い、*N. crassa* ゲノム配列に対して BLAST 検索を行い、36 種の相同遺伝子を抽出した。これらの候補遺伝子の欠損株を Fungal Genetics Stock Center から取得し、各遺伝子欠損株から抽出した中性スフィンゴ糖質を薄層クロマトグラフィー分析にて調べた。36 種の候補遺伝子欠損株の内、4 糖構造（Glcα1-2Galβ1-6Galβ1-6Galβ1-Cer）を有する中性スフィンゴ糖脂質を合成できない欠損株を 1 株見出した。該当の遺伝子を挿入した pMYX2 発現ベクターを用いて欠損遺伝子の相補実験を行ったところ、野生株と同様に、発現ベクターを導入した本欠損株において 4 糖構造を有する中性スフィンゴ糖脂質が認められた。また、本遺伝子によってコードされるタンパク質は、2 カ所の N 型糖鎖結合部位をもち、2 つの膜貫通領域の間に DXD モチーフを有する分子質量 38.7 kDa のタンパク質であることがアミノ酸配列より予測された。以上より、本タンパク質は、3 糖構造を有するフィトセラミド型中性スフィンゴ糖脂質を基質とする新奇 α-1,2-glucosyltransferase であることが示唆された。

α-1,2-glucosyltransferase, *Neurospora crassa*, phytoceramide-type neutral glycosphingolipid

講演番号：2E32a03
講演日時、会場：3 月 27 日 09:22～ E 校舎 32 会場

深海底泥由来 *Bacillus niacini* JAM F8 の hyaluronate lyase 遺伝子の同定
Identification of the hyaluronate lyase gene from the deep-sea bacterium *Bacillus niacini* JAM F8

○倉田 淳志[1]、西村 みどり[1]、西尾 美紀[1]、平井 晴奈[1]、小林 徹[2]、岸本 憲明[1] ([1]近畿大農、[2]独立行政法人海洋研究開発機構)
○ Atsushi KURATA[1], Midori NISHIMURA[1], Miki NISHIO[1], Haruna HIRAI[1], Tohru KOBAYASHI[2], Noriaki KISHIMOTO[1] ([1]Kinki Univ., [2]JAMSTEC)

【目的】 chondroitin sulfateは、硫酸化アセチルガラクトサミンとグルクロン酸から成る硫酸化多糖の総称である。深海環境は、低温（2-4˚C）、高圧、暗黒、貧栄養条件下であり、通常の生物の生育が困難である。本研究では、小笠原海溝の深海底泥（深度2759 m）からchondroitin sulfate C分解活性を有する*Bacillus* 属細菌を見いだしている。そこで、本菌株の生産するchondroitin sulfate C分解酵素の特性の解明、本酵素遺伝子の同定を目的とした。

【方法・結果】

chondroitin sulfate C分解酵素活性は、生成物である不飽和二糖の増加を235 nmにおける吸光度で測定した。本酵素はchondroitin sulfate C によって誘導的に合成された。各種クロマトグラフィーを用いて、本酵素を電気泳動的に均一になるまで精製した。SDS-PAGEでの分析の結果、本酵素は120 kDaであった。基質特異性を検討したところ、hyaluronateを良好に分解した。hyaluronateに対する分解活性を100%とした場合、他の基質に対する相対活性は以下のとおりであった：chondroitin sulfate A（44%）、chondroitin sulfate C（30%）、chondroitin（23%）。chondroitin sulfate Bとheparinには殆ど作用しなかった。

hyaluronateを基質とし、ESI-MSにより酵素反応生成物の同定を試みた。不飽和二糖Δdi-HAを標品に用いて、本酵素の反応生成物を分析した結果、Δdi-HAと同様の分子イオンピーク（*m*/*z* 378.1）を確認できた。さらに、ESI-MS/MS 分析によりフラグメントイオンピークを比較した結果、Δdi-HAと酵素反応生成物は同様のピークを示した。したがって、本酵素はchondroitin sulfate AおよびCに作用するhyaluronate lyaseであった。

本菌株から抽出したゲノムDNA を用いて、ゲノム解読を試みた。その結果、contig170本を得られ、本菌株のゲノム長は6.3 Mbp と推定できた。本酵素のアミノ酸配列を用いて、全ゲノム配列から本酵素遺伝子（3411 bp）を取得できた。

Bacillus niacini JAM F8, hyaluronate lyase, chondroitin sulfate

講演番号：2E32a04
講演日時、会場：3 月 27 日 09:33～ E 校舎 32 会場

Cobetia sp. 由来新規アルギン酸リアーゼに関する特性評価
Characterization of the novel alginate lyase derived from *Cobetia* sp.
○藤瀬 麻紗子[1]、八木 寿梓[2]、鈴木 宏和[1]、大城 隆[1] ([1]鳥取大院・工、[2]鳥取大・工・GSC)
○Asako FUJISE[1], Hisashi YAGI[2], Hirokazu SUZUKI[1], Takashi OHSHIRO[1] ([1]Tottori Univ., [2]Tottori Univ. GSC)

【目的】第 3 世代バイオマスエネルギーの開発が進められており、バイオマス原料の一つとして海藻が注目されている。海藻表面のヌメリ成分の一つで粘質多糖類であるアルギン酸は、海藻成分中の 10~50%を占めている。アルギン酸を単糖類まで糖化することが可能となればバイオマスとしての利用が期待できる。本研究ではアルギン酸分解酵素を産生する菌株をさまざまな海藻を分離源としてスクリーニングし、菌の培養方法の最適化後、得られたアルギン酸分解酵素の諸性質について検討した。
【方法】アルギン酸分解酵素を産生する菌株のスクリーニングは、アルギン酸を単一炭素源とする培地を用いて集積培養を行うことで単一コロニー化した。得られた菌株は、20℃または 30℃で 180 rpm、24 時間培養した。アルギン酸分解酵素の酵素活性（至適温度等）は、アルギン酸ナトリウムを基質とし、アルギン酸が分解されたことによって生じる分解産物の炭素－炭素二重結合の増加を、232 nm 吸光度の経時変化を測定して求めた。さらに、アルギン酸分解酵素によるアルギン酸の低分子化は、ゲルろ過クロマトグラフィーおよび液体クロマトグラフ質量分析（LC/MASS）から確認した。分解酵素は、超音波破砕によって無細胞抽出液を調製し、90℃、5 分の熱処理後、陰イオン交換カラム、ゲルろ過カラムの各種カラムクロマトグラフィーを組み合わせて精製した。
【結果･考察】鳥取県の海岸で採集した褐藻類ウミウチワよりアルギン酸分解菌株を単離し、16S rRNA 系統解析から *Cobetia* sp. と同定した。単離した菌株を *Cobetia* sp. NAP1 と命名し，以降の実験に使用した。本菌株は NaCl を 0～12.5%含有する培地で生育でき、菌体収量は NaCl 濃度 6%、24 時間で最大を示し、48 時間後には溶菌が見られた。本菌株はグルコース最少培地でも生育できたが、酵素によるアルギン酸の分解活性が見られなかったことから、本酵素は恒常的に発現しない誘導型酵素であることがわかった。本酵素を用いてアルギン酸の低分子化反応を行い、その分解産物を LC/MASS で調べたところ、単糖にまで分解されていることが確認された。その活性至適温度は 37℃であった。無細胞抽出液から精製した酵素は、MALDI-TOF MASS から分子量 35.4 kDa、*N*末端アミノ酸配列解析から NDTPVGETFDLS の配列を有していた。本アミノ酸配列の相同配列を含むアルギン酸リアーゼは見出されず，精製酵素は新規のアルギン酸分解酵素である可能性が示唆された。また、基質特異性等を含めたさらなる詳細な本酵素の諸性質に関して現在検討中である。

alginate, lyase, algae

講演番号：2E32a05
講演日時、会場：3 月 27 日 09:44～ E 校舎 32 会場

Shewanella sp. 由来アルギン酸リアーゼに関する特性評価
Characterization of the novel alginate lyase derived from *Shewanella* sp.
○八木 寿梓[1]、藤瀬 麻紗子[2]、森川 祐未[3]、鈴木 宏和[2]、大城 隆[2] ([1]鳥取大・工・GSC、[2]鳥取大院・工、[3]鳥取大・工)
○Hisashi YAGI[1], Asako FUJISE[2], Yumi MORIKAWA[3], Hirokazu SUZUKI[2], Takashi OHSHIRO[2] ([1]GSC., Tottori Univ., [2]Grad. Sch. Eng., Tottori Univ., [3]Fac. Eng., Tottori Univ.)

【目的】アルギン酸は、藻類の細胞間粘質多糖成分の一つとして知られており、特に褐藻類は乾燥重量の約 30%を占める。海藻由来のアルギン酸はβ-D-マンヌロン酸とα-L-グルロン酸の 2 種のウロン酸から構成されているが、その構成は海藻の種類や部位等で異なる。褐藻類を原料としたアルギン酸ナトリウムは、食品、繊維、医薬や化粧品等の分野に広く利用されている。他方、アルギン酸を産生する微生物も知られており、バイオフィルムの構成要素の一つとして菌体外に産生し、ヒト肺嚢胞繊維症の原因となっている。食資源である海藻を除いても、豊富に存在するアルギン酸はバイオマスとしての利用が期待されている。バイオマスとして利用するためには、単糖類まで速やかに糖化することが必要であり、そのような有用な酵素が見つかれば医薬品開発への展開も期待できる。本研究は、海水からアルギン酸分解酵素を産生する菌株をスクリーニングし、分解酵素の諸性質について検討した。
【方法】アルギン酸ナトリウムを単一炭素源とする培地を用いて、アルギン酸分解酵素を有する菌株のスクリーニングを行った。単一コロニー化した菌株は、16S rRNA 系統解析から種の同定を行った。また、培養至適温度を調べるために、20°C、25°C、30°C、37°C で培養を行った。アルギン酸分解酵素の酵素活性は、アルギン酸ナトリウムを基質とし、アルギン酸ナトリウムの分解によって生じる分解産物の二重結合の増加を、232 nm の吸光度の経時変化測定から求めた。
【結果・考察】鳥取県の海岸で採集した海水を用いて、集積培養を行い、アルギン酸分解菌株を単離した。16S rRNA 系統解析から通性嫌気性グラム陰性桿菌である *Shewanella* sp.と同定し、*Shewanella* sp. YA1 とした。本菌株の培養至適温度を調べた結果、20°C と 25°C での生育速度は同じで、生育は約 30 時間で最大に達した。30°C 培養での生育は 24 時間で最大に達したが、37°C で菌の生育は見られなかった。本菌株はグルコース最少培地でも生育できたが、アルギン酸分解活性は見られなかったことから、本酵素は誘導的に産生されることがわかった。各温度で培養した菌体から無細胞抽出液を調製し，アルギン酸分解活性を調べたところ、20°C 培養菌体において最も比活性が高かった。その反応至適温度は約 47°C で，当研究室がすでに発見している *Cobetia* sp.由来のアルギン酸リアーゼとは至適温度が異なっていた。興味深いことに、培養液上清もアルギン酸分解活性を示し、その至適温度は約 37°C であったことから、本菌株は菌体内外に異なるアルギン酸分解酵素を産生していることが示唆された。まず、菌体内のアルギン酸分解酵素に焦点をあて、詳細な本酵素の諸性質に関して現在検討中である。

Alginate, Lyase, Algae

講演番号：2E32a06
講演日時、会場：3 月 27 日 10:05～ E 校舎 32 会場

ulvan 分解関連遺伝子のクローニングと機能解析

Cloning and characterization of the genes involved in ulvan degradation

○高橋 亮[1]、大西 浩平[2] ([1]高知大院農、[2]高知大総研セ)
○Ryo TAKAHASHI[1], Kohei OHNISHI[2] ([1]Kochi Univ., [2]Science Research Center, Kochi Univ.)

【背景】近年，日本を含む世界各地の沿岸部において，アオサ属（*Ulva* sp.）に属する緑藻類が異常増殖して堆積・腐敗する「緑潮（グリーンタイド)」が多発しており，新たな環境問題となっている。ulvan はアオサ属の細胞壁間に見出される硫酸化多糖の総称であり，アオサ乾燥重量の 8～29%を占める。それらの主鎖は，主に 3 位が硫酸化された L-ラムノースにグルクロン酸，イズロン酸，キシロースのいずれかが結合した二糖単位の繰り返しによって構成される。ulvan を分解し，これら単糖を得ることができれば，酵母等によるバイオ燃料生産の糖源として用いることができると考えられる。我々はこれまでに, ulvan を唯一の炭素源として生育可能な海洋性細菌 *Glaciecola* sp.を単離しており，本細菌が培地中に分泌する ulvan リアーゼ(UllA)を同定している．本研究では *ullA* 遺伝子とその近傍に位置する ulvan 分解関連遺伝子のクローニングおよび遺伝子産物の機能解析を行った．
【結果】*Glaciecola* sp.の培養上清より精製した UllA の分子質量は, SDS-PAGE 上で 60 kDa であった．一方, その遺伝子は 1009 残基のアミノ酸配列をコードしており, 計算上の分子質量は 112.7 kDa であった．精製した UllA の N 末端アミノ酸配列は，推定アミノ酸配列から予測されるシグナルペプチド切断部位と一致したため，UllA は培地中への分泌前後に C 末端領域の切断を受けている可能性が示唆された． *ullA* 遺伝子を pET ベクターにクローニングし，大腸菌内で発現させたところ，全長を発現させた場合には低い ulvan 分解活性しか示さなかったのに対し，C 末端領域を削除して発現させた場合には，はるかに高い活性を示した．このことから，C 末端領域の役割は定かではないものの，この領域の切断は UllA の触媒能の活性化に必須であると推測された. 精製された C 末端領域削除 UllA を用いて ulvan 分解活性の至適条件を求めたところ, 至適 pH と至適温度はそれぞれ 9.0 と 35 ℃であり，500 mM の NaCl を反応液に添加した場合に最も高い活性が得られた．また，ゲル濾過クロマトグラフィーの溶出体積より, 本酵素は溶液中で二量体として存在していると推測された. UllA による ulvan 分解産物を HPLC によって経時的に分析すると，最終的に ulvan を二糖にまで分解可能なことも判明した．さらに，リアーゼによって生じたこの二糖を単糖へと分解する酵素の候補として，*ullA* 遺伝子近傍に見出された glycoside hydrolase family 88 遺伝子をクローニングし，UllA による ulvan 分解産物と反応させたところ, ulvan 四糖と二糖の両方に対する活性を確認できた. ここからさらに L-ラムノースを得るためには 3 位に結合した硫酸基を取り除く必要があるが，その反応を触媒する候補として複数のスルファターゼ遺伝子を見出しており，現在それらのクローニングと解析を進めている．

ulvan, polysaccharide, green algae

講演番号：2E32a07
講演日時、会場：3 月 27 日 10:16～ E 校舎 32 会場

Characterization of the recombinant cellobiose 2-epimerase from *Rhodothermus marinus* and site-directed mutagenesis of the catalytic residues

○Nongluck Jaito[1], Wataru Saburi[2], Hirohiko Muto[3], Takaaki Fujiwara[4], Min Yao[4], Haruhide Mori[2] ([1]Graduate School of Agriculture, Hokkaido Univ., [2]Research Faculty of Agriculture, Hokkaido Univ., [3]School of Agriculture, Hokkaido Univ., [4]Research Faculty of Advanced Life Science, Hokkaido Univ.)

Cellobiose 2-epimerase (CE, EC 5.1.3.11) catalyzes the reversible epimerization between D-mannose and D-glucose residues at the reducing end of β-1,4-linked disaccharides, such as mannobiose, cellobiose and lactose. Recently, the crystal structure of CE from *Rhodothermus marinus* (RmCE) was determined. The overall fold of the enzyme is $(\alpha/\alpha)_6$ barrel which is similar to *N*-acetyl-D-glucosamine 2-epimerase (AGE) and aldose-ketose isomerase (YihS), but the substrate specificity is essentially different. AGE and YihS act on only monosaccharide, whereas CE epimerizes disaccharides with much higher preference than monosaccharide. At the present study, we focused on the disaccharides preference of CE, and amino acid residues involved in this characteristic were investigated.

The solved RmCE structure suggested that two amino acids, Asp188 and Trp385, were involved in the substrate binding at the non-reducing glycosyl residue through hydrogen bound with 6OH group and aromatic stacking interaction, respectively. Therefore, D188A and W385A were prepared and their enzymatic properties were compared with those of the wild-type enzyme. Wild-type RmCE showed vary low activity on monosaccharide mannose with 14-29-fold lower *k*cat (3.53 s^{-1}), 28-127-fold higher *K*m (668 mM)and the resulting 590-3700-fold lower *k*cat/*K*m (0.00528 $s^{-1}mM^{-1}$), compared with disaccharide substrates, β-(1→4)-mannobiose, cellobiose, and lactose. D188 showed similar *k*cat/*K*m values (0.00465 $s^{-1}mM^{-1}$) for mannose, but activities toward disaccharides were reduced with 3.7-15-fold increased in *K*m and 4.2-8.4-fold decreased in *k*cat/*K*m. The replacement of Trp385 by Ala caused drastic reduction of *k*cat/*K*m for disaccharides (528-1190-fold) which this value was considered from notable increasing of *K*m. Whereas, the *K*m for mannose was 1.8-fold higher, and *k*cat/*K*m was 18-fold lower. Therefore, Asp188 and Trp385 were considered to contribute mainly to binding to the disaccharide substrates, and Asp188 and especial Trp385 are involved in the Michaelis complex formation at the non-reducing end glycosyl residue.

cellobiose 2-epimerase, catalytic residues, disaccharides

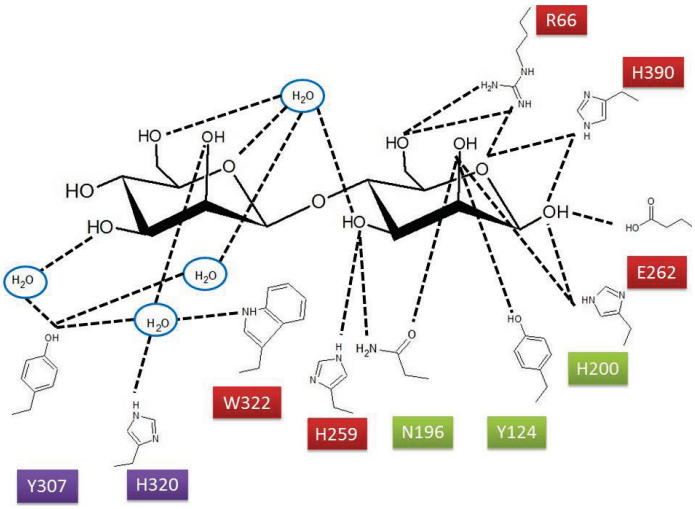
講演番号：2E32a08
講演日時、会場：3 月 27 日 10:27～ E 校舎 32 会場

Rhodothermus marinus JCM9785 由来セロビオース 2 - エピメラーゼの基質結合部位周辺アミノ酸残基の機能解析

Functional analysis of amino acid residues around substrate-binding site of cellobiose 2-epimerase from *Rhodothermus marinus* JCM9785

○武藤 洋彦[1]、佐分利 亘[2]、藤原 孝彰[3]、姚 閔[3]、森 春英[2]（[1]北海道大・農、[2]北海道大院・農、[3]北海道大院・先端生命）
○Hirohiko Muto[1], Wataru Saburi[2], Takaaki Fujiwara[3], Min Yao[3], Haruhide Mori[2] ([1]School of Agriculture, Hokkaido Univ., [2]Research Faculty of Agriculture, Hokkaido Univ., [3]Research Faculty of Advanced Life Science, Hokkaido Univ.)

[目的]セロビオース 2-エピメラーゼ(EC 5.1.3.11; CE)は、β-(1→4)-グリコシド結合した二糖の還元末端グルコース残基をマンノース残基に異性化する酵素である。近年、好熱性細菌 *Rhodothermus marinus* JCM9785 由来 CE(RmCE)の酵素基質複合体の結晶構造が明らかとなった(Fig.1)[1)]。RmCE は、*N*-アセチル-D-グルコサミンを *N*-アセチル-D-マンノサミンに異性化する *N*-アセチルグルコサミン 2-エピメラーゼ(AGE)や、グルコースをマンノースやフルクトースに異性化するアルドースケトースイソメラーゼ(AKI)と類似した構造を持つ。$(\alpha/\alpha)_6$ バレルの全体構造はよく一致し、基質結合部位周辺のアミノ酸残基も、2 - OH 周辺(CE では還元末端糖残基の 2 - OH)では CE、AKI と AGE の間で異なるが、その他の多くは良く保存されている。本研究では、RmCE の基質結合部位周辺のアミノ酸残基の活性への寄与を明らかにすることを目的とした。
[方法]RmCE の還元末端側糖残基と相互作用するアミノ酸残基 R66、Y124、N196、H200、H259、E262、Y307、H320、W322、及び H390 をアラニンに置換した変異酵素をそれぞれ作製し、酵素化学的諸性質を解析した。
[結果と考察] Y307 と H320 では変異による諸性質の変化は認められず、これらの活性への寄与は小さいと考えられた。構造から一般酸塩基触媒残基として推定される H259 と H390 の変異酵素では活性が野生型の 0.01%以下となり、顕著な低下を示した。R66A、Y124A、N196A、H200A、W322A では 10 mM β-(1→4)-マンノビオースに対する k_{cat} が野生型酵素の約 0.1%に低下し、K_m が 6 - 12 倍に上昇した。特に N196A は最も高い K_m(野生型の約 12 倍)を示した。基質の還元末端側糖残基の 1 - OH と相互作用する E262 の変異酵素では、k_{cat} が 0.1%に低下したが K_m の変化は認められなかった。野生型酵素や他の変異酵素では pH7.2 で最大活性を示したのに対し、H200A は pH6.0 で最大活性を示した。



(Fig. 1. RmCE の基質と相互作用するアミノ酸残基)

1) T. Fujiwara et al., *J. Biol. Chem.* (2014)

cellobioce 2-epimerase, substrate-binding site, site-directed mutagenesis

講演番号：2E32a09
講演日時、会場：3 月 27 日 10:38～ E 校舎 32 会場

基質結合タンパク質依存的 ABC トランスポーターによる多糖認識

Polysaccharide recognition by bacterial solute-binding protein dependent ABC transporter

○丸山 如江[1]、立石 彬[1]、金子 あい[2]、三上 文三[2]、橋本 渉[2]、村田 幸作[1] ([1]摂南大理工、[2]京大院農)
○ Yukie MARUYAMA[1], Akira TATEISHI[1], Ai KANEKO[2], Bunzo MIKAMI[2], Wataru HASHIMOTO[2], Kousaku MURATA[1] ([1]Setsunan Univ., [2]Kyoto Univ.)

【背景と目的】アルギン酸は 2 種類のウロン酸（β-D-マンヌロン酸、α-L-グルロン酸）からなる直鎖型多糖であり、近年褐藻由来アルギン酸はバイオ燃料の原料として注目されている。アルギン酸資化性のグラム陰性 *Sphingomonas* 属細菌 A1 株は、ペリプラズム局在性の基質結合タンパク質（AlgQ1 あるいは AlgQ2：配列同一性 75%）を介して、内膜の ABC トランスポーター（AlgM1M2SS：4 量体）によりアルギン酸を細胞質内に取り込む。AlgM1M2 が内膜を貫通するタンパク質であり、AlgSS が ATPase 活性を示す。取り込まれたアルギン酸は細胞質内で分解、代謝される。A1 株のアルギン酸取込み機構を明らかにすることを目指し、これまでに、アルギン酸輸送 ABC トランスポーターと AlgQ2 複合体（AlgM1M2SS/AlgQ2）の結晶構造を明らかにした。AlgQ2 の基質結合クレフトの約半分が膜貫通ドメイン AlgM2 に覆われており、その相互作用の結果、約 30 Åのトンネル構造が形成され、その奥にアルギン酸オリゴ糖が結合している。このような構造的特徴は、既知の低分子輸送型 ABC トランスポーター/基質結合タンパク質の複合体構造では見られない。そこで、「多糖を捕捉した結合タンパク質がトランスポーターへと基質を受け渡すために、トンネル構造が必要である」との仮説を検証するため、種々の鎖長のアルギン酸オリゴ糖を用いて、結合タンパク質あるいは複合体との糖結合様式を解析した。
【方法と結果】高分子アルギン酸をリアーゼ酵素で低分子化し、分解物から 7 糖を精製した。また、AlgQ1 を組換え大腸菌から精製した。アルギン酸 7 糖存在下で AlgQ1 の結晶を調製し、分解能 1.7Å で結晶構造を決定した。AlgQ1 の N ドメインと C ドメインの間に形成されたクレフトに、マンヌロン酸 5 残基に相当する電子密度が認められた。このことから、AlgQ1 はアルギン酸 7 糖のうち、非還元末端糖から 5 糖を強く認識するサブサイト構造をもつことが明らかになった。次いで、AlgQ1、AlgQ2（PDB ID、1J1N）、AlgM1M2SS/AlgQ2（PDB ID、4TQU）の各結晶構造に対する種々の鎖長のアルギン酸オリゴ糖の結合様式を、ドッキングシミュレーションプログラム Autodock を用いて解析した。アルギン酸 16 糖と AlgM1M2SS/AlgQ2 との結合様式では、非還元末端側の 6 糖はトンネル構造内に位置し、7 糖目以降は、AlgQ2 と膜貫通ドメイン AlgM1 の間に形成されたクレフトに構造自由度の高い状態で存在していた。【考察】基質結合タンパク質と膜貫通ドメインとの相互作用によって生じるアルギン酸輸送系に特徴的な基質結合トンネルは、基質結合タンパク質から ABC トランスポーターへの多糖受け渡しのために重要な構造と考えられる。

Sphingomonas, alginate, ABC transporter

講演番号：2E32a10
講演日時、会場：3 月 27 日 10:49～ E 校舎 32 会場

Paenibacillus 属細菌由来細胞表層キチナーゼ ChiW の組換えタンパク質発現と細胞表層結合ドメインの応用

Expression of *Paenibacillus* cell-surface chitinase ChiW in *Brevibacillus* and the applications with its SLH domain

○伊藤 貴文[1]、日ビ 隆雄[1]、横内 佳奈[1]、高宮 杏奈[1]、藤井 豊[2]、武藤 明[3]、木元 久[1]([1]福井県大・生物資源、[2]福井大・医、[3]福井工大・工)
○Takafumi ITOH[1], Takao HIBI[1], Kana YOKOUCHI[1], Anna TAKAMIYA[1], Yutaka FUJII[2], Akira TAKETO[3], Hisashi KIMOTO[1] ([1]Fukui Pref. Univ., [2]Univ. of Fukui, [3]Fukui Univ. of Tech.)

【目的】*Paenibacillus* sp. str. FPU-7 はキチン分解能力に優れた土壌細菌である。本細菌は複数種のキチナーゼ群を菌体外に分泌するが、キチナーゼ ChiW も同時に細胞表層に提示している (1)。ChiW は細胞表層でキチンを分解していることが示唆される。ChiW には細胞表層に結合するためのドメイン (Surface layer homology domain, SLH, 31-197) と 2 つの触媒ドメイン (Glycoside hydrolase family 18, GH-18, 464-1418) が存在した。我々は、本酵素の細胞表層でのキチン分解の分子機構を明らかにすることによって、不溶性多糖の効率的な分解方法の開発を目指している。そこで、本酵素の組換えタンパク質の発現を検討した。SLH ドメインを欠失させた ChiW は大腸菌によって発現したが、表層に発現させることは困難であった (2)。今回、タカラバイオ株式会社製ブレビバチルス分泌発現システムを利用することにより、SLH ドメインを含む酵素の発現に成功したので報告する。【方法】*Brevibacillus* His タグ融合発現ベクター (pNC-HisF) に *P.* FPU-7 株由来 *chiW* 遺伝子を挿入した発現プラスミドを作製した。このプラスミドを用いて、*B.choshinensis* SP3 を形質転換した。ChiW の発現は、抗 His タグ抗体を利用したウエスタンブロッティング及び活性測定にて確認した。また、*chiW* 遺伝子のキチナーゼ触媒ドメイン部位を *Montastrea cavernosa* 由来緑色蛍光タンパク質 (GFP) あるいは枯草菌由来 α-アミラーゼ遺伝子に置換した発現プラスミドを作製し、ChiW と同様の解析を行った。【結果】細胞抽出成分だけでなく上清を除いた菌体懸濁液にもキチナーゼ活性が認められたため、ChiW は SP3 株細胞表層に発現していることが示唆された。その活性は約 0.007 U/mg であり、大腸菌組換え精製 ChiW (SLH ドメイン欠失) の値 (0.7 U/mg) と比較すると、組換え SP3 株発現タンパク質中、ChiW は 1%程度含まれることが分かった。また、キチナーゼ触媒ドメインを GFP あるいは α-アミラーゼに置換し SLH ドメインと連結したタンパク質もウエスタンブロッティングあるいは活性測定により、その発現が認められた。

(1) Itoh, T. Hibi, T., Fujii, Y., Sugimoto, I., Fujiwara, A., Suzuki, F., Iwasaki, Y., Kim, J-K., Taketo, A. and Kimoto, H. ***Appl. Environ. Microbiol.,*** 79, 7482–7490, 2013.
(2) Itoh, T., Sugimoto, I., Hibi, T., Suzuki, F., Matsuo, K., Fujii, Y., Taketo, A. and Kimoto, H. ***Biosci. Biotechnol. Biochem.*** 78, 624–634, 2014.

Chitinase, Surface layer homology domain, Paenibacillus

講演番号：2E32a11
講演日時、会場：3 月 27 日 11:10～ E 校舎 32 会場

グライコシンターゼ反応を利用したシロイヌナズナ由来 β-グルコシダーゼ Bglu15 のアグリコン特異性の解析

Analysis of the aglycone specificity of ß-glucosidase Bglu15 from *Arabidopsis thaliana* using glycosynthase reaction

○菅原 好美[1]、佐分利 亘[1]、谷口 沙希[1]、今井 亮三[1,2]、森 春英[1] ([1]北海道大院農、[2]北海道農業研究センター)
○Yoshimi SUGAHARA[1], Wataru SABURI[1], Saki TANIGUTI[1], Ryozo IMAI[1,2], Haruhide MORI[1] ([1]Hokkaido Univ., [2]Hokkaido Agricultural Research Center)

【目的】

β-グルコシダーゼ（BGLU）は、β-グリコシド結合を加水分解するアノマー保持型糖質加水分解酵素である。アミノ酸配列に基づく分類により glycoside hydrolase family 1 に属する BGLU は、シロイヌナズナには 48 種類存在し、植物ホルモンの活性化や生理活性物質の代謝および生合成に関与する例が報告されている。シロイヌナズナの BGLU のアイソザイムのうち Bglu15 はケルセチン 3-*O*-β-D-グルコシド-7-*O*-α-L-ラムノシドに対する加水分解活性を示すことが知られているが、β1-3 結合からなるラミナリビオースに対して高い活性を示す。グルコシドおよびフコシドに対しても加水分解活性を示すが、アグリコン特異性の詳細は明らかとなっていない。BGLU の求核触媒残基をグリシンなどに置換した変異酵素（グライコシンターゼ）は、α-グルコシルフルオリド（α-GF）を糖供与体として様々な糖受容体にグルコシル基を転移することが知られている。本研究では、Bglu15 をグライコシンターゼ化し様々な糖受容体への転移反応を解析することで＋1 サブサイトの特異性を検討した。

【方法・結果】

Bglu15 の求核触媒残基と推定される E415 を G に置換した。Bglu15 変異酵素の比活性は、4.59×10^{-3} U/mg であり、野生型酵素の 0.11%であった。この Bglu15 変異酵素を 50 mM α-GF と様々な 20 mM *p*-ニトロフェニル（*p*NP）グリコシドに作用させた。*p*NP β-D-マンノシドに対してはグルコシル基の転移が見られなかったが、*p*NP β-D-グルコシド（*p*NPGlc）、*p*NP β-D-ガラクトシド（*p*NPGal）、*p*NP β-D-フコシド（*p*NPFuc）および *p*NP β-D-キシロシド（*p*NPXyl）に対するグルコシル基の転移が見られた。受容体に基づく収率は、*p*NPGlc への反応では 98.2%、*p*NPGal への反応では 58.1%、*p*NPFuc への反応では 20.5%、*p*NPXyl への反応では 99.5%であった。得られた生成物は、*p*NPGlc では 1~4 残基、*p*NPGal では 1~3 残基、*p*NPFuc では 1～2 残基、*p*NPXyl では 1~5 残基、受容体へグルコシル基が転移していた。グルコシル基が 1 残基転移した生成物を構造解析したところ、すべて β1-3 結合で結合していた。それぞれの糖受容体にグルコシル基が 1 残基転移した生成物に対する野生型酵素の反応を解析した。k_{cat}/K_m は、*p*NP 3-*O*-β-Glc-β-Xyl に対して 3720 $s^{-1}mM^{-1}$、*p*NP 3-*O*-β-Glc-β-Gal に対して 1660 $s^{-1}mM^{-1}$、*p*NP 3-*O*-β-Glc-β-Fuc に対して 1470 $s^{-1}mM^{-1}$、*p*NP 3-*O*-β-Glc-β-Glc に対して 168 $s^{-1}mM^{-1}$ であった。野生型酵素の *p*NP 3-*O*-β-Glc-β-Glc に対する K_m は、最も高い k_{cat}/K_m を示した *p*NP 3-*O*-β-Glc-β-Xyl に対する K_m の 33.7 倍であり、K_m に大きな差が見られた。

glycosynthase, *Arabidopsis thaliana*, ß -glucosidase

講演番号：2E32a12
講演日時、会場：3 月 27 日 11:21～ E 校舎 32 会場

メタゲノム由来β-グルコシダーゼ Td2F2 の生成物阻害耐性メカニズムの解析
Analysis of the machinery for glucose-resistance of metagenomic beta-glucosidase Td2F2
○松沢 智彦[1]、内山 拓[2]、城 俊徳[2]、Jenny Manninen[2]、伏信 進矢[2]、矢追 克郎[1] ([1]産総研 生物プロセス、[2]東大院農)
○ Tomohiko Matsuzawa[1], Taku Uchiyama[2], Shuntoku Jyou[2], Manninen Jenny[2], Shinya Fushinobu[2], Katsurou Yaoi[1] ([1]AIST, [2]Tokyo Univ.)

＜目的＞
多くのβ-グルコシダーゼはその活性が反応生成物であるグルコースによって阻害を受けること（生成物阻害）が知られている。メタゲノム由来のβ-グルコシダーゼ Td2F2 は高い糖転移活性を有しており、グルコース存在下において活性が著しく上昇するユニークな酵素である。本研究ではランダム変異導入と結晶構造解析を駆使して Td2F2 が高い生成物阻害耐性を有するメカニズムの解明を試みた。
＜方法・結果＞
ランダム変異を導入した Td2F2 から生成物阻害耐性の低下した変異酵素をスクリーニングし、野生型酵素と比較してグルコース存在下における活性が低下した変異酵素 Td2F2-2C2 を取得した。この Td2F2-2C2 はグルコース非存在下では野生型酵素と同程度の活性を有しているが、500 mM グルコース存在下では野生型酵素の半分程度まで活性が低下していた。シーケンス解析と結晶構造解析の結果、Td2F2-2C2 では＋１サブサイト付近のアスパラギン残基がアスパラギン酸残基に変化していることが明らかになった。本アスパラギン残基へ Saturation mutagenesis を行った結果、グリシン残基やグルタミン残基に置換した変異体において生成物阻害耐性が顕著に低下し、グルコース存在下において活性が低下していた。また、これらの変異体では Td2F2 の特徴である糖転移活性が低下していることが明らかになった。以上の結果から、Td2F2 の＋１サブサイト周辺の構造が Td2F2 の糖転移活性及び生成物阻害耐性に重要であることが示唆された。

glucosidase, metagenome, biomass

講演番号：2E32a13
講演日時、会場：3 月 27 日 11:32～ E 校舎 32 会場

Clostridium thermocellum 由来の糖質加水分解酵素 GH5 触媒モジュールの基質結合特性
Substrate binding specificities of glycoside hydrolase family 5 catalytic modules from *Clostridium thermocellum*

並河 有紀[1]、○苅田 修一[1]、須藤 真子[2]、市川 俊輔[1]([1]三重大地域イノベ、[2]三重大生資)
Yuki Namikawa[1], ○Shuichi Karita[1], Mako Sudo[2], Shunsuke Ichikawa[1] ([1]Mie Uinv., [2]Mie Univ.)

【目的】*Clostridium thermocellum* は、好熱嫌気性セルロース分解細菌で、効率よくセルロースを分解する微生物のひとつとして知られており、その分解酵素群に、糖質加水分解酵素ファミリー５（GH5）に属する複数のセルラーゼを発現している。酵素において基質との結合は、反応の重要なイベントである。本報告では、複数ある GH5 酵素の触媒の基質結合特性に着目し、なぜ同一ファミリーの異なる酵素が存在するのかという合理性を検証するために実験を行った。
【方法】*C. thermocellum* の GH５酵素の触媒モジュールをコードする遺伝子を、それぞれ pQE30 にクローニングし、大腸菌で発現後、発現したタンパク質を His-tag を用いて精製を行った。結合特性を評価するために、プロトンドナーであるグルタミン酸をグルタミンに変異置換した触媒モジュールも同様に作成し、発現精製した。これらの酵素タンパク質を使用し、酸膨潤セルロース（ASC)、ボールミルセルロース（BMC）などの不溶性基質への結合量をデプリーション解析法により測定した。また、可溶性基質に対しての結合特性を、セロヘキサオースを基質として、等温滴定熱量計を用いた解析により、熱力学的パラメータを算出した。
【結果】デプレーション解析の結合試験の結果、変異体 Cel5A（E180Q）と Cel5E（E138Q）を比較すると、Cel5A は、Cel5E に比べ多く ASC に結合したが、一方で、Cel5E は、Cel5A よりも多く BMC に結合した。このように、同様な GH5 においても、不溶性基質への結合する量が変わっていることがわかった。また、触媒単独での基質への結合定数は、糖質結合モジュールの結合定数に匹敵するものであり、糖質結合モジュールだけが固体基質表面に酵素を標的化しているのではない可能性を示した。また、セロヘキサオースと触媒モジュールの相互作用を等温滴定熱量計で測定したところ、Cel5A が、Cel5E や Cel5B よりも高い結合定数を示した。これらのことから、同一ファミリーGH５においても、不溶性基質や可溶性基質に対する結合特性が異なっていることが明らかになった。これらの基質の結合特性の違いが、酵素活性にどのように影響するかについても報告する。

glycoside hydrolase, catalytic module, substrate biniding

講演番号：2E32a14
講演日時、会場：3 月 27 日 11:43～ E 校舎 32 会場

キチンオリゴ糖脱アセチル化酵素の活性ドメインの機能解析

Function of the active domain of chitin oligosaccharide deacetylase

○神澤 沙耶[1]、平野 貴子[2]、池嶋 聖史[2]、坂木 祐太[1]、田代 充[3]、袴田 航[1,2]、西尾 俊幸[1,2] ([1]日大院生資科・生物資源利用、[2]日大生資科・生命化、[3]明星大院理工科・化学)
○ Saya KANZAWA[1], Takako HIRANO[2], Masafumi IKEJIMA[2], Yuta SAKAKI[1], Mitsuru TASHIRO[3], Wataru HAKAMATA[1,2], Toshiyuki NISHO[1,2] ([1]Graduate school of Bioresource Sciences, Nihon univ., [2]Dept. Chem. and Life Sci., Bioresource Sciences, Nihon Univ., [3]Graduate school of Science and Engineering, Meisei Univ.)

【目的】キチンオリゴ糖脱アセチル化酵素（COD）は、キチン分解物である$(GlcNAc)_2$ の還元性末端糖を脱アセチル化し、β-*N*-acetyl-D-glucosaminyl-(1,4)-D-glucosamine（GlcNAc-GlcN）を生成する。本ヘテロ 2 糖は COD 生産性 Vibrio 属細菌のキチン利用システムにおけるシグナル分子としての役割を有することから、COD は本菌にとって重要な酵素であると言える[1, 2]。これまでに当研究室では、*Vibrio parahaemolyticus* KN1699 由来 COD の立体構造を解明し（PDB ID: 3WX7）、本酵素が Polysaccharide deacetylase domain （PDD）と 2 つの Carbohydrate binding domain（CBD）から成ることを明らかにした。さらに我々は、CBD のキチン結合能を明らかにした[3]。一方、PDD には酸塩基触媒残基と推定されるアミノ酸残基（H291, D35）および活性に重要な役割を担う金属イオン（Zn^{2+}）とそれに配位する 3 つのアミノ酸残基（D36, H93, H97）が存在していた。本研究では、①CBD が PDD の活性に及ぼす影響を調べ、さらに、②活性に関与するアミノ酸残基を特定した。
【方法および結果】①*V. parahaemolyticus* KN1699 由来リコンビナント COD（rCOD）[4]とその CBD 欠損体を作製し、活性の違いを調べた。まず、GlcNAc とそのホモオリゴ糖に対する基質特異性を調べた結果、CBD の欠損による特異性の変化は見られなかった。次に $(GlcNAc)_2$ を基質として Kinetic study を行った。Lineweaver-Burk plot から V_{max}, K_m, k_{cat} を求めた結果、CBD の欠損により K_m の値は少し上昇したが、V_{max} および K_{cat} に大きな違いは見られなかった。従って、CBD は脱アセチル化にはあまり影響を与えず、PDD は独立して活性ドメインとして機能することが分かった[5]。②PDD の推定酸塩基触媒残基と亜鉛に配位するアミノ酸残基をそれぞれ Ala に置換した変異体（H291A, D35A および D36A, H93A, H97A）を作製した。まず rCOD 遺伝子を鋳型として、PCR により 5 種類の変異体遺伝子を増幅し大腸菌発現系を構築し、rCOD と同様に発現・精製を行なった。rCOD とそれぞれの変異体を比較した結果、全ての変異体の比活性は rCOD に比べて著しく低下した。また、D36A, H93A, H97A については亜鉛の存在を確認するために ESI-TOF MS を行なった。その結果、各変異体で得られた分子イオンピークは全て rCOD と一致し、亜鉛の存在が示唆された。以上の結果より、H291 と D35 は触媒残基として機能し、D36, H93, H97 は全てが亜鉛に配位することが活性に重要であると考えられた。

1) T. Hirano. *et al., Glycobiology*, **19**, 1046-1053 (2009)　2) T. Hirano. *et al., Lett. Appl. Microbiol*., **53**, 161-166 (2011)
3)坂木ら、日本農芸化学会 2013 年度大会、講演番号：3C32p13　4) K. Kadokura. *et al., Biotechnol. Lett.,* **29**, 1209-1215 (2007)　5) T. Hirano. *et al*., *FEBS Lett*., in press.

chitin oligosaccharide deacetylase, domain function, mutant protein

講演番号：2E32a15
講演日時、会場：3 月 27 日 11:54～ E 校舎 32 会場

Bacillus subtilis 由来 levansucrase による sucrose 類似体の合成および受容体特異性に関する研究
Synthesis of sucrose analogues and analysis of acceptor substrate specificity of *Bacillus subtilis* levansucrase
○渡辺 基志、木村 淳夫、奥山 正幸（北大院農）
○Motoshi WATANABE, Atsuo KIMURA, Masayuki OKUYAMA (Hokkaido Univ.)

オリゴ糖は 2～9 分子の単糖がグリコシル結合でつながった糖質である. 構成する単糖の種類および結合様式の違いなどによりオリゴ糖の種類は膨大な数となる. そのため, 未だ人工的な合成に至っていないオリゴ糖は数多く存在する. また, オリゴ糖の中には生理活性を持つものも存在する. 例えば galactose, glucose, fructose からなる raffinose はアトピー性皮膚炎改善作用を示す. その他にもプレバイオティクス効果を示すものなどもあり, 新規オリゴ糖および有用オリゴ糖の合成に関する研究は医療や食品産業において有益である.

一般的にオリゴ糖合成は糖質加水分解酵素によって行われ, それらの酵素が示す糖転移反応によって供与体となる糖と受容体となる糖を結合させる. この反応において, 供与体を工夫することで糖転移活性を上げることができる. 代表的な良い供与体としてフッ化糖がある. 糖に結合したフッ素が良い脱離基となることで糖転移反応が促進される. しかし, フッ化糖を用いる場合, 最終的に有毒なフッ素が遊離する. 産業的応用を考える場合, このフッ素の除去が大きな壁となる. また, フッ化糖は有機合成により作られるため, フッ化糖を用いたオリゴ糖合成は環境負荷が大きい. フッ化糖に代わる供与体の作製が求められる. グリコシド結合に高いエネルギーを有する sucrose およびその類似体が糖転移活性を促す供与体となりうると考えられる.

本研究では *Bacillus subtilis* 由来の levansucrase（SacB）を用いることで 9 種類の sucrose 類似体を合成することに成功した. sucrose を供与体とし, 様々な糖を受容体として用いることで受容体の糖に fructose が結合した sucrose 類似体を合成した. 反応試料のアルカリ熱処理および活性炭カラムにより sucrose 類似体の単離にも成功した. 本研究で得られた sucrose 類似体により新たなオリゴ糖合成経路を確立できる可能性がある。また, 速度論的解析および構造解析により SacB における各受容体の特異性を評価した. 今後の変異体作製などの研究における知見となりうる.

glycoside hydrolase, levansucrase, oligosaccharide

講演番号：2E32p02
講演日時、会場：3 月 27 日 14:11～ E 校舎 32 会場

1,2-β-オリゴグルカンホスホリラーゼを用いた直鎖状 1,2-β-グルカンの合成法の構築

Construction of linear 1,2-ß-glucan synthesis using 1,2-ß-oligoglucan phosporylase

○豊泉 大幸[1]、阿部 紘一[1]、中島 将博[1]、中井 博之[2]、北岡 本光[3]、田口 速男[1]([1]東理大院理工、[2]新潟大学院、[3]食総研)
○Hiroyuki TOYOIZUMI[1], Koichi ABE[1], Masahiro NAKAJIMA[1], Hiroyuki NAKAI[2], Motomitsu KITAOKA[3], Hayao TAGUCHI[1] ([1]Tokyo Univ. Sci., [2]Niigata Univ., [3]NARO)

【目的】ホスホリラーゼは、その厳密な基質特異性と反応の可逆性からオリゴ糖の合成に有用とされる。近年、我々は 1,2-β-グルカンに作用する新規酵素 1,2-β-オリゴグルカンホスホリラーゼ（OGP）を発見し、この酵素を用いた直鎖状 1,2-β-グルカン（LβG）の合成が可能になった。本研究では、グルコースとグルコース-1-リン酸（G1P）を出発材料とし、OGP を用いて LβG の合成を行った。さらに、この反応系を基により安価なスクロースとグルコースを出発材料とした、スクロースホスホリラーゼ（SP）と OGP を組み合わせたワンポット反応による LβG の大量調製を行った。
【方法、結果】SP と OGP は大腸菌を用いて組換え酵素を調製した。まず、グルコースと G1P を出発材料として LβG の合成を行った。0.18 M グルコース、0.75 M G1P を含む酵素反応液 50 mL に OGP を 80 μg/mL（終濃度)を加えて 8 日間反応させ、ゲル濾過クロマトグラフィーに通して LβG を回収した。回収した溶液はエバポレーターで濃縮し、等量のエタノールを加えて LβG を沈殿させた。沈殿物の凍結乾燥により平均重合度がそれぞれ 77、64、39 の精製 LβG を 1.3 g、0.9 g、0.25 g ずつ得られた。

次に、SP と OGP を組み合わせたワンポット反応による LβG の合成を行った。まず、ミニスケールの反応系を用い、反応初期における LβG 合成量を薄層クロマトグラフィー（TLC）により調べることで合成条件の検討を行った。スクロース濃度を 1 M、無機リン酸（pH 7.0）濃度を 0.1 M に、SP と OGP 濃度を 0.2 mg/ml に固定し、0.1 M から 1 M までのグルコース濃度で反応を行った。グルコース濃度 0.5 M で LβG 合成量が最大に達したことから最適グルコース濃度を 0.5 M と決定した。次に SP と OGP 濃度比率の最適化を行った。上記の濃度のスクロースと無機リン酸、0.5 M グルコース存在下で様々な濃度比率の SP と OGP を用いて反応を行った。SP 濃度を OGP の 4 分の 1 に減らしても LβG 合成量の減少が見られなかったことから SP と OGP の最適濃度比率を 1:4 と決定した。以上の結果をもとに、2 L のワンポット酵素反応を 12 日間行った。反応液中の基質、反応産物の濃度の経時変化を定量的に調べたところ、スクロースの減少に付随して LβG が増加し、その濃度は 0.8 M（グルコース濃度換算）以上となった。DEAE-セルロースの添加による反応液からの除タンパク質を行った後、反応液中の LβG 以外の糖を酵母処理により除去した。酵母処理液上清の約半分を濃縮後、等量のエタノールを加えて LβG を沈殿させ、沈殿物の凍結乾燥により 167 g の精製 LβG を得た。精製 LβG の平均重合度を NMR により調べたところ 25 であった。

liner 1,2-ß-glucan, 1,2-ß-oligoglucan phosporylase, one-pot enzymatic synthesis

講演番号：2E32p03
講演日時、会場：3 月 27 日 14:22～ E 校舎 32 会場

Listeria innocua 由来β-Glucosidase の機能解析と基質複合体の構造解析
Structural analysis of enzyme-substrate complex and characterization of ß-Glucosidase from *Listeria innocua*

○吉田 龍太[1]、中島 将博[1]、宮永 顕正[2]、中井 博之[3]、北岡 本光[4]、田口 速男[1] ([1]東理大院理工、[2]東工大、[3]新潟大、[4]農研機構・食総研)
○ Ryuta YOSHIDA[1], masahiro NAKAJIMA[1], akimasa MIYANAGA[2], hiroyuki NAKAI[3], motomitsu KITAOKA[4], hayao TAGUCHI[1] ([1]TUS, [2]Tokyo Tech, [3]Niigata Univ., [4]NARO)

【目的】*Listeria innocua* 由来の Lin1840 タンパク質は糖加水分解酵素ファミリー3 (GH3) に属する。*lin1840* 遺伝子と同一クラスター内に存在する遺伝子が 1,2-β-オリゴグルカンホスホリラーゼ (OGP) をコードすることが近年明らかになった。そのため、Lin1840 タンパク質は 1,2-β-グルカンの代謝に関与する β-グルコシダーゼ（BGL）と推測されるが、その機能と構造は未解明である。そこで、Lin1840 タンパク質の機能解析と構造解析を行った。
【方法・結果】大腸菌を用い組み換え Lin1840 タンパク質 (Lin1840r) を調製した。β 結合を有するグルコ 2 糖を基質とし、各基質に対する反応速度論量を決定した結果、触媒効率はソホロースで最も高い値 (21 s^{-1}) を示し、ラミナリビオースでも同程度の値 (8.8 s^{-1}) であった。一方で、セロビオースとゲンチオビオースの触媒効率はともにソホロースの 0.05 %未満であった。更に、鎖長特異性を調べるために 1,2-β-グルコオリゴ糖に対する反応速度論量を決定したところ、K_m 値がソホロースと比較して重合度 3 以上の基質では大きく増加し、触媒効率は重合度の増加と共に大きく低下した。次に、構造機能の相関を明らかにするために、Lin1840r の X 線結晶構造解析を行った。分解能 1.8Åにて構造決定した結果、隣接するサブユニットから伸びるループ (L568-F598) 上の Y583 と W270、R572 がサブサイト+1 を形成していることが推測された。基質認識に関与する知見を明らかにするために、求核触媒残基の変異体 D270A とソホロース、ラミナリビオースの基質複合体構造を決定した結果、これらの基質はそれぞれ half chair と skew boat 型の構造であった。どちらの基質においても、グルコシド結合の酸素原子とアノマー位炭素原子と求核触媒残基のカルボキシル基が直線的に並んでおり、求核触媒残基のアノマー位炭素原子への in-line attack が可能と考えられる。また、求核触媒残基と C1 の距離、酸塩基触媒残基とグルコシド結合間の酸素原子の距離が反応をとり得る距離にあることから、これら複合体構造がミカエリスコンプレックスであることが示唆された。また、D270A-ソホロースと GH3 酵素大麦由来 Exo I -チオセロビオースの複合体構造を重ね合わせたところ、Lin1840r の Arg572 による 4 個の水素結合によりソホロースの subsite +1 のグルコピラノース環の向きがチオセロビオースのものと大きく異なっていた。そこで、R572K 変異体のグルコ 2 糖に対する反応速度論量を決定した結果、野生型と比較して顕著なソホロースに対する K_m の増加がみられ、k_{cat} も 3 倍程度低下した。したがって、R572 による十分な数の水素結合が subsite+1 の基質認識に重要であり、且つミカエリスコンプレックスの形成にも重要と考えられた。

glucosidase, 1,2-ß-glucan, sophorose

講演番号：2E32p04
講演日時、会場：3 月 27 日 14:33～ E 校舎 32 会場

1,2-β-グルカナーゼの同定と機能解析

Identification and functional analysis of 1,2-ß-glucanase

○阿部 紘一[1]、中島 将博[1]、豊泉 大幸[1]、山下 哲郎[2]、中井 博之[3]、北岡 本光[4]、田口 速男[1]([1]東理大院・理工、[2]岩手大・農、[3]新潟大・農、[4]農研機構・食総研)
○Koichi ABE[1], Masahiro NAKAJIMA[1], Hiroyuki TOYOIZUMI[1], Tetsuro YAMASHITA[2], Hiroyuki NAKAI[3], Motomitsu KITAOKA[4], Hayao TAGUCHI[1] ([1]Tokyo Univ Sci., [2]Iwate Univ., [3]Niigata Univ., [4]NFRI-NARO)

【目的】1,2-β-グルカン(βG)は、一部のα-プロテオバクテリアが産生する環状糖として主に知られており、宿主との共生や宿主免疫系からの回避などに重要な因子であるとされる。一方、βG 分解酵素は、基質の入手が容易でないため、いくつかの菌で活性の報告例があるのみである。本研究では、演者らが大量合成に成功したβG を用い、活性既知のグラム陰性細菌 *Chitinophaga arvensicola* から 1,2-β-グルカナーゼ(SGL)の精製単離・機能解析を行った。
【方法】*C. arvensicola* を、合成βG を唯一の炭素源として培養し細胞抽出液を得た。この細胞抽出液から SGL を、1,2-β-グルコオリゴ糖(Sop_n、n:重合度)遊離活性を指標とし DEAE-セファロース、ハイドロキシアパタイト、ゲルろ過クロマトグラフィーにより精製した。精製酵素を SDS-PAGE に供し、in gel digestion を行い、LC/MS/MS により分析した。得られた結果から *de novo* シークエンシングにより内部配列を構築し、ゲノム既知の近縁種 *Chitinophaga pinensis* に対して BLAST による相同性検索を行った。最上位にヒットした遺伝子 *CpSGL* を大腸菌 BL21(DE3)を宿主として発現させ、組換えタンパク質(CpSGLr)を調製し、これを用いて機能解析を行った。
【結果】*C. arvensicola* の細胞抽出液から SGL の精製を行った結果、SGL は SDS-PAGE 上で約 43 kDa の位置に検出された。この SGL の内部配列から検索された CpSGL は、既知の糖加水分解酵素とは異なるアミノ酸配列を有していた。また、CpSGLr をβG と反応させたところβG が分解され、SGL としての酵素活性が確認された。したがって、SGL は新規の糖加水分解酵素ファミリーを形成していると考えられる。CpSGLr の至適 pH は 4.5～6.5 で、pH 3.5～10 で安定であり、至適温度は 50 ℃で、1 時間のインキュベートでは 50 ℃まで安定であった。多糖に対する基質特異性を調べた結果、CpSGLr はβG に特異的であった。また、βG に対する反応速度論量は k_{cat} = 49 s^{-1}、K_m = 0.71 mg/mL であった。直鎖状および環状βG に対する分解様式を TLC により調べたところ、どちらの場合でも反応初期から $Sop_{2\sim5}$ が主生成物として検出されていた。また、Sop_ns (n:3～7)に対する分解様式も同様に調べたところ、5 糖以上の Sop_ns が分解されていた。以上のことから、本酵素は 5 糖以上のβG に作用する、エンド 1,2-β-グルカナーゼであることが明らかとなった。現在 CpSGLr の反応機構（アノマー反転型か保持型か）を検討中である。

1,2-ß-glucanase, 1,2-ß-glucan, *Chitinophaga*

講演番号：2E32p05
講演日時、会場：3 月 27 日 14:44～ E 校舎 32 会場

新規 1,2-β-グルカン分解酵素の単離同定及び機能解析
Isolation, identification and characterization of a novel 1,2-ß-glucan degrading enzyme
○田中 信清[1]、阿部 紘一[1]、中島 将博[1]、成川 恵[1]、北岡 本光[2]、中井 博之[3]、山下 哲郎[4]、田口 速男[1] ([1]東理大院理工、[2]農研機構・食総研、[3]新潟大農、[4]岩手大農)
○NOBUKIYO TANAKA[1], KOUICHI ABE[1], MASAHIRO NAKAJIMA[1], MEGUMI NARUKAWA[1], MOTOMITSU KITAOKA[2], HIROYUKI NAKAI[3], TETSURO YAMASHITA[4], HAYAO TAGUCHI[1] ([1]TUS, [2]NARO, [3]Niigata Univ., [4]Iwate Univ.)

【目的】1,2-β-グルカンは一部の微生物の分泌する環状糖としての存在が主に知られており、宿主との共生や宿主免疫系からの回避などに重要とされる。しかし、この糖鎖は大量調製が困難なため、1,2-β-グルカン分解酵素については数種の菌で分解活性の報告があるのみであった。そこで、大量調製した直鎖状 1,2-β-グルカンを炭素源として培養した糸状菌からの 1,2-β-グルカン分解酵素の精製単離、遺伝子同定、機能解析を行った。更に、酵母にて生産した組換え酵素の機能解析を行った。
【方法、結果】β-グルコシダーゼの阻害剤であるグルコン酸存在下における 1,2-β-グルカン分解活性を指標として、*Talaromyces funiculosus* の培養上清から疎水、陰イオン交換、ゲルろ過カラムにより精製したところ、目的酵素は BGL と分離され、ほぼ完全に精製された。精製酵素の 1,2-β-グルカンに対する分解様式を TLC により調べたところ、反応初期から主生成物としてソホロースが検出された。また、1,2-β-グルコオリゴ糖（重合度 2-5）に対する特異性を調べたところ、本酵素は 5 糖からソホロースを遊離した。ゆえに、本酵素は 5 糖以上の 1,2-β-グルカンに作用するソホロヒドロラーゼと考えられる。次に、本酵素の遺伝子同定を行い、判明したアミノ酸 1 次配列より Blast 検索を行ったところ、既知の糖加水分解酵素はヒットせず、ホモログは粘菌や子のう菌に分布していた。したがって、本酵素は新規糖加水分解酵素ファミリーに属すると考えられる。次に、*Pichia pastoris* により組換え酵素を調製したところ、天然型酵素と同様の分子量及び 1,2-β-グルカン分解活性を有していた。組換え酵素の pH、温度依存性を調べたところ、至適 pH は 4-5 であり、pH4-7 にて安定、また至適温度は 60℃で、60 分間の処理では 0～20℃で安定であった。様々な結合様式を持つ多糖に対する組換え酵素の基質特異性を調べたところ、1,2-β-グルカンに特異的であった。そこで、1,2-β-グルコオリゴ糖(重合度 2-7)に対する基質特異性を調べたところ、2-5 糖に対しては天然型酵素と同様の分解活性がみられ、6-7 糖では 2,3,4 糖が同程度に遊離した。また、組換え酵素を環状 1,2-β-グルカンに対して作用させたところ、分解活性がみられたため、組換え酵素は *endo* 型の分解様式を持つと考えられる。1,2-β-グルカンを基質としたときのソホロース遊離活性の反応速度論量を調べたところ、kcat =92.9(S^{-1}) 、Km =0.0114(mM)であり、一般的な糖加水分解酵素の範囲の値を示した。現在、本酵素の反応機構（アノマー反転型または保持型）を検討中である。

1,2-ß-Glucan degrading enzyme, 1,2-ß-Glucan, *Talaromyces funiculosus*

講演番号：2E32p06
講演日時、会場：3 月 27 日 15:05～ E 校舎 32 会場

根粒菌 *Sinorhizobium* sp. 97507 株由来ソルボース脱水素酵素の大腸菌組換え発現及びその諸性質評価

Expression and characterization of recombinant L-sorbose dehydrogenase from *Sinorhizobium* sp. 97507 in *Escherichia coli*.

○荒木 俊雄、田村 隆、稲垣 賢二 (岡山大院・環境生命)
○Toshio ARAKI, Takashi TAMURA, Kenji INAGAKI (Grad. Sch. Environ. & Life Sci.,Okayama Univ.)

【目的】ソルボース脱水素酵素（SDH, EC 1.1.99.32）は、L-ソルボースの 1 位を酸化し、L-ソルボソンを生成する反応を触媒する酵素である。本酵素はビタミン C 合成の中間体として知られている 2-ケト-L-グロン酸（2KLGA）の微生物発酵に関わる酵素であり、これまでに *Gluconobacter melanogenus* UV10 株由来の SDH について、その酵素特性が報告されている[1)]。我々は *Sinorhizobium* sp. 97507 株由来 SDH の大腸菌組換え体が、糖尿病マーカとして知られている 1,5-anhydro-D-glucitol（1,5-AG）に作用することを見出した。本発表では、*Sinorhizobium* sp. 97507 株由来 SDH の大腸菌組換え発現及びその酵素特性について報告する。

【方法及び結果】*Sinorhizobium* sp. 97507 株から取得したゲノムを用い、公知データベースから検索した配列を基にデザインしたプライマーにより sdh と推測される遺伝子を増幅した。増幅した遺伝子を pET-21a に導入した後、大腸菌 BL21(DE3)の形質転換を行った。本酵素は、菌体破砕液に対して Triton X-100 による可溶化後、アフィニティークロマトグラフィーを行うことでほぼ単一に精製された。SDS-PAGE の結果、サブユニットの分子量は約 59 kDa であった。精製酵素は L-ソルボースと 1,5-AG に高い反応性を示し、その触媒活性（*k*cat/*K*m）はほぼ同程度であった。

1) T. Sugisawa et al, Agric. Biol.Chem.,55(2), 363-370 (1991)

Sorbose dehydrogenase, *Sinorhizobium* sp., 1,5-anhydro-D-gluctiol

講演番号：2E32p07
講演日時、会場：3 月 27 日 15:16～ E 校舎 32 会場

Cellulomonas parahominis 由来 L-リボースイソメラーゼの基質複合体構造解析および四量体形成の必要性の解明
Crystal structures of *Cellulomonas parahominis* L-ribose isomerase in complexes with substrates and the investigation of the essentiality of its tetramer formation
○寺見 優司[1]、上地 敬子[1]、森本 兼司[1]、吉田 裕美[2]、神鳥 成弘[2]、高田 悟郎[1]([1]香川大希少糖研究セ、[2]香川大総合生命研究セ)
○Yuji Terami[1], Keiko Uechi[1], Kenji Morimoto[1], Hiromi Yoshida[2], Shigehiro Kamitori[2], Goro Takata[1] ([1]Kagawa Univ. Rare Sugar Research Center, [2]Kagawa Univ. Life Science Research Center)

【目的】　希少糖とは自然界にほとんど存在しない単糖と定義され、近年では商品化も視野に入っている。その希少糖生産の可能な酵素L-リボースイソメラーゼは、希少糖L-リボースからL-リブロースへの可逆的異性化反応を触媒する。*Cellulomonas parahominis*由来L-RI（CpL-RI）は，L-リボースの他，希少糖L-アロース・L-プシコース間の異性化反応を触媒できる、広い基質特異性を有する酵素である。これまでに、CpL-RIの立体構造決定に関してはすでに報告しており，今回は基質複合の体構造解析から基質認識メカニズムを報告する。また，本酵素は四量体であるが，活性部位は，それぞれのサブユニットの中心に形成され，他のサブユニットからのアミノ酸残基が関与しておらず，四量体形成の生物学的意味が不明である。サブユニット間で相互作用しているアミノ酸残基に変異を導入し，四量体を形成できない変異酵素を作成することにより、四量体形成の重要性について検討した。

【方法】　N末端側にHisタグ付加CpL-RIプラスミドを構築し、大腸菌JM109を宿主として組換え体を発現させ、アフィニティカラムを用いて精製酵素を調整した。得られた精製酵素を30 mg/mlまで濃縮し、ハンギング蒸気拡散法により結晶を作成し、 高濃度の基質溶液に数秒浸した結晶を用いて、データ収集・構造解析を行った。
　また、サブユニット間で相互作用しているアミノ酸残基に変異を導入した変異酵素E17A、S20W、A24W、R26A、およびPhe42からGlu61のアミノ酸を削除した変異酵素を構築し、上記同様発現を試み、精製酵素を得た。得られた精製酵素に対し、システインカルバゾール法により、L-リボースに対する酵素活性を測定し、野生型との比較を行った。またゲル濾過カラムを用いて、精製酵素の分子量を測定し、変異酵素が四量体を形成しているかどうかを検討した。

【結果】　CpL-RIの基質複合体構造（L-リボース、L-アロース、L-プシコース）から、Glu211およびArg243が基質の結合において柔軟に動くことにより、単糖のC4、C5位の様々な立体配置の認識を許容していることが確認できた。
　変異酵素 E17A、S20W、A24W、R26A、および Phe42 から Glu61 を削除した酵素において、ゲル濾過の結果、四量体は部分的に二量体に解離していることが確認でき、二量体が増えるにつれ、L-RIの酵素活性も減少しており，酵素活性のためには四量体形成が必要であることが示唆された。

Rare sugar, L-Ribose isomerase, Crystal structure

講演番号：2E32p08
講演日時、会場：3 月 27 日 15:27～ E 校舎 32 会場

Thermus thermophilus HB8 由来トレハロースシンターゼの諸性質の検討
Characterization of trehalose synthase from *Thermus thermophilus* HB8
○岡本 尚樹[1]、寺見 優司[1]、上地 敬子[1]、神鳥 成弘[2]、高田 悟郎[1] ([1]香川大希少糖研究セ、[2]香川大総合生命研究セ)
○Naoki Okamoto[1], Yuji Terami[1], Keiko Uechi[1], Shigehiro Kamitori[2], Goro Takata[1] ([1]Kagawa Univ. Rare Sugar Research Center, [2]Kagawa Univ. Life Science Research Center)

【目的】　糖とは炭水化物の一種であり、重要な栄養源である。近年、オリゴ糖には様々な生理機能が確認されており、重要な糖類として注目を浴びている。本研究では、二糖であるマルトースとトレハロースの間の転移反応を触媒する *Thermus thermophilus* HB8 由来のトレハロースシンターゼ(TTTS)を用いて、新規二糖生産への応用を目的とし、本酵素の大腸菌での高発現およびキャラクタリゼーションを行った。また、本酵素はホモロジー検索から触媒ドメインと機能未知の C 末側ドメインから構成されていることが推測された。そこで、C 末側ドメインの機能を確かめるため、触媒ドメインのみを発現させ、酵素活性の違いについて検討を行った。さらに、TTTS の 3 次元構造決定のため、TTTS 全長および TTTS 触媒ドメインの結晶化を試みた。
【方法】　理研バイオリソースセンターから入手した TTTS 遺伝子（pET-11a ベクター）と大腸菌 BL21 を宿主として組換え体を作製した。本菌株を培養後、粗酵素を抽出し、熱処理、各種カラムクロマトグラフィーに供することで大腸菌由来のタンパク質を取り除き、精製を行った。次に、この精製酵素を用いて最適温度・最適 pH などの諸性質を検討した。諸性質の検討ではトレハロースを基質とし、マルトースへの転換を HPLC にて調べた。また、本酵素の触媒ドメイン遺伝子配列のみを PCR にて増幅し、上記と同様に組換え体を作製し、諸性質の検討及び X 線結晶構造解析のための結晶化を行った。
【結果】　精製酵素をサンプルとして SDS-PAGE を行ったところ、大腸菌由来のタンパク質がほとんど除去されており、分子量約 110,000 付近にバンドが確認できた。次に、この精製酵素を用いて、諸性質を検討したところ、最適温度は 40 - 50℃であった。また各種緩衝液を用いて最適 pH について検討した結果、リン酸ナトリウム緩衝液（pH 6.0）のとき最も活性が高かった。基質特異性については現在検討している。また、活性ドメインのみを組換えた大腸菌を上記の手順と同様に精製を行ったところ、目的の酵素のバンドを確認できた。しかし、活性測定の結果、トレハロースに対する活性は認められなかった。このことより、機能未知のドメインが酵素活性に対して何らかの影響を与えているのではないかと推察できた。TTTS 全長および TTTS 触媒ドメインの結晶化を行った。現在のところ TTTS 触媒ドメインの結晶が得られたが、予備的な X 線回折実験により 12Å という低い解像度であったため、今後さらなる検討が必要であると考える。

Trehalose Synthase, *Thermus Thermophilus*

講演番号：2E32p09
講演日時、会場：3 月 27 日 15:38～ E 校舎 32 会場

Bacillus selenitireducens MLS10 由来カリウムイオン依存性トレハロースホスホリラーゼ
Potassium ion-dependent trehalose phosphorylase from halophilic *Bacillus selenitireducens* MLS10

○仁平 高則[1]、斉藤 由華[2]、知久 和寛[1]、北岡 本光[3]、大坪 研一[1,2]、中井 博之[1,2] ([1]新潟大・農、[2]新潟大院・自然科、[3]農研機構・食総研)
○Takanori NIHIRA[1], Yuka Saito[2], Kazuhiro Chiku[1], Motomitsu Kitaoka[3], Ken'ichi Ohtsubo[1,2], Hiroyuki Nakai[1,2] ([1]Fac. Agr., Niigata Univ., [2]Grad.Sci.&Tech., Niigata Univ., [3]NFRI-NARO)

【目的】　高塩濃度環境下に生息する極限環境微生物が所有する酵素の中には，その活性発現や安定性に高濃度の塩を必要とするものが多く存在する。糖質関連酵素においてもある種の塩に対し依存性を示すものがいくつか報告されているが，糖質加リン酸分解酵素（ホスホリラーゼ）においてはこれまで報告がなかった。我々は，好塩菌 *Bacillus selenitireducens* MLS10 由来の Glycoside hydrolase family 65 (GH65) に属するホスホリラーゼホモログ遺伝子 bsel_1207 に注目し，クローニング，組換え酵素の基質特異性および塩濃度依存性について検討を加えた。
【方法および結果】[1]　bsel_1207 遺伝子を PCR 法にて増幅後，pET-24a ベクターに連結することで His-Tag 融合組換え酵素タンパク質 Bsel_1207 発現用ベクターを構築した。大腸菌 BL21(DE3)を宿主として当該組換え酵素タンパク質 Bsel_1207 を調製し，ニッケルアフィニティーカラムクロマトにて精製した。既知 GH65 ホスホリラーゼの基質である各種α-グルコ 2 糖を用いて Bsel_1207 の基質特異性を確認した結果，リン酸存在下でトレハロースを加リン酸分解した。加えてβ-グルコース 1-リン酸およびグルコースを用いて逆反応を確認したところトレハロースの合成が確認されたことから，Bsel_1207 がトレハロースホスホリラーゼであることが判明した。各種塩 (1 M KCl, NaCl, LiCl, RbCl, CsCl, $MgCl_2$ および 500 mM K_2SO_4) 存在下で加リン酸分解反応を確認したところ，KCl および K_2SO_4 の存在下において高い活性保持が確認された。このことから，当該酵素の活性発現にはカリウムイオンが必要であることが推察された。当該酵素の KCl 濃度による影響を調べた結果，250 mM 以上の KCl 存在下にて最大活性を示した。また各種濃度の KCl 存在下における pH 安定性および熱安定性を調べた結果，いずれも低塩濃度において安定性が低下することが確認された。Bsel_1207 を各種濃度の KCl 含有の緩衝液で透析し，Superdex200 を用いたゲル濾過による分子量測定を行なった結果，高塩濃度時に二量体を形成する本酵素が，低塩濃度時には単量体に解離することが判明した。この結果から，カリウムイオンが本酵素の二量体形成を安定化させ活性保持に寄与しているものと推察された。トレハロースがポリオールなどと同様に浸透圧適合溶質として知られていることから，高塩濃度環境下で生息する *B. selenitireducens* において本酵素は,以前我々が報告した 2-*O*-α-グルコシルグリセロールホスホリラーゼ[2]と共に，菌体内の浸透圧調整に寄与しているものと推察された。

1. T.Nihira, et al, *FEBS Lett.*, 587, 3382-3386 (2013).
2. T.Nihira, et al, *PLoS One.*, 9, e86548 (2014).

trehalose phosphorylase, potassium ion- dependent phosphorylase, *Bacillus selenitireducens*

講演番号：2E32p10
講演日時、会場：3 月 27 日 15:49～ E 校舎 32 会場

古細菌トレハラーゼの発現と諸性質の解析
Expression and characterization of archaeal GH15 trehalase
○坂口 政吉[1]、下平 賢[1]、石田 慎之介[1]、雨宮 美虹[1]、本田 翔太郎[1]、菅原 康里[1]、小山 文隆[1]、川喜田 正夫[1,2] ([1]工学院大工、[2]東京都医学研)
○Masayoshi Sakaguchi[1], Satoru Shimodaira[1], Shin-nosuke Ishida[1], Miko Amemiya[1], Shotaro Honda[1], Yasusato Sugahara[1], Fumitaka Oyama[1], Masao Kawakita[1,2] ([1]Kogakuin Univ., [2]Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science)

トレハロースは、グルコースがα-1,1グルコシド結合した非還元性二糖である。多くの生物に見出されるこの二糖は、生物のエネルギー源だけでなく、保水性などの様々な生理活性作用に注目が集まっている。この二糖を分解する酵素トレハラーゼは、ほとんどの生物に見出され、細胞内のトレハロース濃度を制御している。

我々は、温泉で発見された古細菌の染色体 DNA 上の GH ファミリー15 酵素に類似した配列を見出し、その遺伝子産物を、大腸菌を宿主として発現させ、精製し、解析した。この遺伝子産物は、α-1,4 グルコシド結合を有するマルトースやマルトトリオース、他の二糖にも作用しなかったが、トレハロースにのみ作用することがわかった。活性の pH 依存性を調べたところ、酸性側の狭い範囲で活性を示し、速度論パラメータ解析より、既知の GH37 ファミリーおよび GH65 トレハラーゼと比較して、高い K_m 値を示すこともわかった。トレハラーゼ阻害剤であるバリダマイシン A を用いた阻害実験では、既知のトレハラーゼ同様競争的に阻害されたが、その阻害定数は既知のトレハラーゼの阻害定数より高い値であった。これらのことから、この酵素を GH15 ファミリートレハラーゼと判断した。この酵素は、他のファミリートレハラーゼとは異なる基質認識部位を形成していることが示唆された。

さらに GH15 ファミリーのグルコアミラーゼとの配列アラインメントから、触媒残基がグルタミン酸であると推定されたため、グルタミンへ変換し、解析したところ、活性は著しく減少した。これは、GH15 ファミリー酵素同様二つのグルタミン酸が触媒に関与していることを意味している。また、この酵素は、比較的幅広い pH で安定であり、示差走査蛍光 (DSF) 測定では 80ºC の熱転移温度を示し、熱安定性測定では 70ºC 近くまで安定性を示した。しかし、至適温度は 60ºC 程度であったため、活性部位を含む触媒ドメインが熱に対して不安定であることが示唆された。

GH15 trehalase, expression, characterization

講演番号：2E32p11
講演日時、会場：3 月 27 日 16:10～ E 校舎 32 会場

コヘシン－ドックリン相互作用解析を基にした *Clostridium cellulovorans* のセルロソームの評価
Evaluation of *Clostridium cellulovorans* cellulosome based on analysis of cohesin-dockerin interactions

○長屋 千晶[1]、石川 岳[1]、田中 礼士[1]、柴田 敏行[1,2]、黒田 浩一[3]、植田 充美[3]、田丸 浩[1,2,4]、三宅 英雄[1,2,4] ([1]三重大院・生資・生物圏生命、[2]三重大・新産業、[3]京大院・農・応用生命、[4]三重大・生命支セ)
○ Chiaki NAGAYA[1], Gaku ISHIKAWA[1], Reiji TANAKA[1], Toshiyuki SHIBATA[1,2], Kouichi KURODA[3], Mitsuyoshi UEDA[3], Yutaka TAMARU[1,2,4], Hideo MIYAKE[1,2,4] ([1]Dept. Life Sci., Grad. Sch. Bioresour., Mie Univ., [2]Ind. Technol. Innov. Inst., Mie Univ., [3]Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [4]Life Sci. Res. Center, Mie Univ.)

【背景・目的】嫌気性中温菌 *Clostridium cellulovorans* は、菌体表面のセルロソーム骨格タンパク質に様々な糖質加水分解酵素が結合したセルロソームを形成することで、共役酵素反応によりセルロース系バイオマスを高率よく分解することができる。*C. cellulovorans* は 4 種類のセルロソーム骨格タンパク質を発現し、その中でも CbpA は、9 つのコヘシンドメインと 1 つの糖質結合モジュール（CBM）と 3 つの表層ホモロジードメイン（SLH）から構成される。コヘシンドメインはドックリンドメインを持つ酵素やタンパク質と結合することができるが、*C. cellulovorans* のコヘシンドメイン間の相同性は他のセルロソーム生産性 *Clostridium* 属のコヘシンドメイン間と比べ低い。またドックリンドメインは種固有の 2 つの連続したアミノ酸配列をもつが、*C. cellulovorans* は他のセルロソーム生産性 *Clostridium* 属に比べ、種固有の配列が異なるドックリンドメインが多数存在している。そのため各コヘシン–ドックリン相互作用に違いが生じ、ドックリンドメインを持つ酵素やタンパク質との結合に選択性を有することが示唆された。コヘシン–ドックリン相互作用に選択性を有する場合、*C. cellulovorans* のセルロソームには特定の酵素配列が存在し、酵素配列が基質分解に大きく影響する可能性がある。そこで本研究では *C. cellulovorans* が生産するセルロソーム骨格タンパク質 CbpA のコヘシン–ドックリン相互作用解析を行い、選択性の有無を確認した。
【方法・結果】ドックリンドメインを持つタンパク質 45 種を、アミノ酸を用いた多重配列比較により分類したところ 5 つのタイプに分類された。それぞれのタイプから 1 つのドックリンドメインを選抜し、これらのドックリンドメインに GST タグを付加した 5 種類の組替え体を作製した。また、CBM、SLH、CbpA のコヘシンドメインを 1 つずつ持つキメラ骨格タンパク質を 9 種類作製した。これら 45 通りのコヘシン–ドックリン相互作用を GST プルダウンアッセイにより定性的に評価した。その結果、コヘシン–ドックリン相互作用は一定の結合力を示すというこれまでの報告とは異なり、コヘシンドメインやドックリンドメインの種類によって結合力に差が生じた。このことから *C. cellulovorans* の場合コヘシン–ドックリン相互作用に選択性を有し、セルロソーム内の酵素配列には一定の規則性があることが示唆された。
【謝辞】本研究は生研センターイノベーション創出事業と農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業の支援を受けて行った。

cellulosome, *Clostridium cellulovorans*, cohesin-dockerin interaction

講演番号：2E32p12
講演日時、会場：3 月 27 日 16:21～ E 校舎 32 会場

Clostridium cellulovorans が生産するセルロソームを構成する酵素群の同定
Identification of cellulosomal enzymes for constructing cellulosomes from *Clostridium cellulovorans*

○石川 岳[1]、長屋 千晶[1]、江坂 康平[3]、田中 礼士[1]、柴田 敏行[1,2]、森坂 裕信[3]、黒田 浩一[3]、植田 充美[3]、田丸 浩[1,2,4]、三宅 英雄[1,2,4] ([1]三重大院・生資・生物圏生命、[2]三重大・新産業、[3]京大院・農・応用生命、[4]三重大・生命支セ)
○GAKU ISHIKAWA[1], CHIAKI NAGAYA[1], KOHEI ESAKA[3], REIJI TANAKA[1], TOSHIYUKI SHIBATA[1,2], HIRONOBU MORISAKA[3], KOUICHI KURODA[3], MITSUYOSHI UEDA[3], YUTAKA TAMARU[1,2,4], HIDEO MIYAKE[1,2,4] ([1]Dept. Life Sci., Grad. Sch. Bioresour., Mie Univ., [2]Ind. Technol. Innov. Inst., Mie Univ., [3]Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [4]Life Sci. Res. Center, Mie Univ.)

【目的】*Clostridium cellulovorans* は酵素複合体であるセルロソームを生産し、効率良くセルロース系バイオマスを分解することができる。セルロソームは骨格タンパク質に含まれるコヘシンドメインと糖質加水分解酵素が結合することで形成され、様々な酵素が局所的かつ共役的に働くと考えられている。*C. cellulovorans* が生産する骨格タンパク質 CbpA には 9 つのコヘシンドメインが含まれており、最大で 9 つの酵素が結合できる。また、セルロース系バイオマスを効率よく分解するには、単独の酵素活性だけでなく、酵素の組み合わせも重要である。これらのことから、酵素と骨格タンパク質との相互作用は、セルロース系バイオマス分解の機序を理解する上で有益な情報を得ることができる。トランスクリプトーム解析やプロテオーム解析の結果、種々の炭素源におけるセルロソーム関連酵素の種類と発現パターンは明らかとなった。しかし、セルロソームを構成する酵素の種類やセルロソーム内の酵素配列は明らかになっていない。そこで本研究では、*C. cellulovorans* が生産するセルロソームを構成する酵素を同定し、各コヘシンドメインとの相互作用を評価することでセルロソーム内の酵素配列について考察した。
【方法・結果】炭素源にセロビオースを用いて *C. cellulovorans* を培養し、培養液を破砕および濃縮することで細胞抽出液を作製した。抽出液に対して Avicel を担体としたアフィニティークロマトグラフィーを行うことでセルロソームを回収し、LC-MS/MS によりセルロソームを構成している酵素を同定した。その結果 54 種類のセルロソーム形成可能な酵素の内、14 種類の酵素を中心にセルロソームを構築していることが分かった。続いて、N 末端から GST、CBM、SLH ドメインそして CbpA の各コヘシンドメインから成るキメラ骨格タンパク質を作製した。得られた 9 種類のキメラ骨格タンパク質と細胞抽出液を用いて GST プルダウンアッセイを行うことで各コヘシンに結合するタンパク質を同定した。その結果、特定のコヘシンドメインと結合する酵素やどのコヘシンドメインとも結合する酵素が検出された。そこで、これらの組み換え体を作製し、キメラ骨格タンパク質との相互作用を等温滴定型熱測定にて定量的に解析したところ、GST プルダウンアッセイの結果を反映する結果が得られた。本研究の結果から、*C. cellulovorans* が生産するセルロソームは酵素の違いだけでなくコヘシンドメインの違いもセルロソームの構成に影響を与えることが示されたためそれについて報告する。
【謝辞】本研究は生研センターイノベーション創出事業と農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業の支援を受けて行った。

cellulosome, *Clostridium cellulovorans*, cohesin-dockerin interaction

講演番号：2E32p13
講演日時、会場：3 月 27 日 16:32～ E 校舎 32 会場

Clostridium thermocellum 由来セルロソーム二次骨格の機能解析
In vitro functional analysis of the secondary scaffoldin subunits of the *Clostridium thermocellum* cellulosome.
○平野 勝紹[1]、高橋 祐介[1]、田中 清志[1]、二瓶 哲[1]、白澤 智行[1]、長谷川 裕樹[1]、篠田 優[1]、春木 満[1]、平野 展孝[1,2] ([1]日大・工・生命応化、[2]JST・PRESTO)
○Katsuaki HIRANO[1], Yusuke Takahashi[1], Kiyosi Tanaka[1], Satoshi Nihei[1], Tomoyuki Shirasawa[1], Hiroki Hasegawa[1], Suguru Shinoda[1], Mitsuru Haruki[1], Nobutaka Hirano[1,2] ([1]Nihon Univ., College of Eng., Dept. of Chem. Bio. & Appl. Chem., [2]JST, PRESTO)

好熱嫌気性細菌 *Clostridium thermocellum* が生産するセルラーゼ・ヘミセルラーゼ超分子複合体（セルロソーム）は、結晶性セルロースに対して高い分解活性を示すことが知られている。セルロソームは嫌気性細菌の細胞表層に提示される酵素複合体である。*C. thermocellum* では、多種多様な糖質分解酵素に存在する Type-I Dockerin ドメインが、一次骨格蛋白質中の 9 個の Type-I Cohesin ドメインと特異的に結合して一次骨格複合体を形成する。更に、一次骨格蛋白質の C 末端に存在する Type-II Dockerin ドメインが、細胞表層接着因子（SLH モジュール）を持つ二次骨格蛋白質中の、Type-II Cohesin ドメインと特異的に結合して二次骨格複合体を形成することで、セルロソーム複合体が細胞表層に提示される。セルロソームが結晶性セルロースに対して高分解活性を発揮するためには、一次骨格複合体の形成が必須であるが、二次骨格複合体形成のセルロース分解活性への影響は不明である。

本研究では、無細胞蛋白質合成系を用いて、*C. thermocellum* NBRC103400（ATCC27405）株由来一次骨格蛋白質（CipA（Type-I Cohesin 9 個））、細胞表層接着因子（SLH モジュール）を欠失させた二次骨格蛋白質群（SdbA（Type-II Cohesin 1 個）、Orf2p（Type-II Cohesin 2 個）、OlpB（Type-II Cohesin 7 個））、細胞表層因子を持たない二次骨格蛋白質 Cthe0736（Type-II Cohesin 7 個）、及びセルロソーム構成セルラーゼ群の無細胞合成を行い、二次骨格を介した二次骨格複合体の試験管内再構成と機能解析を目的とした研究を行った。セルロソームを構成する主要構成因子群の無細胞合成・精製後、セルロソーム構成セルラーゼ、一次骨格蛋白質、及び二次骨格蛋白質を用いて、ゲルシフト・アッセイによる複合体形成の確認を行い、Type-I Cohesin—Dockerin 間、Type-II Cohesin—Dockerin 間の特異的な分子間相互作用を確認した。また、二次骨格複合体形成がセルロース分解活性に与える影響を検討したので報告する。

Cell-free protein synthesis, Cellulosome, *Clostridium thermocellum*

講演番号：2E32p14
講演日時、会場：3 月 27 日 16:43～ E 校舎 32 会場

結晶性セルロースを分解する担子菌由来新規酵素の解析

Analysis of novel crystalline cellulose-degrading enzymes in basidiomycetes

○市川 すみれ[1]、藤田 将幸[1]、田口 悟朗[1]、稲冨 聡[2]、下坂 誠[1]([1]信州大・繊維・応生系、[2]ホクトきのこ総合研)
○Sumire ICHIKAWA[1], Masayuki FUJITA[1], Gorou TAGUCHI[1], Satoshi INATOMI[2], Makoto SHIMOSAKA[1] ([1]Shinshu Univ., [2]Mushroom Lab. Hokuto Co.)

【研究背景】

真菌類などで報告されている glycoside hydrolase family 61(GH61)酵素は、結晶セルロースの表面に結合してグリコシド結合を酸化的に分解することが知られている。GH61 酵素は、共存する他のセルロース加水分解酵素の分解反応を促進させる効果を持つことから、バイオマスであるセルロースの糖化反応の効率化という観点から注目されている。本研究では、自然界における分解者の役割を担うキノコが有する高い木質分解能に着目し、担子菌エノキタケ *Flammulina velutipes* およびブナシメジ *Hypsizygus marmoreus* が有する GH61 様遺伝子がコードするタンパク質の機能を調査した。

【実験方法】

F. velutipes 由来の *Fvgh61* および *H. marmoreus* 由来の *Hmgh61-2*、*Hmgh61-3* の各 cDNA をそれぞれ大腸菌用発現ベクターpMAL-c4x を用いて発現させた。セルロース加水分解活性は、基質にリン酸膨潤セルロース(PASC）を用い、生成還元糖量を PAHBAH 法により定量した。

【結果・考察】

Fvgh61 は C 末端側にセルロース結合ドメインを有していたが、*Hmgh61-2*, *Hmgh61-3* は GH61 ドメインのみから構成されていた。各組換えタンパク質はいずれも、単独ではセルロース加水分解活性を示さなかったが、*Trichoderma reesei* 由来の cellobiohydrolase (TrCBH1、TrCBH2)および endoglucanase (TrEG1)と共存させたところ、加水分解反応を促進する効果が認められた。特に TrEG1 に対する効果が大きく、最大で分解速度が 2.2 倍増加した。現在、各組換え酵素を単独で結晶性セルロースに作用させた際に生じる分解反応生成物を MALDI-TOF/MS により分析中である。

cellulase, basidiomycete, cellulose

講演番号：2E32p15
講演日時、会場：3 月 27 日 16:54～ E 校舎 32 会場

マツタケ由来菌体外セルラーゼ遺伝子のクローニング
Gene cloning of extra cellular cellulase from *Tricholoma matsutake*.
○大沼 広宜[1]、福田 泰久[1]、楠田 瑞穂[2]、寺下 隆夫[1]、白坂 憲章[1] ([1]近大農、[2]大阪府大)
○Hiroki OHNUMA[1], Yasuhisa FUKUTA[1], Mizuho KUSUDA[2], Takao TERASHITA[1], Norifumi SHIRASAKA[1] ([1]Kindai Univ., [2]Osaka Pref. Univ.)

【背景と目的】マツタケの純粋培養の問題点の一つとして、デンプンやセルロースといった高分子多糖類を分解し栄養を摂取するために必要な酵素の生産性が微弱であることが挙げられる。当研究室において、マツタケはセルロース分解に関与するとされる酵素（ エンド型セルラーゼ、エキソ型セルラーゼ、β-グルコシダーゼ ）のうち、極めて強いβ-グルコシダーゼ活性を示すことを明らかにしてきた。しかしながら、このβ-グルコシダーゼの基質となるセロオリゴ糖をセルロースより供給するエンド型もしくはエキソ型セルラーゼについては、微弱な活性は検出されるものの、その酵素の存在は明らかではなかった。本研究では、マツタケがセルロースからβ-グルコシダーゼの基質となるセロビオースを切り出すことのできるエキソ型セルラーゼを生産するかを明確にするために、Avicel に対して分解活性を示す酵素をマツタケ培養液より精製し、その N 末端アミノ酸配列を解析すると共に、配列情報を基に本酵素遺伝子のクローニングを行い、マツタケゲノム上に本酵素をコードする遺伝子が存在するか検討した。

【方法・結果】研究室保存の *T. matsutake* Z-1 株をマツタケ改変液体培地（ 炭素源：グルコース ）を用いて 50 日間静置培養した。培養ろ液（ 約 4L ）を、70%硫安塩析にて濃縮後、Avicel 分解を指標として各種クロマトグラフィーを用いて精製を試みたところ、分子量約 80kDa（ SDS-PAGE ）の部分精製酵素が得られた。本酵素の N 末端アミノ酸配列は R-E-Y-P-V-Y-R-V-F-P-A-Y-D-H であり、ForestGEN および JGI を用いた BLAST 検索の結果、GH ファミリー3 に属する cellulose-binding β-glucosidase と相同性を示した。本遺伝子情報を基にプライマーを設計し、マツタケ改変液体培地（ 炭素源：グルコース ）で 30 日培養したマツタケ Z-1 株の菌体から RNAiso plus（ Takara Bio ）を用いて mRNA を抽出し、Oligo dT プライマーを用いて逆転写反応にて合成した cDNA を鋳型として PCR を行ったところ、約 2600 bp の DNA 断片の増幅が確認された。これらの実験結果より、マツタケ培養菌糸は Avicel をエキソ型で分解する酵素を生産すること、また、DNA 上にも本酵素をコードする遺伝子が存在することが明確となった。現在, 本酵素の大量取得および酵素化学的諸性質の解明を目指し, 酵母での異種発現系の構築を試みている.

Tricholoma matsutake, cellulase, cDNA cloning

講演番号：2E32p16
講演日時、会場：3 月 27 日 17:15～ E 校舎 32 会場

セルロース資化性放線菌 Cellulomonas fimi 由来のセルラーゼの性状解析

Functional analysis of four cellulases from cellulolytic actinobacterium Cellulomonas fimi

○内山 拓[1]、内橋 貴之[2]、金子 哲[3]、中村 彰彦[1]、五十嵐 圭日子[1]、安藤 敏夫[2]、鮫島 正浩[1]([1]東大院農生科、[2]金沢大理工、[3]食総研)
○Taku UCHIYAMA[1], Takayuki Uchihashi[2], Satoshi Kaneko[3], Akihiko Nakamura[1], Kiyohiko Igarashi[1], Toshio Ando[2], Masahiro Samejima[1] ([1]Univ. of Tokyo, [2]Kanazawa Univ., [3]NFRI)

（目的）

セルロース資化性の放線菌*Cellulomonas fimi*は、アビセルを唯一の炭素源として培養すると、5つのセルラーゼと1つのキシラナーゼを培地上清中に分泌することが知られている。*C. fimi*は複数種のセルラーゼを分泌することで、難分解性であるセルロースの効率的な分解・資化をおこなうと考えられる。今回我々は*C. fimi*の4つのセルラーゼ(*Cf*Cel16A, *Cf*Cel16B, *Cf*Cel9A, *Cf*Cel48A)に注目し、物理化学的及び生化学的研究手法を用いて各セルラーゼの性状解析をおこなったので報告する。

（結果）

はじめに我々は高速原子間力顕微鏡(HS-AFM)を用いて、4つのセルラーゼが結晶性セルロース（セルロースⅢ$_I$型）表面上において連続的にセルロース鎖を加水分解するか、いわゆるプロセッシビティの有無を観察した。その結果、*Cf*Cel6Bと*Cf*Cel48Aについてはプロセッシブな分解反応の可視化に成功したが、*Cf*Cel6Aおよび*Cf*Cel9Aでは観察されなかった。次に各セルラーゼのカルボキシメチルセルロースの加水分解に伴う粘度低下を測定し、それぞれをエンド型とエキソ型に分類した。*Cf*Cel6Aおよび*Cf*Cel9Aでは酵素の添加後、急激な粘度低下が観察されたが（エンド型）、*Cf*Cel6Bと*Cf*Cel48Aでは著しい粘度低下は観察されなかった（エキソ型）。次に各セルラーゼの、3種の結晶性セルロース（アビセル、セルロースⅠ$_\alpha$型、セルロースⅢ$_I$型）及びアモルファスセルロース（リン酸膨潤セルロース）に対する分解活性（酵素活性で生じた可溶性糖の総量）を比較した。興味深いことにアビセルの分解に関しては*Cf*Cel6Aが、セルロースⅢ$_I$型の分解に関しては*Cf*Cel6Bが、セルロースⅠ$_\alpha$型の分解に関しては*Cf*Cel9Aが、各セルラーゼの中で最も高い活性を示した。一方で*Cf*Cel48Aはアモルファスセルロースに対する活性は認められるが、結晶性セルロースに対しては微弱な活性しか示さなかった。

（考察）

上記結果から、*Cf*Cel6Bおよび*Cf*Cel48Aはエキソプロセッシブ型セルラーゼだが、*Cf*Cel6Bが結晶性セルロースをプロセッシブに分解するのに対し、*Cf*Cel48Aは結晶性セルロースのアモルファスな部分のみをプロセッシブに分解していると考えられた。また*Cf*Cel6Aと*Cf*Cel9Aはエンド型セルラーゼであり、プロセッシビティは低いと考えられたが、アビセルやⅠ$_\alpha$への活性はエキソプロセッシブ型セルラーゼである*Cf*Cel6Bよりも高かった。以上のことから*C. fimi*由来の４つのセルラーゼでは、プロセッシビティの強度と結晶性セルロース分解活性の強度は相関しないということが明らかとなった。

Cellulase, Cellulose, Processivity

講演番号：2E32p17
講演日時、会場：3 月 27 日 17:26～ E 校舎 32 会場

超好熱性アーキア Thermococcus kodakarensis における多糖分解経路の解析
Identification of maltooligosaccharide degradation pathway in the hyperthermophilic archaeon Thermococcus kodakarensis

○白石 拓也[1]、松原 光平[3]、佐藤 喬章[1,2]、Siebers Bettina[3]、跡見 晴幸[1,2] ([1]京大工、[2]JST, CREST、[3]デュースブルグ-エッセン大)
○ Takuya SHIRAISHI[1], Kouhei MATSUBARA[3], Takaaki SATOH[1,2], Bettina SIEBERS[3], Haruyuki ATOMI[1,2] ([1]Kyoto Univ., [2]JST, CREST, [3]Duisburg-Essen Univ.)

【目的】超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* は、多糖である maltodextrin を細胞外でオリゴ糖にまで分解して取り込むことが知られている。また細胞内でオリゴ糖を glucose 6-phosphate (G6P) に変換した後、解糖系で代謝することが示唆されている。しかし、G6P に変換する代謝経路としては二つの可能性が考えられており、それぞれの解糖に対する寄与は明らかにはなっていない。一つはマルトオリゴ糖を amylase や pullulanase/α-glucosidase や glucanotransferase により glucose に分解し、その glucose を glucokinase (*gk*)がリン酸化することで G6P を合成する経路（経路 I）である。もう一方は maltodextrin を maltodextrin phosphorylase (*malP*)が加リン酸分解し glucose 1-phosphate (G1P)を合成し、その G1P を phosphoglucomutase (*pgm*)がリン酸基の転移反応により G6P に変換する経路（経路 II）である。*malP* により産生される G1P は *pgm* および解糖系により分解される以外にも糖タンパク質の糖鎖前駆体にもなる。また、解糖系酵素の一つである *T. kodakarensis* 由来 non-phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPN)は G1P により活性化されることが明らかとなっている。これらのことから、代謝経路 II が G1P の合成という観点から解糖系において重要な役割をもつ可能性も考えられた。

そこで、本研究では *gk*, *malP* および *pgm* の各単独破壊株および各遺伝子の破壊を組み合わせた多重破壊株を作製・解析し、二つの代謝経路 I および II の解糖系に対する寄与を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】まず *gk*、*malP* および *pgm* の単独破壊株、*malP* と *pgm* の二重破壊株を作製し、解糖および糖新生条件における生育測定を行った。糖新生条件においては、*gk* 破壊株は宿主と同程度の増殖を示した。*malP* および *pgm* の単独破壊株については若干増殖が低下し、*malP pgm* の二重破壊株では相加的に増殖が低下した。一方解糖条件においては、*gk* 単独破壊株は宿主株と比べ若干の増殖低下が観察された。それに対し、*malP* および *pgm* の単独破壊株、*malP* と *pgm* の二重破壊株は全く増殖を示さなかった。*malP* だけでなく *pgm* も必須であったことから G1P の合成だけでなく G1P を経由する II の経路が解糖系において必須であり、I の経路が補助的である可能性が示唆された。また、経路 II は糖新生系においても必須ではないものの増殖に寄与していることが示唆された。

hyperthermophilic archaea, maltodextrin phosphorylase, phosphoglucomutase

講演番号：2E32p18
講演日時、会場：3 月 27 日 17:37～ E 校舎 32 会場

好塩性アーキアにおける新規糖代謝経路の解明

Identification of a novel sugar metabolic pathway in halophilic archaea

○佐藤 喬章[1,2]、法土 咲菜恵[1]、吉井 祐太[1]、跡見 晴幸[1,2] ([1]京大院・工、[2]JST, CREST)
○Takaaki SATO[1,2], Sanae HODO[1], Yuta YOSHII[1], Haruyuki ATOMI[1,2] ([1]Kyoto Univ., [2]JST, CREST)

【目的】アーキアは真核生物やバクテリアとは異なる第三のドメインを構成しており、その代謝経路も特有なものが多い。アーキア特有の代謝経路の一つに NMP を代謝する経路がある。本経路は AMP phosphorylase (AMPpase), ribose-1,5-bisphosphate isomerase (R15Pi) および ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco)の 3 つの酵素から成り、AMP/CMP/UMP を中央糖代謝の中間体である 3-phosphoglycerate へと変換する。一方、ゲノムが解析されている 24 種の好塩性アーキアの内、*Halobacterium salinarum* および *Halopiger xanaduensis* を含む 9 種は R15Pi のみを単独で有しており、NMP 代謝経路とは異なる新規代謝経路の存在が示唆された。そこで、本研究では R15Pi が形成すると考えられる好塩性アーキアにおける新規糖代謝経路の解明を目的とした。
【方法・結果】まず、単独で存在する R15Pi の多くとオペロンを形成する遺伝子として sugar kinase（RbsK）を見出した。RbsK 組換え型タンパク質を調製し、様々な糖に対する活性を網羅的に調べたところ、ribose 1-phosphate (R1P) をリン酸化して ribose 1,5-bisphosphate (R15P)を生成する R1P kinase であることが明らかとなった。また単独で存在する R15Pi の組換え型タンパク質を調製・解析したところ、NMP 代謝経路で機能する R15Pi と同様に R15P を異性化して ribulose 1,5-bisphosphate (RuBP) へと変換できることが明らかとなった。これまでに RuBP を基質とする酵素は Rubisco しか知られていないが、R15Pi を単独で有する好塩性アーキアは Rubisco を有していない。RuBP 代謝経路を明らかにするため、R15Pi を単独で有する好塩性アーキアに特異的に存在する遺伝子を探索し、haloacid dehalogenase superfamily hydrolase (HADhlase)と fuculose-1-phosphate aldolase (FucA) を見出した。シロイヌナズナ由来 HADhlase は ribose 5-phosphate (R5P) phosphatase 活性を示すことが明らかになっている。R5P と RuBP は構造が類似していることから、好塩性アーキアの HADhlase は RuBP phosphatase 活性を有するのではないかと考え、組換え型タンパク質を調製・解析したところ、確かにその活性を示した。一方、既知の FucA は fuculose 1-phosphate（Fuc1P）を dihydroxy-acetone phosphate (DHAP)と lactaldehyde に開裂する反応などを触媒するが、その基質特異性は幅広い。HADhlase が生成すると考えられる Ru1P と Fuc1P の構造が類似していることから、好塩性アーキアの FucA は Ru1P を DHAP と glycolaldehyde に開裂する反応を触媒する可能性を考えた。FucA 組換え型タンパク質を調製・解析したところ、Ru1P 開裂の逆反応、DHAP と glycolaldehyde の縮合反応を触媒でき、Ru1P aldolase である可能性が示唆された。以上より、好塩性アーキアにおいて R1P kinase, R15Pi, RuBP phosphatase および Ru1P aldolase により R1P を DHAP と glycolaldehyde へと代謝する新規糖代謝経路の存在が示唆された。

Archaea, sugar metabolism, halophile

講演番号：2E32p19
講演日時、会場：3 月 27 日 17:48～ E 校舎 32 会場

超好熱アーキア *Sulfolobus tokodaii* strain 7 由来 ST0452 タンパク質へ導入された変異の UDP-GlcNAc 合成活性に与える影響の解析

Analyses of mutation on the Sugar-1-phosphate Uridyltransferase Activities of Thermostable ST0452 Protein from *Sulfolobus tokodaii* strain 7

○本田 裕樹[1,2]、臧 茜[3]、清水 泰博[1]、大島 敏久[4]、張 子蓮[5]、河原林 裕[1,6]（[1]九州大院・農、[2]九州大・WPI-I2CNER、[3]九州大・農、[4]大阪工大・生命工学、[5]廈門大学、[6]産総研健康工学）
○Yuki HONDA[1,2], Qian ZANG[3], Yasuhiro SHIMIZU[1], Toshihisa OHSHIMA[4], Zilian ZHANG[5], Yutaka KAWARABAYASI[1,6] ([1]Fac. Agr., Kyushu Univ., [2]WPI-I2CNER, Kyushu Univ., [3]Kyushu Univ., [4]Osaka Inst. of Tech., [5]Xiamen Univ., [6]AIST)

【目的】*S. tokodaii* strain 7 由来 ST0452 タンパク質は、N 末側において糖 1 リン酸とヌクレオシド三リン酸との結合による NDP-糖合成反応を、C 末側においてアミノ糖 1 リン酸へのアセチル基転移反応を触媒することが明らかとなっている[1,3]。本酵素は高い安定性を示すとともに、基質特異性が緩いという特徴を有する一方、大腸菌由来の類縁酵素 GlmU と比較して活性の *k*cat 値が小さいことが課題とされた。そこで、糖ヌクレオチド合成活性の基質結合に関与すると推定されるアミノ酸残基を主にアラニンに置換した変異体を解析したところ、幾つかの変異体（ST0452-G9A、T80A、Y97A、Y97F、K147A）において、*N*-アセチルグルコサミン-1 リン酸（GlcNAc-1P）と UTP を基質とする UDP-GlcNAc 合成活性が向上することを明らかにしている[2]。本研究では、当該 ST0452 タンパク質が触媒する UDP-GlcNAc 合成活性に対する、多重変異導入の影響および以前の解析で最も活性上昇の高かった Y97 残基の他のアミノ酸への置換による効果を検討した。
【方法および結果】目的とするアミノ酸置換を有する ST0452 変異体遺伝子を大腸菌内で発現させた。50 mM Tris-HCl (pH 7.5)、1 mM UTP、10 mM GlcNAc-1P、10 ng 精製タンパク質を含む 20 μl の反応液を 80℃、2 分間保温することで反応させ、生成物を HPLC 分析することで活性を測定した。上記 5 つの変異を組合せた 9 種の多重変異体タンパク質では、野生型 ST0452 タンパク質と同様の熱安定性を有していたが、ほとんど活性が検出されなかった。このことは活性中心に同時に複数の変異が導入されると本酵素の活性に重大な影響を与えるものと考えられた。そこで、以前の解析で最も活性上昇率の高かった Y97 アミノ酸を他のアミノ酸に置換した変異体を作製した。これらの変異体タンパク質も野生型 ST0452 タンパク質と同様の熱安定性を有しており、幾つかの変異体は野生型 ST0452 タンパク質よりも高い UDP-GlcNAc 合成活性を示した。特に、Y97N 変異体タンパク質では UDP-GlcNAc 合成比活性が野生型 ST0452 タンパク質の活性と比較して 5.3 倍に向上した。以上の結果から、ST0452 タンパク質では活性中心のアミノ酸残基に導入された変異が UDP-GlcNAc 合成活性全体に大きな影響を与える事が示された。

[1] Zhang Z, et al., J. Biol. Chem., 280, 9698-9705 (2005).
[2] Zhang Z, et al., J. Biochem., 141, 553-562 (2007).
[3] Zhang Z, et al., J. Bacteriol. 192, 3287-3293 (2010).

Site-directed mutagenesis, *Sulfolobus tokodaii*, Thermostable protein

講演番号：2D12a02
講演日時、会場：3 月 27 日 09:11～ D 校舎 12 会場

新規脳梗塞治療薬 SMTP の非臨床および臨床開発
Nonclinical and clinical development of SMTP as a novel stroke drug
○蓮見 惠司[1,2]、西村 直子[2]、長谷川 啓子[2]、澤田 裕伸[2]、鈴木 絵里子[1]（[1]農工大応用生命化学、[2]株式会社ティムス）
○Keiji Hasumi[1,2], Naoko Nishimura[2], Keiko Hasegawa[2], Hironobu Sawada[2], Eriko Suzuki[1]
([1]Tokyo Noko University, [2]TMS Co., Ltd.)

【背景・目的】 SMTP は、真菌 *Stachybotrys microspora* 由来のトリプレニルフェノール代謝物の一群であり、血栓溶解酵素プラスミンの不活性前駆体プラスミノゲンのコンホーメーション変化を誘導し、生理的血栓溶解を促進する。SMTP 同属体のいくつかは、血栓性および塞栓性脳梗塞モデルで著効を示す。本発表では、SMTP 同族体の薬効薬理試験を中心とした非臨床試験の結果および臨床第 I 相試験の概要を説明する。

【結果・考察】 SMTP-7 は、60 種以上の SMTP 同族体の 1 つであり、優れた薬理活性を示す。SMTP-7 によるプラスミノゲン活性化促進作用は、プラスミノゲンのコンホーメーション変化に起因するものであるが、その作用にはリン脂質やガングリオシドなどの両親媒性内因性因子が必須であることを明らかにした。血栓中には豊富にリン脂質が含まれ、それゆえ、SMTP-7 は血栓中で効率的なプラスミノゲン活性化誘導すると考えられる。一般に、血栓溶解剤は止血の遅延を来すが、薬効用量の SMTP-7 は止血時間に影響しなかった。マウスおよびスナネズミの塞栓性脳梗塞モデルでは、臨床利用される組織プラスミノゲンアクチベーターt-PA よりも広い治療可能時間域を示した。霊長類（カニクイザル）の血栓性脳梗塞モデルでは、梗塞領域、浮腫、神経欠損症状の改善と梗塞性出血の抑制が確認された。また、カニクイザルの重篤な塞栓性脳梗塞モデルにおいて t-PA を凌ぐ薬効を示した。さらに、マウス脳虚血再灌流モデルでは、t-PA が梗塞性出血を助長するのに対し、SMTP-7 はそれを抑制することが明らかとなった。

t-PA は臨床上、脳梗塞後の出血リスクを増加せることが知られており、そのため、t-PA の適応は脳梗塞患者の 5%程度に限られている。本開発の結果から、SMTP 同族体のいくつかは、t-PA では治療できない患者を救う脳梗塞治療薬となり得ることが示された。

これらの優れた活性には、血栓溶解促進作用に加え、抗炎症活性が関わることも明らかとなった（鈴木絵里子ら「新規脳梗塞治療薬 SMTP の抗炎症作用機序の解析」参照）。

これまでに、GLP 毒性試験・安全性薬理試験、GMP 原薬・製剤製造検討等を完了し、2014 年 10 月から臨床第 I 相試験を開始した。本試験は、6 段階の用量漸増試験であり、SMTP 同族体の 1 つ（TMS-007）の、健康成人における安全性、忍容性を確認するとともに、薬物動態および薬力学を解析する。

stroke, thrombolysis, plasminogen

講演番号：2D12a03
講演日時、会場：3 月 27 日 09:22～ D 校舎 12 会場

新規脳梗塞治療薬 SMTP の抗炎症作用機序の解析
Investigation of the anti-inflammatory mechanism of the novel stroke drug SMTP
○鈴木 絵里子[1]、松本 直欣[1]、蓮見 惠司[1,2] ([1]東農工大農、[2]株式会社ティムス)
○ERIKO SUZUKI[1], NAOKI MATSUMOTO[1], KEIJI HASUMI[1,2] ([1]Tokyo Noko Univ., [2]TMS. Co. Ltd.)

【背景・目的】 *Stachybotrys microspora* triprenyl phenol (SMTP) は、当研究室において発見された生理活性低分子化合物の一群であり、plasminogen のコンホーメーション変化を誘導し、生理的 plasminogen 活性化を促進する。保有する 60 種余りの SMTP 同属体の 1 つである SMTP-7 には、げっ歯類および霊長類脳梗塞モデルにおける著効（梗塞領域の縮小、浮腫・神経症状・出血性変化の抑制等）が見出されている。同族体の 1 つについて、現在臨床第 I 相試験が進行中である。急性期脳梗塞治療の現状は、組織型 plasminogen activator (t-PA) に代表される血栓溶解型脳梗塞治療薬が唯一の推奨薬であるが、t-PA の治療対象となる患者が限定されるだけでなく、出血性変化等の重篤な副作用を免れず、本剤の適応は全脳梗塞患者の 5%程度にすぎない。SMTP-7 と t-PA との決定的な機序の差異は、血栓溶解作用に加うる抗炎症作用にある。抗炎症活性を有する SMTP 同族体には、plasminogen modulator 活性を有さないものもあったことから、我々は SMTP の新たな分子標的を探索し、soluble epoxide hydrolase (sEH) を同定した。sEH は抗炎症作用を有する脂肪酸エポキシド epoxyeicosatrienoic acid (EET) を不活性な dihydroxyeicosatrienoic acid (DHET) へと変換する酵素であり、その阻害は炎症制御等の薬理活性に関連する。本研究において、SMTP-7 による脳梗塞改善効果に、sEH 阻害を介した抗炎症作用が関与することを明らかにし、その阻害機序の詳細を解析した。

【結果・考察】 sEH は上述の epoxide hydrolase 活性とは独立した領域に脂質リン酸 phosphatase 活性を有する二機能性酵素である。SMTP-7 は、*in vitro* 酵素アッセイ系において epoxide hydrolase 活性、phosphatase 活性を共に阻害した。また、ヒト肝癌由来 HepG2 細胞においても、SMTP-7 処理による 14,15-DHET レベルの上昇、即ち sEH 阻害活性が認められた。我々は、さらに抗炎症作用における sEH 阻害の寄与について、ラットギランバレー症候群モデルを作製し、四肢の麻痺のスコアから神経症状を評価し、症状の緩和の見られた SMTP-7 投与群の血漿サンプルについて、48 種のエイコサノイドの定量解析を行った。その結果、SMTP-7 投与群に、生理食塩水投与群と比較して有意な血中 11,12-DHET レベルの減少が認められた。本研究より、SMTP-7 による優れた脳梗塞改善作用には plasminogen を介した血栓溶解作用と、sEH 阻害を介した抗炎症作用が相乗的に寄与していることが示唆された。即ち、sEH 阻害を介した抗炎症作用により、血栓溶解に伴う脳虚血再灌流障害後の組織周辺の炎症を抑制し、これが脳梗塞の病態改善に寄与するものと考えられる。SMTP 同族体は、既存の脳梗塞治療薬に取って代わる新規治療薬としてだけでなく、新たな抗炎症薬としての開発が期待される。

SMTP, ischemic stroke, soluble epoxide hydrolase

講演番号：2D12a04
講演日時、会場：3 月 27 日 09:33～ D 校舎 12 会場

新規微量ハイスループットスクリーニング法による海藻抽出物のアミロイドβ凝集阻害活性の評価
Evaluation of the inhibitory activity on amyloid-ß aggregation from seaweed extracts by a novel microliter-scale high-throughput screening system

○徳楽 清孝[1]、大柄 俊貴[1]、高橋 倫人[1]、安井 肇[2]、上井 幸司[1]([1]室蘭工大工、[2]北大水)
○Kiyotaka TOKURAKU[1], Toshiki Ogara[1], Tomohito Takahashi[1], Hajime Yasui[2], Koji Uwai[1] ([1]Muroran Inst. Tech., [2]Hokkaido Univ.)

アルツハイマー病の発症には脳内でのアミロイドβ（Aβ）凝集が関与しているため、Aβ凝集阻害物質はアルツハイマー病の予防薬や治療薬の有望なリード化合物として期待されている。我々は最近、量子ドットナノプローブを用いて Aβの凝集過程を蛍光顕微鏡下でリアルタイムイメージングする手法を発表した（Tokuraku *et al.*, PLOS ONE, 2009)。さらに、このイメージング手法を応用した Aβ凝集阻害物質の微量ハイスループットスクリーニング法（MSHTS 法）を開発、実際に本手法を用いて 52 種類の香辛料を対象に凝集阻害物質のスクリーニングを行い、ハーブ系香辛料抽出物が高い凝集阻害活性を有することを見いだした（Ishigaki *et al.*, PLOS ONE, 2013)。本 MSHTS 法は、サンプル量が 5 µl と微少量でハイスループット解析が可能であり、凝集阻害活性を EC_{50} 値として数値化できる。また、一般的なAβ凝集阻害活性評価法である ThT 法と比べ内部フィルター効果の影響が少ないため、植物粗抽出液のような夾雑物を多く含むサンプルであっても凝集阻害活性を評価することが可能である。本研究では、この MSHTS 法を用いて海藻抽出物の Aβ凝集阻害活性を評価した。

実験には北海道周辺で収集可能な 11 種 5 科の海藻類（ウガノモク、アカモク、ヒジキ、マコンブ、ガゴメコンブ、ワカメ、チガイソ、コジャラメ、アカバギンナンソウ、クロバギンナンソウ、フノリ）のエタノール抽出物および熱水抽出物を用いた。これらの Aβ凝集阻害活性を MSHTS 法によって評価したところ、全てのエタノール抽出物および熱水抽出物で Aβ凝集阻害活性が確認された。しかしながら、エタノール抽出物については活性の最も高かったヒジキで EC_{50} 値が 4.9 mg/ml と、香辛料で活性の最も高かったハーブ系香辛料のエタノール抽出物よりその活性は著しく低かった。一方、熱水抽出物については、EC_{50} 値が 0.013-0.42 mg/ml と、ハーブ系香辛料抽出物と同程度の Aβ凝集阻害活性を示した。さらに、海藻類熱水抽出物が添加された際の Aβ凝集体の蛍光顕微鏡画像を詳細に解析したところ、Aβ凝集線維の束化が抑制されていることが明らかになった。熱水抽出物の粘性が高かったことから、この束化抑制作用は熱水抽出物に含まれている多糖類の効果であることが示唆された。そこで、熱水抽出物の多糖類成分をエタノール沈殿により除去後、再度 MSHTS 法で解析したところ、束化抑制効果が見られなくなった。このことから、海藻類に含まれる多糖類は Aβ束化抑制効果を有することが明らかになった。近年、Aβ凝集体の形態が Aβ毒性に大きく影響することが明らかになりつつある。本研究により、MSHTS 法は Aβ凝集阻害活性だけでなく Aβ凝集体の形態に影響する物質のスクリーニングに拡張できる可能性が示唆された。

amyloid, Alzheimer, seaweed

講演番号：2D12a05
講演日時、会場：3 月 27 日 09:44～ D 校舎 12 会場

アミロイドβ 凝集阻害活性の向上を目的としたクルクミン誘導体の構造活性相関研究

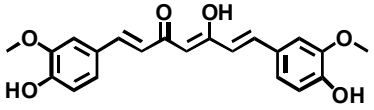
Structure activity relationship study of curcumin analogues toward the amyloid-beta aggregation inhibitor.

○二階堂 由莉、菊池 真理、今野 博行（山形大院理工・バイオ化学）
○Yuri NIKAIDO, Mari KIKUCHI, Hiroyuki KONNO (Yamagata Univ.)

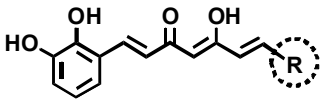
[目的]アルツハイマー病の原因物質として考えられているアミロイドβは，アミノ酸残基 40−42 の凝集性ペプチドであり，アミロイド前駆体タンパク質より切り出され産生する．このアミロイドβ高度凝集体が神経細胞死を引き起こしアルツハイマー病を発症すると考えられていることから，アミロイドβ凝集阻害はアルツハイマー病の根本治療となりえる．そのため，その阻害剤探索が世界中で活発に行われている．

2004 年小野らはウコンの主成分クルクミンにアミロイドβ凝集阻害活性があると報告した.[1] しかしながらクルクミンは難水溶性物質であるため，阻害メカニズムの解析等が非常に難しく未解明なことが多い．そこで我々は，クルクミンの芳香環上の置換基及びその位置を変更したクルクミン誘導体を設計，合成し，天然物を上回るアミロイドβ凝集阻害活性を有する水溶性化合物の創成研究を行っている.[2]

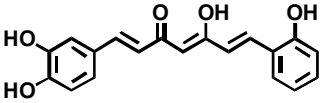
[方法と結果]設計したクルクミン誘導体の合成は Pabon 法を用いた.[3] また，合成したクルクミン誘導体のアミロイド凝集阻害活性評価はチオフラビン T 法ならびに TEM を用いた．その結果，一方の芳香環に隣り合う 2 つの水酸基を持つ「カテコール骨格」がアミロイドβの凝集阻害に有効であることを見い出した．特に *o-, m-*カテコール骨格をもつ数種類の誘導体(**A**)および *m-, p-*カテコール-*o-*フェノール誘導体(B)が高いアミロイドβ凝集阻害活性を示した．これらはいずれも高い水溶性を示した．安定配座の解析から誘導体分子内のねじれが水溶性の向上に重要であると考えた．細胞毒性試験，抗酸化作用の解析も含め，その詳細を報告する．



クルクミン



A



B

［参考文献］
1) Ono, K.; Hasegawa, K.; Naiki, H.; Yamada, M. *J. Neuro Research* **2004**, 75, 742-750.
2) Endo, H.; Nikaido, Y.; Nakadate, M.; Ise, S.; Konno, H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, 24, 5621-5626.
3) Pabon, H. J. J. *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* **1964**, 83, 379-386

Curcumin, Alzheimer's disease, Amyloid-beta

講演番号：2D12a06
講演日時、会場：3 月 27 日 10:05～ D 校舎 12 会場

リン脂質カルジオリピンのシトクロム c に対する結合部位の同定
Characterization of binding site of cardiolipin in cytochrome *c*

○安部 真人、田邊 有貴恵、三芳 秀人（京大農）
○Masato ABE, Yukie TANABE, Hideto MIYOSHI (Kyoto Univ.)

【背景と目的】カルジオリピン（CL）はミトコンドリア内膜に局在するリン脂質であり、4 本のアシル鎖からなる脂肪酸部と、2つのリン酸基および3つのグリセロール骨格からなる極性頭部を有している。ミトコンドリア経路によるアポトーシスの初動過程においては、CL とシトクロム*c*（cyt *c*）が複合体を形成することでペルオキシダーゼ活性を発現することが鍵反応だと考えられている。しかし、CL–cyt *c* 複合体形成の分子機構の詳細はわかっていない。CL–cyt *c* 複合体を形成する駆動力としては、(1) CL の極性頭部と cyt *c* の塩基性アミノ酸における静電的相互作用、(2) CL の脂肪酸部と cyt *c* の疎水性アミノ酸における疎水性相互作用が考えられている。本研究では CL の光反応性プローブを合成し、光親和性標識法によって cyt *c* に対する CL の各部位の結合部位をそれぞれ同定することを目的とした。

【方法】当研究室でこれまでに行ってきた構造活性相関研究に基づき、光反応性 CL（pCL–1 および pCL–2、 図 1）を設計・合成した。本研究では光反応性官能基としてジアジリン環を選択し、pCL–1 では脂肪酸部に、pCL–2 では極性頭部に配置した。また、アシル鎖のうち一箇所にクリックタグとして末端アルキンを導入することとした。これにより、光反応の後にクリック反応によって任意の検出基（蛍光基やビオチンなど）を導入することが可能となる。ホスファチジルコリンと pCL–1 または pCL–2 を混合してリポソーム（モル比、9 : 1）を作成し、実験に用いた。両化合物とも cyt *c* に対するペルオキシダーゼ誘導活性が確認できたので、光親和性標識法によって結合部位の同定を進めることとした。

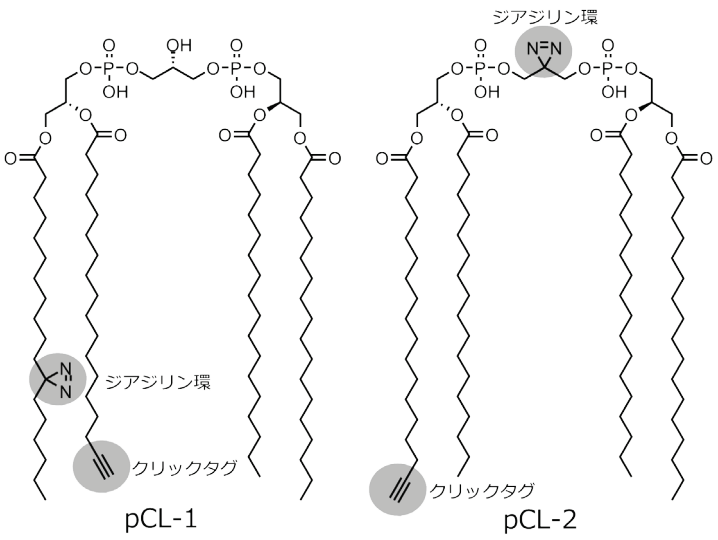


図 1.　pCL-1 および pCL-2 の化学構造

【結果】pCL–1 または pCL–2 で構成したリポソームに cyt *c* を結合させた後、UV 照射により光親和性標識した。続いて、各種電気泳動および精密質量分析を行って標識部位の解析を進めた。その結果、CL 脂肪酸部の結合部位は cyt *c* の3番目と4番目の helix の間に存在することがわかった。極性頭部について詳細な解析を進めている。

Cardiolipin, Cytochrome *c*, mitochondria

講演番号：2D12a07
講演日時、会場：3 月 27 日 10:16～ D 校舎 12 会場

出芽酵母ミトコンドリア VDAC におけるユビキノン結合部位の同定

Characterization of the ubiquinone-binding site in yeast mitochondrial voltage dependent anion channel(VDAC)

○奥田 絢香、村井 正俊、三芳 秀人（京都大農）
○Ayaka OKUDA, Masatoshi MURAI, Hideto MIYOSHI (Kyoto Univ.)

【背景・目的】ユビキノンに代表されるキノン類は、バクテリアから高等生物に至るまで幅広く分布する生理活性分子であり、その主な役割は呼吸鎖電子伝達系における基質（電子伝達担体）としてはたらくことである。また、近年の研究では、電子伝達には直接関与しないものの、ユビキノンを“補因子”として持つことで機能する「**ユビキノン結合性タンパク質**」の存在が幾つか示唆されている。ミトコンドリア外膜に存在する電位依存性アニオンチャンネル（VDAC）は、そうしたユビキノン結合性タンパク質の候補の一つであり、いわゆる膜透過性亢進と呼ばれるシトクロム *c* の細胞質への漏出など、アポトーシスの鍵現象に深く関与することが知られている。ユビキノンが膜透過性亢進の制御に関与するという報告は知られていたが、両者の相互作用を明確に実証した例はこれまでにない。本研究では、出芽酵母ミトコンドリアを実験材料として、独自に合成したユビキノンプローブを用いた光親和性標識実験を切り口に、VDAC とユビキノンの関係を明らかにすることを目的とした。

【結果】ユビキノンのキノン環とイソプレン側鎖末端に、それぞれアジド基とアルキンを導入したユビキノンプローブ（UQ-1、図 1）を合成した。本化合物は光親和性標識実験後に、クリックケミストリー（[3+2]環化付加反応）を利用して蛍光団やビオチンなど任意のタグを導入し、様々な生化学解析に供することを意図している。出芽酵母から単離したミトコンドリアを、UQ-1 によって光親和性標識し、クリックケミストリーによって各種タグ（図 1）を導入した。蛍光タグ（TAMRA）を導入したサンプルは、電気泳動後のゲルの蛍光観察を行なうことで、ビオチンタグ（図 1）を導入したサンプルは、アビジン沈降によるタンパク質の精製やウエスタンブロットを行なうことで、標識を受けたタンパク質の解析を進めた。その結果、VDAC がユビキノンに対して特異的な親和性を示すことを初めて見出した。プロテアーゼ限定消化によって VDAC における UQ-1 の結合部位の解析が現在進行中であり、その結果についても併せて報告を行なう予定である。

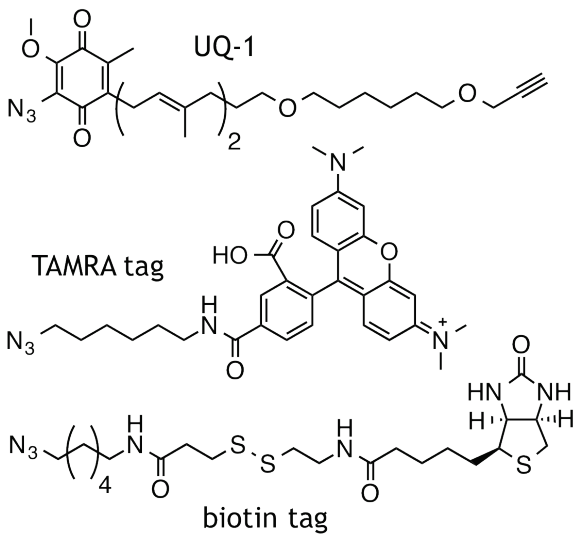


図 1. ユビキノンプローブ（UQ-1）とタグの構造

Ubiquinone, VDAC, Photoaffinity labeling

講演番号：2D12a08
講演日時、会場：3 月 27 日 10:27～ D 校舎 12 会場

ミトコンドリア複合体－I におけるアセトゲニンの結合部位の同定

Characterization of binding site of acetogenins in mitochondrial complex I

○平野 桂太郎、安部 真人、三芳 秀人（京都大農）
○Keitaro HIRANO, Masato ABE, Hideto MIYOSHI (Kyoto Univ.)

【目的】ミトコンドリア内膜に存在する NADH-ユビキノン酸化還元酵素（複合体-I）は、呼吸鎖電子伝達系の初発酵素で、NADH とユビキノンの酸化還元反応と、これに共役したプロトン輸送を担っている。プロトン輸送によって形成された電気化学ポテンシャル勾配は、ATP 合成やミトコンドリア内膜を介した物質の能動輸送に用いられる。アセトゲニン類はバンレイシ科植物の二次代謝産物で、複合体－ I の強力な阻害剤である。アセトゲニン類には THF 環部とラクトン環部という 2 つのファーマコフォアが存在している。当研究室でのこれまでの光親和性標識実験により、THF 環部の結合部位が複合体－ I の膜ドメインを構成する ND1 サブユニットであることを既に明らかにしている。そこで本研究では、残るラクトン環部について結合部位を同定することを目的とした。

【方法】当研究室で行ったアセトゲニン類の構造活性相関研究の知見に基づき、図1に示す光反応性アセトゲニンプローブ（DLA）を合成し、光親和性標識実験を行った。DLA はラクトン環部のごく近傍に光反応性官能基であるジアジリン環を有し、かつ側鎖部の先端にクリックタグとして用いる末端アルキンを有している。クリックタグを付けることにより、光反応を行った後に、水溶液中でクリック反応によって任意の検出基（蛍光基、ビオチンなど）を導入できる。

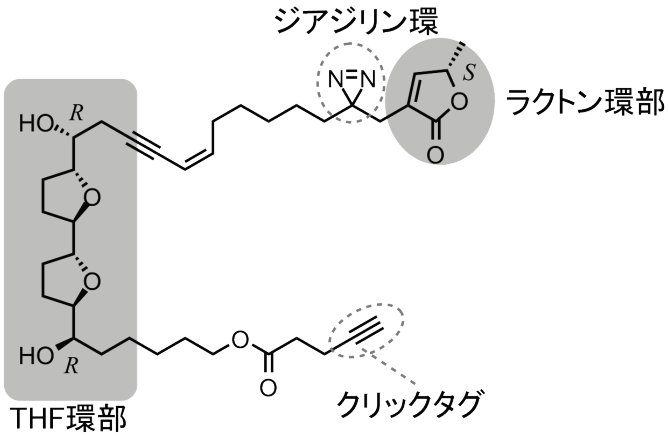


図1．DLA の化学構造

【結果と考察】DLA のウシ心筋ミトコンドリア複合体-I に対する阻害活性は、天然アセトゲニンと同等の極めて高い活性を維持しており、光親和性標識に供するプローブとして有効であることを確認した。ミトコンドリア内膜を用いた光親和性標識実験の結果、DLA は複合体-I を特異的に標識することがわかった。各種電気泳動の結果から、DLA は ND1 サブユニットに隣接する 49 kDa サブユニットに結合していることが明らかになった。現在、プロテアーゼ消化物の解析を行って、49 kDa サブユニット内の結合領域を詳細に調べている。

Complex I, Acetogenins, Mitochondria

講演番号：2D12a09
講演日時、会場：3 月 27 日 10:38～ D 校舎 12 会場

アミロライド類縁体のミトコンドリア複合体-I における結合部位の同定
Identification of the binding site of amilorides in mitochondrial complex I

○伊藤 剛、村井 正俊、森坂 裕信、三芳 秀人（京都大農）
○Takeshi ITO, Masatoshi MURAI, Hironobu MORISAKA, Hideto MIYOSHI (Kyoto Univ.)

【背景・目的】ミトコンドリア電子伝達系の初発酵素である NADH-キノン酸化還元酵素（複合体-I）は、基質の酸化還元を担う親水性ドメインとプロトン輸送を担う膜ドメインから構成される膜タンパク質複合体である。親水性ドメインの機能に関しては現在までに相当の知見が得られているが、膜ドメインの機能に関しての知見は極めて限られている。Na^+/H^+-アンチポーターの代表的な阻害剤であるアミロライド類縁体が、弱いながら複合体-I を阻害することが知られている。複合体-I の膜ドメインを構成する主要な 3 つのサブユニット（ND2, ND4, ND5）は Na^+/H^+-アンチポーターのホモログであるため、アミロライド類はこの 3 つのサブユニットのいずれか（あるいは全て）を阻害するものと考えられているが、これを実証した報告例はない。本研究では、複合体-I 阻害剤としてのアミロライド類の活性向上を目指した構造展開を進めると同時に、タンパク質修飾法の一つである“トシル化学”に利用できるアミロライドリガンドを合成し、位置特異的化学修飾によってウシ心筋複合体-I におけるアミロライドの結合部位を解明することを目指した。

【結果】アミロライドはピラジン環部とグアニジン部の 2 つの基本骨格からなる（EIPA、図 1）。構造展開ではグアニジン部に着目し、これをアアミド型に改変した一連の化合物を合成したころ、内部に 3 級アミンを含む化合物(例：化合物 A)の阻害活性が劇的に上昇することを見出した。続いて、トシル化学を利用して複合体-I のアミロライド結合部位を位置特異的にアルキン化することを計画し、アミロライドリガンド AmL1 および AmL2 を合成した。ウシ心筋亜ミトコンドリア粒子を材料にトシル化学に供したところ、当初の予想に反して、両リガンドは膜ドメインサブユニットではなく、ユビキノン結合部位を特異的にアルキン化することが分かった。

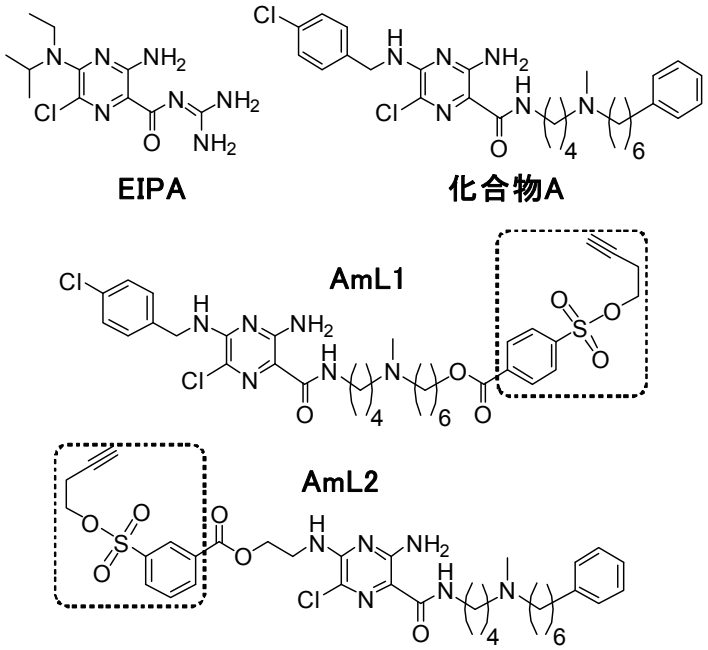


図 1. 市販のアミロライドである EIPA と構造展開によって得られた化合物 A, AmL1, AmL2 の構造.

NADH-ubiquinone oxidoreductase (complex I), mitochondria, amilorides

講演番号：2D12a10
講演日時、会場：3 月 27 日 10:49～ D 校舎 12 会場

ミトコンドリア複合体-I のピンポイント化学修飾

Pinpoint chemical modification of mitochondrial complex I

○桝谷 貴洋、村井 正俊、森坂 裕信、三芳 秀人（京大院・農・応用生命）
○Takahiro Masuya, Masatoshi Murai, Hironobu Morisaka, Hideto Miyoshi (Kyoto Univ.)

【背景・目的】 ミトコンドリア NADH-ユビキノン酸化還元酵素（複合体-I）は、基質の酸化還元と共役したプロトン輸送を行う膜タンパク質複合体である。2013 年に好熱細菌（*Thermus thermophilus*）複合体-I の X 線結晶構造が 3.3 Å の分解能で解かれ、酵素の大きな構造変化がプロトン輸送の駆動力になっている可能性が示唆された。そこで、蛍光発色団やマイクロビーズなどを駆使した“1 分子計測”で酵素の動きを捉えることができれば研究の大きな進展に繋がるが、未だ誰も着手できていない。本研究では、1 分子計測によって複合体-I の構造変化を直視することを将来的な目標に見据え、酵素を様々な機能性分子で位置特異的に化学修飾する方法論の確立を試みた。

【方法】 タンパク質修飾法である Ligand-Directed Tosyl Chemistry（トシル化学）に着目し、複合体-I に結合するリガンド分子（AL, 図 1）を合成した。トシル化学とは、リガンドの持つ高い結合親和性を利用して、リガンド分子内に組み込んだタグを標的タンパク質へ誘導し、求核置換によって固定させるというものである。標的タンパク質へタグを運ぶためのリガンド部には、複合体-I の強力な阻害剤であるアセトゲニンを選んだ。タグには末端アジドを採用し、これをタグ導入後の反応の足場として、2 次タグとなる蛍光発色団やビオチンなどの機能性分子をクリックケミストリー（[3+2]環化付加反応）により非破壊的に導入することを意図した。

【結果】 ウシ心筋亜ミトコンドリア粒子（SMP）と AL を 37˚C で 24 時間インキュベートしたところ、複合体-I のユビキノン結合ポケットを構成する 49 kDa サブユニットが特異的にアジド化された。LC-MS/MS によってアジド化部位の解析を進めた結果、ユビキノン結合部位の最深部を構成すると予想される 160 番目のアスパラギン酸（49 kDa Asp160）がアジド化されることがわかった。また、Asp160-N_3 を有する複合体-I を含む SMP を、蛍光基 TAMRA を持ち反応性に富む歪んだ環状アルキン（TAMRA-DIBO, 図 1）と 35 ˚C で 1 時間インキュベートし、Clear Native-PAGE により SMP を解析した。その結果、インタクトな複合体-I の Asp160-N_3 と TAMRA-DIBO が直接的に反応することがわかった。

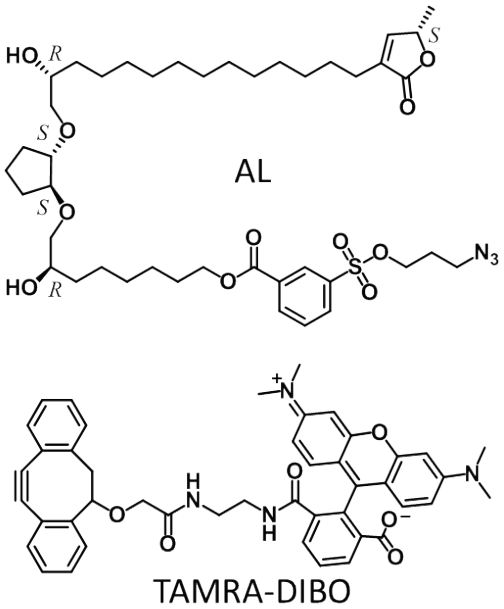


図1. 使用した化合物の構造

Mitichondrial NADH-quinone oxidoreductase (complex I), Ligand-directed tosyl chemistry, Acetogenin

講演番号：2D12a11
講演日時、会場：3 月 27 日 11:10～ D 校舎 12 会場

コレラ菌ナトリウム輸送型 NADH-ユビキノン酸化還元酵素(Na⁺-NQR)におけるユビキノン結合部位の同定

Identification of the ubiquinone-binding site in Na⁺-pumping NADH-ubiquinone oxidoreductase from *Vibrio cholerae*

○二ノ倉 聡[1]、村井 正俊[1]、BARQUERA Blanca[2]、三芳 秀人[1] ([1]京大院農・応用生命、[2]レンセラー工科大学)
○Satoshi NINOKURA[1], Masatoshi MURAI[1], Blanca BARQUERA[2], Hideto MIYOSHI[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Rensselaer Polytechnic Institute)

【背景・目的】ナトリウム輸送性 NADH-ユビキノン酸化還元酵素(Na⁺-NQR)は、基質の酸化還元と共役したナトリウムイオンの輸送を行なう酸化還元酵素であり、NqrA-F までの 6 つのサブユニットから構成される膜タンパク質複合体である。本酵素は海洋性ビブリオ菌や一部の病原性細菌など、ATP 合成の駆動力としてナトリウムイオンを利用する微生物に特有の NADH 脱水素酵素であり、哺乳類の持つ NADH 脱水素酵素（プロトン輸送性 NADH-ユビキノン酸化還元酵素、複合体-I）とは、構造的にも進化的にも全く異なるタンパク質である。したがって、本酵素の基礎研究の進展は、病原性細菌を標的とした新規な医薬の開発に資するところが大きい。本研究では、合成ユビキノンプローブを用いた光親和性標識実験を切り口に、コレラ菌（*Vibrio cholerae*）由来の Na⁺-NQR におけるユビキノン結合部位を明らかにすることを目的とした。

【結果】ユビキノンのベンゾキノン環とイソプレン側鎖末端に、それぞれアジド基とアルキンを導入したユビキノンプローブ（UQ-2、図 1）を合成した。本化合物は光親和性標識実験後に、クリックケミストリー（[3+2]-環化付加反応）を利用して蛍光団（TAMRA、図 1）など任意の検出タグを導入し、様々な生化学解析に供することを意図した。コレラ菌より精製された Na⁺-NQR における UQ-2 の電子受容活性を評価したところ、天然型ユビキノンと同等の良好な活性を有していることを確認した。続いて、Na⁺-NQR を UQ-2 により光親和性標識し、クリックケミストリーによって TAMRA を導入した。SDS-PAGE により Na⁺-NQR を分離したところ、本酵素を構成する 6 つのサブユニットの中で“NqrA”と呼ばれる約 50 kDa の質量を持つサブユニットに TAMRA に由来する強い蛍光が観察された。また、本サブユニットへの UQ-2 の特異的結合は、過剰量の天然型ユビキノンによって強く抑制された。さらに、UQ-2 で標識された NqrA サブユニットに対して、V8-プロテアーゼによる限定消化を進めた結果、ユビキノン結合部位は NqrA サブユニットの N 末端側に近い領域(Met1-Glu106, 11.5 kDa)に存在することが分かり、本領域がユビキノンの結合において重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

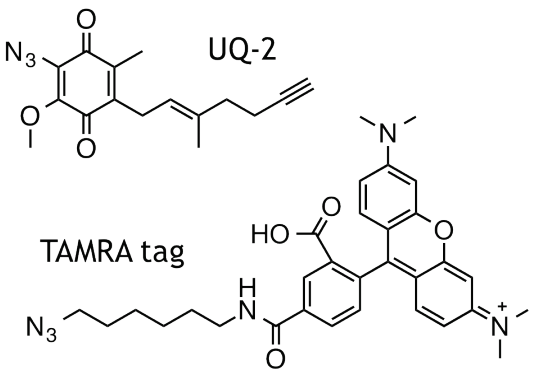


図 1. ユビキノンプローブと TAMRA タグの構造.

ubiquinone, Na⁺-pumping NADH-ubiquinone oxidoreductase (Na⁺-NQR), *Vibrio cholerae*

講演番号：2D12a12
講演日時、会場：3 月 27 日 11:21～ D 校舎 12 会場

スピロソルビシリノール A 結合タンパク質の探索
Identification of Target Proteins of Spirosorbicillinol A

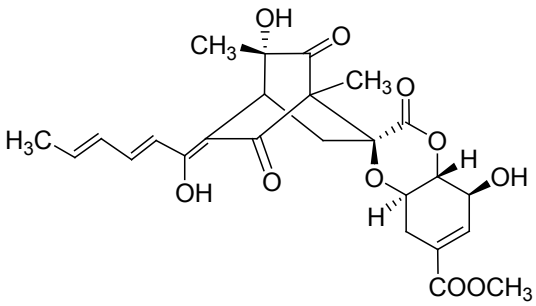
○水野 麻里奈[1]、谷口 友梨[1]、志村 聡美[1]、松永 大輝[1]、明畠 佑典[1]、草柳 友恵[1]、九十田 千子[1]、水品 善之[2,3]、紙透 伸治[1]、菅原 二三男[1] ([1]東京理大・理工、[2]神戸学院大・栄養、[3]神戸学院大・LSC)
○Marina MIZUNO[1], Yuri TANIGUCHI[1], Satomi SHIMURA[1], Hiroki MATSUNAGA[1], Yusuke MYOBATAKE[1], Tomoe KUSAYANAGI[1], Senko TSUKUDA[1], Yoshiyuki MIZUSHINA[2,3], Shinji KAMISUKI[1], Fumio SUGAWARA[1] ([1]Faculty of Sci. & Technol., Tokyo Univ. of Sci., [2]Faculty of Nutrition, Kobe Gakuin Univ., [3]LSC, Kobe Gakuin Univ.)

スピロソルビシリノール A (SSA) (下図) は、 Washida らによってツチアオカビから単離された天然有機化合物である[1)]。一方、我々は鳥取県のコケより単離した真菌から SSA を再発見した。その構造はユニークな骨格を有しており、高濃度でのラジカル捕捉活性のみが知られているが、その他の生理活性は報告されていない。そこで、その生理活性を見出すことを目的とし、種々の生理活性試験を行った。その結果、以下の試験において SSA の効果が示唆された。

1) マウスを用いた抗炎症活性試験　マウス耳介を用いて起炎剤 TPA で誘導した炎症（浮腫）に対する抗炎症活性試験の結果、SSA (500 μg/ 耳) の塗布により 40% 以上の抗炎症活性が示された。

2) Cisplatin (CDDP) 増感試験　抗癌剤 CDDP と共に SSA を添加することで、HeLa 細胞において CDDP の効果を増大する結果が得られた。

これらの結果より、SSA は抗炎症活性と CDDP 増感作用を持つことが明らかとなった。そこで、その作用機序解明を目的として T7 ファージディスプレイ法を用いた SSA 結合タンパク質の探索に着手した。15 アミノ酸のランダムな配列を外殻に提示するファージライブラリーを用いた選抜試験により、SSA 結合候補ペプチドを得た。得られたペプチド配列を FASTAskan プログラムに供し、結合タンパク質の同定を試みた。その結果得られたタンパク質群のうち、Cisplatin resistance-associated-overexpressed protein (CROP) に着目した。CROP は CDDP 耐性株で過剰発現するタンパク質として発見されたタンパク質であり、RNA スプライシングへの関与が示唆されている。現在は SSA と CROP の相互作用の検証を進めている。



【参考文献】

1) Washida, K.; Abe, N.; Sugiyama, Y.; Hirota, A. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **2009**, *73*, 1355-1361.

natural product, anti-inflammation, phage display

講演番号：2D12a13
講演日時、会場：3 月 27 日 11:32～ D 校舎 12 会場

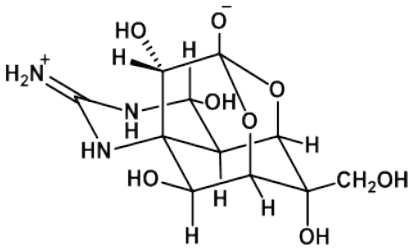
電位依存性ナトリウムチャネルのサブタイプを識別するテトロドトキシン類縁体の探索

Screening of tetrodotoxin analogs that distinguish specific subtypes of the voltage-dependent sodium channels

○千葉 雪絵[1]、塚本 匡顕[1]、長 由扶子[1]、安立 昌篤[2]、榊原 良[2]、所 聖太[2]、中崎 敦夫[2]、石川 裕生[2]、西川 俊夫[2]、山下 まり[1]、此木 敬一[1] ([1]東北大院農、[2]名古屋大院農)
○Yukie Chiba[1], Tadaaki Tsukamoto[1], Yuko Cho[1], Masaatsu Adachi[2], Ryo Sakakibara[2], Shouta Tokoro[2], Atsuo Nakazaki[2], Yuki Ishikawa[2], Toshio Nishikawa[2], Mari Yotsu-yamashita[1], Keiichi Konoki[1] ([1]Tohoku Univ., [2]Nagoya Univ.)

【目的】

テトロドトキシン(Tetrodotoxin, TTX)は電位依存性ナトリウムチャネル(Na_v)に対する強力な阻害剤である。Na_v1 型には $Na_v1.1$-$Na_v1.9$ までの 9 つのサブタイプが存在し、発現部位や機能性が異なる。TTX は $Na_v1.1$-1.4, $Na_v1.6$-1.7 に感受性を示し、$Na_v1.5$、$Na_v1.8$ -1.9 に対して非感受性である。TTX は必ずしもサブタイプ選択性の高い化合物とは言えないが、TTX 類縁体あるいはその合成中間体の中からサブタイプ選択性の高い化合物が見つかれば、その有用性は計り知れない。本研究では、天然もしくは化学合成より調達した TTX とその類縁体の各種 Na_v に対する結合性を調べることを目的とした。



Tetrodotoxin (TTX)

【方法】

(1)pCDM8 ベクターに挿入したヒト由来の $Na_v1.2$ ($hNa_v1.2$)、$Na_v1.4$ ($hNa_v1.4$)、$Na_v1.5$ ($hNa_v1.5$) と GFP をコードする pCMFlag EGFP を用いて HEK293T 細胞をトランスフェクションした。当該遺伝子が共発現すると緑色蛍光性を示し、また、ネオマイシン系抗生物質に対して耐性を獲得することがわかっている。そこで、抗生物質 G418 の存在下、各 hNa_v1 型を発現する細胞のみを選択的に培養し、安定発現細胞の構築を試みた。

(2)Nanion 社の Port-A-Patch システムを用いたホールセルパッチクランプ実験を行って Na^+電流を記録し（ホールセル記録)、TTX 関連化合物による阻害活性を調べた。

【結果と考察】

(1)$hNa_v1.4$、$hNa_v1.5$ ならびに $hNa_v1.2$ を安定発現する HEK293T 細胞の構築に成功した。

(2) $hNa_v1.4$ を安定発現する HEK293T 細胞を用いてホールセル記録を行い、TTX の IC_{50} 値を 10 nM と決定し、文献値に準ずる値として得られたため、安定発現細胞の樹立を確定した。

(3)同様に、$hNa_v1.5$ 安定発現細胞を用いてホールセル記録を行い、TTX の IC_{50} 値を 1.2 μM と決定し、文献通り TTX 非感受性であることが確認された。さらに、別の化合物の IC_{50} 値を調べたところ、従来 TTX 抵抗性があるとされてきた $hNa_v1.5$ を強力に阻害することが判明した。現在、マニュアル型パッチクランプ装置にて再現性を確認しつつ、この化合物のサブタイプ選択性を調査中である。

Voltage-dependent sodium channels, Tetrodotoxin, Patch clamp recording

講演番号：2D12a14
講演日時、会場：3 月 27 日 11:43～ D 校舎 12 会場

アミロイド β 42 ダイマーの合成と活性評価

Synthesis and biological activities of amyloid ß 42 dimer

○徳田 真樹[1]、村上 一馬[1]、鈴木 天志[1]、花木 瑞穂[1]、岩崎 真実[2]、久米 利明[2]、入江 一浩[1]([1]京都大院農、[2]京都大院薬)

○ Maki TOKUDA[1], Kazuma MURAKAMI[1], Takashi SUZUKI[1], Mizuho HANAKI[1], Mami IWASAKI[2], Toshiaki KUME[2], Kazuhiro IRIE[1] ([1]Graduate School of Agriculture, Kyoto University, [2]Graduate School of Pharmaceutical Science, Kyoto University)

【背景と目的】アルツハイマー病（AD）の原因物質である 40，42 残基のアミロイド β タンパク質（Aβ40，Aβ42）は，分子間 β シート構造を形成して凝集し，神経細胞毒性を示す．近年，毒性本体とされる準安定な可溶性オリゴマーは，2 量体あるいは 3 量体を基本構成単位とした 2 種類の経路（2 x *n* 量体，3 x *n* 量体）により形成されるものと考えられている．しかしながら，Aβ オリゴマーの立体構造に関する情報は限られている．本研究グループはこれまで，毒性が強い Aβ42 凝集体において，Glu22，Asp23 残基付近でのターン構造を特徴とした毒性コンホマーの存在を明らかにし，本コンホマーが分子間平行 β シートを形成した 2 量体（毒性オリゴマー）モデル構造を提唱した.[1)] 昨年，このモデル構造に基づき Aβ40 の 2 量体（Ala30 で架橋）を合成したが，ラット初代培養神経細胞に対してまったく毒性を示さなかった.[2)] そこで本研究では，C 末端領域に疎水性コアを有する Aβ42 の 2 量体を合成し，その物理化学的性質および神経細胞毒性を調べることにより，AD 発症における毒性オリゴマー構造に関する知見を得ることを目的とした．

【方法と結果】毒性コンホマー構造を形成しやすい E22P 変異体とし，疎水性 C 末端領域の Val40 残基の代わりに，L,L-2,6-ジアミノピメリン酸（DAP）で置換することによって架橋することを計画した．固相合成中に近接したペプチド鎖どうしが分子間平行 β シート構造を形成することにより，側鎖伸長が阻害されないように，Gly25，Ser26 残基をシュードプロリンジペプチドである Gly-Ser (ψ pro) に置換して合成した．その結果，単離収率 5.5%で目的とする Aβ42 の 2 量体を高純度で得ることができた（図 1）．本 2 量体の凝集能を，HPLC を用いた遠沈法で評価した結果, 遠心沈降するような高分子量の凝集体を形成しなかった．一方，CD 測定より本 2 量体は，β シート構造を形成していることが明らかになったが, ラット初代培養神経細胞を用いた MTT 試験では, まったく毒性を示さなかった．今後, 架橋位置を変えた分子内平行 β シート構造型の 2 量体を合成し, 毒性オリゴマーモデルとして妥当か検討する．

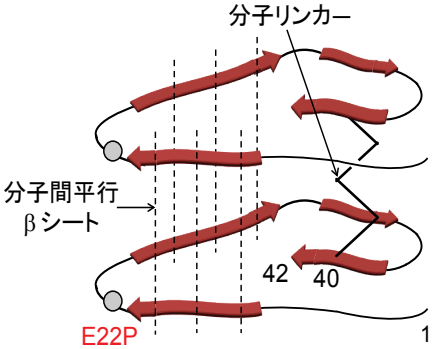


図 1 Aβ42 の分子間平行 β シート型 2 量体のモデル構造

【参考文献】1) Murakami, K. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2014**, *78*, 1293-1305

2) 鈴木ら，*日本農芸化学会 2014 年度大会（東京）*，3A05p20

Amyloid ß, Oligomer, Neurotoxity

講演番号：2D12a15
講演日時、会場：3 月 27 日 11:54～ D 校舎 12 会場

Thermostability of phosphoserine phosphatase with intermolecular disulfide bond from *Hydrogenobacter thermophilus*, TK-6

○KeugTae KIM[1], Yoko CHIBA[2], Hiroyuki ARAI[1], Masaharu ISHII[1] ([1]Tokyo Univ., [2]Tsukuba Univ.)

We have recently identified novel metal-independent phosphoserine phosphatases (iPSPs) that belong to the histidine phosphatase superfamily from *Hydrogenobacter thermophilus*, a chemolithoautotrophic bacterium belonging to the order Aquificales. There are two species of iPSPs, iPSP1 and iPSP2, in *H. thermophilus*. iPSP1 is a homodimer consisting of two identical PspA subunits, whereas iPSP2 is a heterodimer consisting of PspA and PspB subunits. Analysis of the crystal structure of iPSP1 has shown that there is an intermolecular disulfide bond between the two PspA subunits. In this work, we found that the purified iPSP2 also has the intermolecular disulfide bond between PspA and PspB. The intermolecular disulfide bond of iPSP2 was indispensable for the thermostability of the enzyme. The iPSP2 mutant that has no disulfide bond was important to thermal denaturation and the PspB subunit without the disulfide bond precipitated over 75°C. After incubation at 90°C for 10 min, 40% of the wild-type iPSP2 remained non-denatured, whereas only 2.5% of the iPSP2 mutant without the disulfide bond was non-denatured.

Considering the reductive intracellular environment, disulfide bonds in intracellular proteins are generally found in reduced forms with free sulfhydryl groups. However, analysis of the disulfide bonds in cell lysate of *H. thermophilus* showed that there are lots of proteins with disulfide bonds *in vivo*, suggesting that both iPSP1 and iPSP2 have the intermolecular disulfide bonds *in vivo*. We also performed phylogenetic analysis of iPSPs from various organisms and found that growth temperature of the organisms is associated with the specific location of cysteine residues in their iPSPs.

thermostability, intermolecular disulfide bond

講演番号：2D12p01
講演日時、会場：3 月 27 日 14:00～ D 校舎 12 会場

ポリ-ガンマ-グルタミン酸生合成促進活性を有する納豆菌由来の ComX フェロモンの発見

Identification of ComX pheromone derived from Bacillus subtilis subsp. natto

○林 峻輔、宇佐美 翔平、中村 優太、尾崎 弘貴、岡田 正弘（中部大院応生）
○Shunsuke HAYASHI, Syohei USAMI, Yuta NAKAMURA, Koki OZAKI, Masahiro OKADA (Chubu Univ.)

＜概要及び目的＞

枯草菌は、クオラムセンシングによって形質転換を引き起こす。その現象を誘導するオリゴペプチドフェロモンが ComX フェロモンである。ComX フェロモンは、翻訳後修飾により C 末端付近に存在するトリプトファンがイソプレニル化されており、その前駆体である ComX ペプチドから修飾酵素 ComQ によって生合成される。一方で、枯草菌の近縁種である納豆菌も枯草菌と同様に、ComX フェロモンを分泌すると考えられており、さらに、納豆のネバネバの原因物質である、ポリ-ガンマ-グルタミン酸の生合成を誘導すると考えられている。しかしながら、納豆菌由来の ComX ペプチドにはトリプトファンが一つ含まれているものの C 末端付近にはなく、ComX フェロモンの存在が確認されていない。そこで、納豆菌の ComX フェロモンの化学構造と生理活性を明らかにすることを目的に研究を行った。

＜方法及び結果＞

納豆菌由来の *comQX* 遺伝子クラスターを PCR で増幅後、In-Fusion 法を用いて pET-15b ベクターに組み込むことでプラスミドベクターを作成し、大腸菌に形質転換して ComQ および ComX を発現させた。続いて、作製したプラスミドベクターを鋳型に ComX ペプチドのトリプトファンをアラニンに置換させたプラスミドベクターを作成し、大腸菌に形質転換して ComQ および ComX アラニン置換体を発現させた。それぞれの培養上清を固相抽出の後 LC-MS を用いて分析した結果、ComQ および ComX 発現大腸菌の培養上清にのみ、特徴的な分泌物が検出された。さらに、この物質を MS/MS を用いて分析した結果、トリプトファンがファルネシル基分だけ増加した修飾ペプチドであることがわかり、納豆菌由来の ComQ は、ComX ペプチドのトリプトファンをファルネシル化する修飾酵素であることが判明した。さらに、修飾ペプチドを添加して、納豆菌を培養したところ、ポリ-ガンマ-グルタミン酸の生合成が増加したことから、発見した修飾ペプチドはポリ-ガンマ-グルタミン酸の生合成を誘導する ComXnatto フェロモンであることが判明した。

Bacillus subtilis, Quorum sensing, Post-translational modification

講演番号：2D12p02
講演日時、会場：3 月 27 日 14:11～ D 校舎 12 会場

ポリ-ガンマ-グルタミン酸生合成促進活性を有する納豆菌由来の ComX フェロモンの化学合成
Chemical synthesis of ComX pheromone derived from Bacillus subtilis subsp. natto

○中村 優太、宇佐美 翔平、林 峻輔、尾崎 弘貴、岡田 正弘（中部大院応生）
○Yuta NAKAMURA, Syohei USAMI, Shunsuke HAYASHI, Koki OZAKI, Masahiro OKADA (Chubu Univ.)

＜概要及び目的＞

枯草菌は、クオラムセンシングによって形質転換を引き起こす。その形質転換を誘導するオリゴペプチドフェロモンが ComX フェロモンである。ComX フェロモンは、翻訳後修飾により C 末端付近に存在するトリプトファンがイソプレニル化されており、前駆体である ComX ペプチドから修飾酵素 ComQ によって生合成される。一方で、枯草菌の近縁種である納豆菌も同様に、ComX フェロモンを分泌すると考えられており、さらに、納豆のネバネバ原因物質である、ポリ-ガンマ-グルタミン酸生合成を誘導すると考えられている。しかしながら、納豆菌由来の ComX ペプチドはトリプトファンが含まれているものの C 末端付近にはない。また、実際に ComX フェロモンの存在が確認されてはいない。そこで、納豆菌由来の ComX の化学構造と生理活性を明らかにすることを目的に研究を行った。

＜方法及び結果＞

共同研究者が報告したとおり、納豆菌由来の ComXnatto フェロモンは、ポリ-ガンマ-グルタミン酸の生合成を誘導する、トリプトファンがファルネシル化された修飾ペプチドであることが判明した。そこで、ComXnatto フェロモンを化学的に合成することで、その化学構造を証明することにした。まず、アミノ基をベンゾイル保護したトリプトファンのメチルエステル体の環化を行い三環性化合物へと導いた。次に、C 選択的にファルネシル化した後、DIBAL を用いた還元的脱保護により、Bz 基を除去し、生じたアミンを Fmoc 基で再び保護した。続くイミンの選択的還元において、ゲラニルトリプトファンの合成ではカテコールボランを用いていたが、ファルネシルトリプトファンの場合では精製が困難であり、収率も低かった。そこで、ボラン試薬や、反応条件の検討を行った。その結果、水素化ホウ素リチウムを用いた場合に、反応は速やかに進行し、収率は中程度ながら精製も容易となった。続いて、Fmoc 基の脱保護を行った後にオープンカラムによる精製によって光学的に純粋なメチルエステル体を得た。水酸化リチウムでメチルエステルの加水分解後、再び Fmoc 化を行い目的のファルネシルトリプトファンの Fmoc 体を合成した。続いてペプチド固相合成法により、合成したファルネシルトリプトファンの Fmoc 体と各種アミノ酸の Fmoc 体を縮合させた後に、固相から切り出して目的の ComXnatto フェロモンを合成した。

Bacillus subtilis, Quorum sensing, Post-translational modification

講演番号：2D12p03
講演日時、会場：3 月 27 日 14:22～ D 校舎 12 会場

翻訳後修飾によりトリプトファンがイソプレニル化された新規ペプチドの探索
Screening of a novel post-translational tryptophan isoprenyltransferase and modified peptide
○宇佐美 翔平、林 峻輔、中村 優太、尾崎 弘貴、岡田 正弘（中部大院応生）
○Syohei USAMI, Shunsuke HAYASHI, Yuta NAKAMURA, Koki OZAKI, Masahiro OKADA (Chubu Univ.)

＜概要および目的＞

枯草菌のオリゴペプチド型のクオラムセンシングフェロモンである ComX フェロモンは、C 末端から 2~4 番目のトリプトファン残基のインドール環の 3 位にイソプレニル基が結合し、それに伴い、プロリン様の五員環が生成し三環性骨格を形成するという特徴的な翻訳後修飾を受けている。翻訳後修飾によるイソプレニル化として C 末端のシステイン残基のイソプレニル修飾があるが、この翻訳後修飾は、そのコンセンサス配列が明らかにされ、相同性検索などから真核生物に普遍的に存在することが明らかになっている。しかしトリプトファンの場合は、菌株ごとに ComX フェロモンのアミノ酸配列が大きく異なるためにコンセンサス配列は解明されておらず、現在までに枯草菌以外からは発見されていない。そこでトリプトファンの翻訳後修飾によるイソプレニル化の普遍性の解明を目的として、修飾酵素に着目したイソプレニルトリプトファンを有する修飾ペプチドの探索を行い、構造の決定および生物活性を明らかにすることを目指した。

＜方法および結果＞

ComXフェロモンの生合成酵素ComQと相同性の高い枯草菌以外の細菌の候補タンパクのオープンリーディングフレームを大腸菌に導入した。候補タンパクを過剰発現させた菌体を回収した後に、超音波破砕を行うことで、粗酵素溶液を調製した。また、同様にしてC末端から2~3番目にトリプトファン残基を有する基質溶液を調整した。それぞれ調製した粗酵素溶液と基質溶液に別途調製したファルネシル二リン酸溶液を混合し、マグネシウムイオンの存在下、*in vitro* 酵素反応を行った。得られた反応液をLC/MSを用いて分析した結果、ファルネシル基分の分子量が増大した修飾トリプトファン残基を有する修飾ペプチドを検出することに成功した。次に三環性構造を有するファルネシルトリプトファンを立体選択的に化学合成し、続いて各アミノ酸を縮合させ、目的の修飾ペプチドを合成した。*in vitro* 酵素反応によって得られた修飾ペプチドと、化学合成した修飾ペプチドをLC/MS分析により比較したところ、保持時間などが一致したことから、ファルネシルトリプトファンを有する修飾ペプチドであることを証明した。

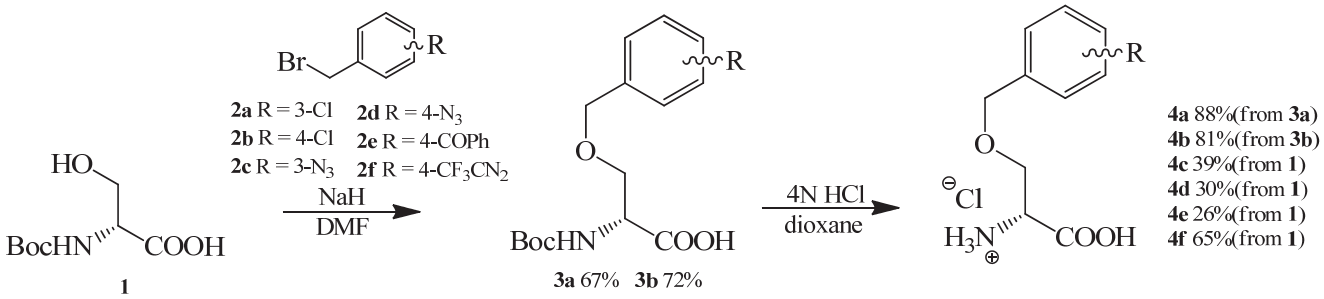
Quorum sensing, Post-translational modification, Isoprenylation

講演番号：2D12p04
講演日時、会場：3 月 27 日 14:33～ D 校舎 12 会場

光反応性 O-benzyl-D-serine 誘導体の合成
Synthesis of photoreactive O-benzyl-D-serine derivatives
○吉田 卓真[1]、橋床 泰之[2]、橋本 誠[2] ([1]北大農、[2]北大院農)
○Takuma YOSHIDA[1], Yasuyuki HASHIDOKO[2], Makoto HASHIMOTO[2] ([1]Hokkaido Univ., [2]Hokkaido Univ. Research Faculty of Agriculture)

【背景】D-アミノ酸類は人の味覚に対して甘味を呈するものが多いことが知られているが、その呈味性に関与する分子機構について未だ研究の余地が残されている。光アフィニティラベリング法は、生理活性物質と生体分子の特異的相互作用を利用することで、その生体分子の特性・機能解析や基質認識部位を特定する手法のひとつである。この手法を用いるためには、既知の生理活性物質の構造に光反応性基を有機化学的に導入することが必要不可欠である。そこで今回 D-アミノ酸類の一種である *O*-benzyl-D-serine に着目し、ベンジル基上に光反応性基を導入した誘導体の合成を検討した。

【方法・結果】*N*-(*tert*-butoxycarbonyl)-D-serine(**1**)を出発原料とし、水素化ナトリウム存在下での benzylbromide 誘導体(**2**)とのカップリング反応・脱保護反応による、*O*-benzyl-D-serine 誘導体(**4**)の合成を検討した。芳香環上 3 位もしくは 4 位塩化物誘導体の合成において、カップリング反応の単離収率 67～72%と良好な収率で生成物(**3a**, **b**)が得られた。続く、Boc 基の脱保護反応では単離収率 80%以上で脱保護され、塩酸塩として目的生成物(**4a**, **b**)が得られた。また Boc 保護体である **3a, b** を単離することなく **4a, b** とした後に精製することも可能であった。光反応性基である azide, benzophenone, diazirine の benzylbromide 誘導体(**2c-f**)をこの反応に適用することで、光反応性 *O*-benzyl-D-serine 誘導体の化学合成を試みた。azide 基を有する **2c, d** を用いた場合、2 段階で 30～40%の収率で目的の化合物(**4c, d**)が得られた。benzophenone 骨格を持つ **2e** は、反応系中で **1** と縮合するよりも速く benzylbromide が benzylalchol へと分解されることが観察されたが、水素化ナトリウム等量を調節することにより、目的の生成物(**4e**)が得られた。2,2,2-trifluoromethyl-3*H*-diazirinyl 基をもつ **2f** を用いると効率的に反応が進行し、65%の収率で目的の光反応性 *O*-benzyl-D-serine 誘導体(**4f**)が得ることに成功した。現在合成した光反応性 *O*-benzyl-D-serine 誘導体の光分解性について検討中である。



photoaffinity label, diazirine, phenylazide

講演番号：2D12p05
講演日時、会場：3 月 27 日 14:44～ D 校舎 12 会場

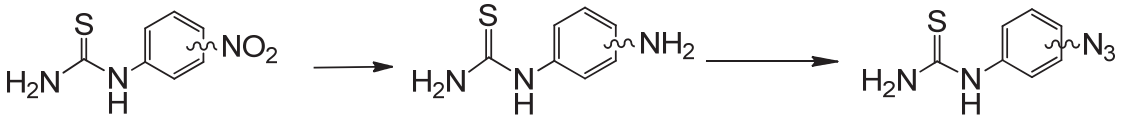
味覚認識機構解明を指向した光反応性 phenylthiourea 類の合成

Synthesis of the photoactive phenylthiourea derivatives to elucidate gustatory receptors

○石田 明子[1]、橋床 泰之[2]、橋本 誠[2] ([1]北大農、[2]北大院農)
○Akiko ISHIDA[1], Yasuyuki HASHIDOKO[2], Makoto HASHIMOTO[2] ([1]Hokkaido Univ., [2]Hokkaido Univ. Research Faculty of Agriculture)

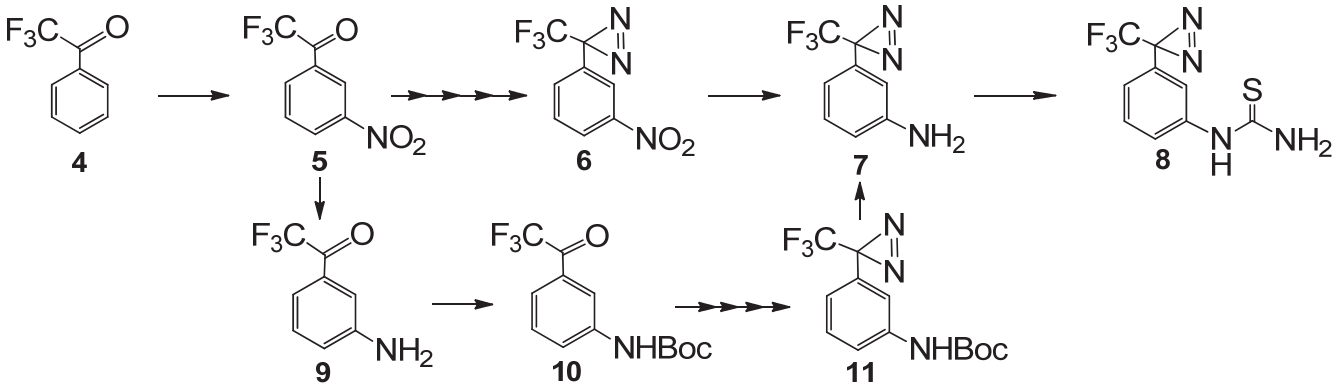
【研究背景】phenylthiourea 類は強い苦味物質であるが、これを認識する苦味受容体 TAS2R38 の発現は遺伝によって決まるため、味認識の観点から注目を集めている。phenylthiourea 類の生理活性発現機構を解明するために、光アフィニティーラベル試薬の合成を立案し、光反応性基 azide および diazirine を導入した化合物群の合成を試みた。

【方法・結果】4-azide 誘導体(**3a**)は、ニトロ誘導体 **1a** を原料とし、Fe による還元でアミン体 **2a** としたのち、$NaNO_2$ によるジアゾ化、NaN_3 によるアジド化によって合成した。3-azide 誘導体(**3b**)もニトロ誘導体 **1b** を原料とし、同様な合成方法により得ることができた。



1a (4-) , **1b** (3-)　　**2a** (4-) , **2b** (3-)　　**3a** (4-) , **3b** (3-)

アニリン型 diazirine 誘導体(**7**)は有用であると認識されているが、効率的な合成法が確立されていないのが現状であるため、再検討を行った。**4** を出発原料とし、メタ位をニトロ化して **5** としたのち、４段階を経て **6** を合成した。diazirine のニトロ誘導体の還元は収率低下をまねくことが多いので、効率的な還元を目指して NaSH および Fe を用いた２種類の還元方法を検討した。さらに、化合物 **7** の他の合成法として、**5** のニトロ基を還元してアミン体 **9** を得たのち、アミノ基を Boc 保護して化合物 **10** とし、diazirine を構築した **11** を経て、**7** を得る合成ルートもあわせて検討した。最終的に、合成した **7** を NaSCN と反応させることで、目的の化合物 **8** を合成することに成功した。



4　**5**　**6**　**7**　**8**　**9**　**10**　**11**

photoaffinity label, diazirine, phenylthiourea

講演番号：2D12p06
講演日時、会場：3 月 27 日 15:05～ D 校舎 12 会場

Aplysiatoin 単純化アナログのアミド誘導体の合成と活性

Synthesis and biological activities of the amide derivative of aplog-1, a simplified analog of aplysiatoxin

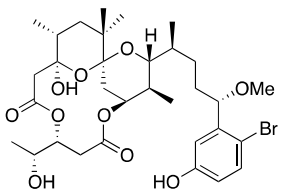
○花木 祐輔[1]、柳田 亮[2]、菅原 貴弘[3]、相田 美砂子[3]、徳田 春邦[4]、鈴木 信孝[4]、入江 一浩[1]（[1]京大院農、[2]香川大農、[3]広大院理、[4]金沢大院医）
○ Yusuke HANAKI[1], Ryo YANAGITA[2], Takahiro SUGAHARA[3], Misako AIDA[3], Harukuni TOKUDA[4], Nobutaka SUZUKI[4], Kazuhiro IRIE[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Kagawa Univ., [3]Hiroshima Univ., [4]Kanazawa Univ.)

【背景・目的】

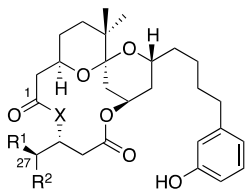
プロテインキナーゼ C アイソザイム（PKC）は，細胞の増殖，分化，アポトーシスといった情報伝達において中心的な役割を果たしている．これらのうち、PKCδ は腫瘍抑制やアポトーシスに関与していることから，がん治療における標的酵素の一つとして注目されている．海洋生物アメフラシ由来の aplysiatoxin（ATX）は強力な PKC 活性化剤であるが，発がん促進作用ならびに炎症作用を示すため治療薬としての利用は困難である．本研究グループはこれまでに，ATX の単純化アナログである aplog-1 がこれらの副作用をほとんど示さず, 逆に数種のがん細胞の増殖を顕著に抑制することを明らかにしている [1)]. また最近, PKCδ に結合しない 27 位誘導体（**1**, **2**）のがん細胞増殖抑制活性が aplog-1 と比べて 10 倍程度低いことから、PKCδ が aplog-1 のがん細胞増殖抑制に関わる標的分子の一つである可能性が示唆されている [2)]. 今後は、生体内における腫瘍抑制能の評価が必要であるが，aplog-1 は分子内に 2 つのエステル結合を有しているため、エステラーゼや pH 変化によって加水分解されてしまうおそれがある．本研究では，aplog-1 の生体内安定性を高めることを目的として 1 位のエステル基をアミド基へと変換した amide-aplog-1（**3**）を合成し，各種活性を評価した．

【方法・結果】

[^{3}H]Phorbol 12,13-dibutyrate 結合阻害試験によって PKCδ に対する結合能を評価した結果，**3** の結合能は aplog-1 よりも約 70 倍低かった．この PKCδ 結合能の大幅な低下は，環状構造のコンホメーション変化によるものであることが，コンホメーション解析ならびに密度汎関数法による計算から明らかになった．また，39 種のヒトがん細胞に対する増殖抑制試験を行ったところ，**3** はこれらのがん細胞の増殖をほとんど抑制しなかった．さらに，**3** のがん細胞増殖抑制活性が，PKCδ にまったく結合しない **1** および **2** よりも低かったことから，PKCδ 以外の標的分子も aplog 類のがん細胞増殖抑制に関与していることが示唆された．化合物 **3** はがん細胞増殖抑制活性ならびに発がん促進活性（EB ウィルス活性化能）をもたないため，aplog-1 の標的分子を探索する際のコントロール化合物として有用である．



Aplysiatoxin



Aplog-1 : R^1 = H, R^2 = OH, X = O
1 : R^1 = Me, R^2 = OH, X = O
2 : R^1 = H, R^2 = OMe, X = O
3 : R^1 = H, R^2 = OH, X = NH

1) Nakagawa, Y. *et al*., *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 7573; 2) Hanaki, Y. *et al*., *Tetrahedron* **2013**, *69*, 7636.

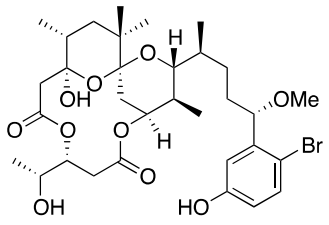
Tumor promoter, Aplysiatoxin, Protein kinase C

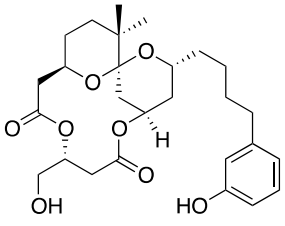
講演番号：2D12p07
講演日時、会場：3 月 27 日 15:16～ D 校舎 12 会場

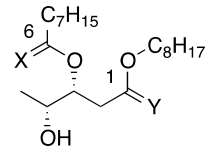
Aplysiatoxin の PKC C1 ドメイン認識部位の構造活性相関研究
Structure-activity relationship study on the PKC-recognition domain of aplysiatoxin
○芦田 能基[1]、柳田 亮[2]、川浪 康弘[2]、入江 一浩[3] ([1]香川大院農、[2]香川大農、[3]京大院農)
○Yoshiki ASHIDA[1], Ryo YANAGITA[2], Yasuhiro KAWANAMI[2], Kazuhiro IRIE[3] ([1]Kagawa Univ., [2]Kagawa Univ., [3]Kyoto Univ.)

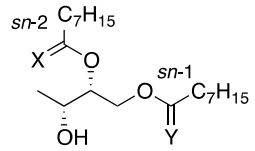
［背景・目的］ Aplysiatoxin (ATX) は, アメフラシから単離された発がん促進物質であり, 細胞内情報伝達の鍵酵素であるプロテインキナーゼ (PKC) の 8 種類のアイソザイムに存在する C1 ドメイン (C1A, C1B) に結合して PKC を活性化する. ATX は顕著ながん細胞増殖抑制活性を示すものの, 強力な発がん促進活性のために医薬品への応用は困難とされてきた. 最近, 本研究グループは, ATX の構造を単純化することで, がん細胞増殖抑制活性を保持したまま, 発がん促進活性のみを除去した Aplog 類の開発に成功した.[1] 現在, 様々な Aplog 誘導体の開発が進められているが,[2] より合理的に分子設計を行うために, ATX や Aplog と PKC C1 ドメインとの詳細な結合様式の解明が求められている. 本研究では, ATX のファーマコフォアと PKC との結合様式を推定するために, 受容体認識部位を抽出した **1** およびその誘導体 **2**, **3** と内因性リガンド 1,2-diacyl-*sn*-glycerol (DAG) の受容体認識部位を持つ **4-6** を合成し, PKC 結合能の比較を行った.

[方法・結果] [^{3}H]Phorbol 12,13-dibutyrate を用いた結合阻害試験により, PKCδ C1B ドメインに対する **1-6** の結合阻害定数 K_i を測定した. 化合物 **1** (K_i, 400 nM) の 1 位カルボニル基を除去した **2** の結合能は **1** とほぼ同等であったのに対して, 6 位カルボニル基を除去した **3** の結合能は約 8 倍低下した. 一方, **4** (K_i, 450 nM) の *sn*-2 カルボニル基を除去した **6** の結合能の低下が 10 倍程度であったのに対して, *sn*-1 カルボニル基を除去した **5** では少なくとも 40 倍以上の活性低下が見られた. これらの結果は, ATX 型の結合において 1 位カルボニル基が必須ではないこと, ATX 型と DAG 型の受容体認識部位がそれぞれ異なる結合様式を持つことを示唆している.









1) Nakagawa, Y., *et al., J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 7573-7579.
2) Irie, K. and Yanagita, R. C., *Chem. Rec.* **2014**, *14*, 251-267.

aplysiatoxin, protein kinase C, tumor-promoter

講演番号：2D12p08
講演日時、会場：3 月 27 日 15:27～ D 校舎 12 会場

日本産フサコケムシからの新規 Bryostatin 類の単離と活性

Isolation and biological activity of a new bryostatin congener from Japanese bryozoan *Bugula neritina*

村木 謙介[1]、○柳田 亮[1]、高田 舞[1]、川浪 康弘[1]、入江 一浩[2] ([1]香川大農、[2]京大院農)
Kensuke MURAKI[1], ○Ryo YANAGITA[1], Mai TAKATA[1], Yasuhiro KAWANAMI[1], Kazuhiro IRIE[2] ([1]Kagawa Univ., [2]Kyoto Univ.)

【背景・目的】

Bryostatin 1 (Bryo-1) は，海洋動物フサコケムシ *Bugula neritina* に含まれる強力なプロテインキナーゼ C (PKC) 活性化剤である．多くの PKC 活性化剤が発がん促進作用を持つのに対して，Bryo-1 は発がん促進作用を示さず，顕著な抗腫瘍性を示すため，抗がん剤候補化合物としてヒトに対する臨床試験が行われている．これまでに少なくとも 20 種類以上の Bryo-1 類縁体が単離されているが，天然からの単離収率は低く，活性発現に必要な部分構造について不明な点が多い．本研究では，日本産フサコケムシからの新規 Bryo 類の単離・活性評価を目的とした．

【方法・結果】

本研究グループでは化学合成した PKC C1 ペプチドを用いたスクリーニング法によって，これまでに日本産フサコケムシから 6 種類の Bryo 類を同定している.[1)] 本研究では，ヒト白血病細胞 HL-60 株の分化誘導活性を指標に単離精製を進めた．福岡県小戸で採集されたフサコケムシ (湿重量 10 kg) のクロロホルム/メタノール抽出物を液-液分配し，酢酸エチル層 (32.7 g) を得た．これを HL-60 細胞分化誘導活性を指標として, 各種クロマトグラフィーにより分画した. その結果, 以前に同定した Bryo-8 (0.4 mg), 10 (0.4 mg), 19 (0.6 mg) と共に，新規 Bryo 類縁体 **1** (1.1 mg) を得た．^{1}H-1D NMR スペクトルの比較から，**1** は Bryo-19 の 20 位エピマーであると推定された．その他，詳細な構造解析ならびに生物活性について報告する．

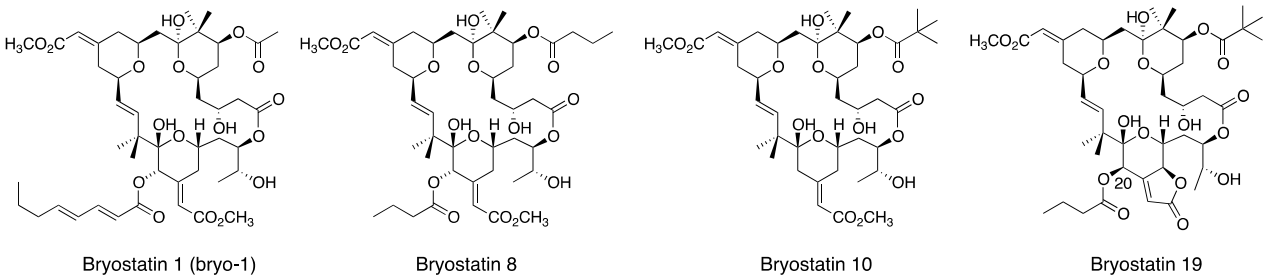


図　Bryo-1 および単離した Bryo 類の構造

1) Ueno, S., *et al*., *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2012**, *76*, 1041.

Bryostatin, Protein kinase C, PKC

講演番号：2D12p09
講演日時、会場：3 月 27 日 15:38～ D 校舎 12 会場

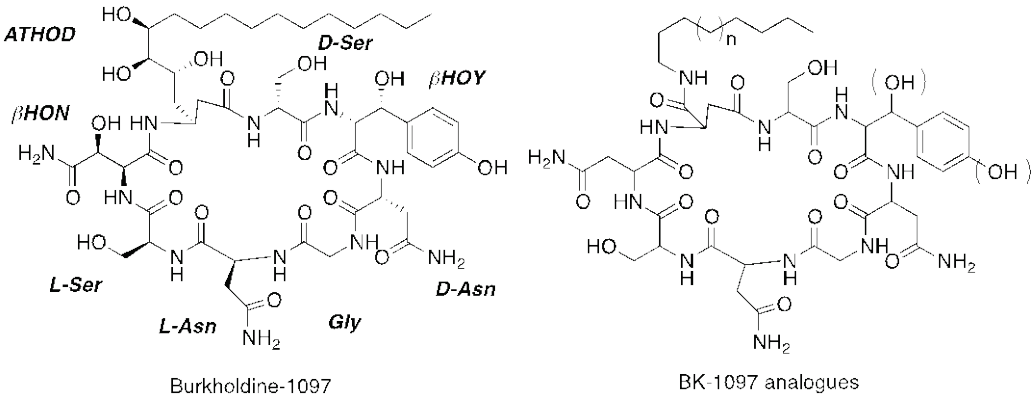
環状リポペプチド Burkholdine 様化合物の合成と抗真菌活性

Synthesis and antifungal activity of cycliclipopeptides, burkholdine derivatives

鐙 佳奈子、佐々木 康裕、○今野 博行（山形大院理工）
Kanako ABUMI, Yasuhiro SASAKI, ○Hiroyuki KONNO (Yamagata Univ.)

＜目的＞ Burkholdine 類は Schmidt らによって単離，構造決定された環状オクタリポペプチドであり，β-ヒドロキシアスパラギン (β-HON), β-ヒドロキシチロシン (β-HOY), さらに脂肪鎖を有するアミノ酸 (ATHOD) を含んだ構造を有する.[1,2] これらは強力な抗真菌活性を有することから，新規抗真菌剤のリード化合物として注目されている．作用部位として candin 系抗真菌薬との構造類似性から細胞壁合成酵素が考えられるが，その詳細は今だ明らかにされていない．我々は Bk 類の構造と抗真菌活性に興味をもち，構造活性相関研究を行うことで活性発現に必須な構造モチーフの抽出を行うことにした．

＜方法と結果＞ 構造活性相関研究に用いる Bk アナログペプチドは Fmoc-固相合成法による直鎖ペプチドの調製と液相でのマクロラクタム化，最終脱保護反応によって行った．またペプチド内に組み込むアミノ酸で入手不可能なものについては別途化学合成を行い Fmoc-アミノ酸誘導体として得た．合成した Bk 様環状あるいは直鎖ペプチド類に対する抗真菌活性は最小発育阻止濃度により評価した．さらに MTT アッセイによる細胞毒性も合わせて調査した．その結果，天然物と同様の立体配座を持つ化合物に低細胞毒性かつ顕著な抗真菌活性が見られることがわかった.[3] その詳細について報告する．



1) Schmidt, E. W., *et al. Org. Lett.***2010**, *12*, 664-666.
2) Schmidt, E. W., *et al. J. Nat. Prod.***2012**, *75*, 1518-1523.
3) Konno, H. , *et al. Bioorg. Med. Chem. Lett*. **2013**, *23*, 4244-4247.

burkholdine, antifungals, cyclic octalipopeptide

講演番号：2D12p10
講演日時、会場：3 月 27 日 15:49～ D 校舎 12 会場

子嚢菌 *Lachnum palmae* からの新規含ハロゲン化合物の構造

Study on Isolation and Structure Elucidation of New Halogenated Compounds from *Lachnum palmae*

○繁森 英幸[1]、田辺 友佳[2]、松本 拓矩[2]、細矢 剛[3]、伴田 洋[4]、佐藤 寛泰[5]、城 始勇[5]（[1]筑波大生命環境、[2]筑波大院生命環境、[3]国立科学博物館植物研、[4]北里大薬、[5]株式会社リガク）
○ Hideyuki SHIGEMORI[1], Yuka TANABE[2], Takunori MATSUMOTO[2], Tsuyoshi HOSOYA[3], Hiroshi TOMODA[4], Hiroyasu SATO[5], Motoo SHIRO[5] ([1]Univ. of Tsukuba, [2]Grad. School Univ. of Tsukuba, [3]National Museum of Nature and Science, [4]Kitasato Univ., [5]Rigaku Corporation)

【目的】　未活用子嚢菌からの新規生物活性物質の探索研究の一環として、これまでに子嚢菌門盤菌類の一種である *Lachnum palmae* より、顕著な抗菌活性を有する新規ジベンゾピロン化合物 Palmariol A および B、ならびに新規シクロペンテノン化合物 PalmaenoneA および B、Palmaenol A を単離・構造決定してきた。これらは塩素を有しユニークな構造を持つことから、本研究では培地に KCl や KBr を添加することによって、さらなる新規含塩素または含臭素化合物の探索を行うことを目的とした。
【方法および結果】　*L. palmae* を、①PYG 培地（polypeptone 1 %, yeast extract 0.5 %, glucose 2 %, pH 7.5）、②PYG 培地+KCl 0.5 % および③PYG 培地＋KBr 0.5 % の 3 種の培地を用いて培養を行った。^{1}H NMR スペクトルを指標に各培養上清部について各種クロマトグラフィーを用いて分離・精製を行い、2D NMR、MS および X 線結晶構造解析により単離した化合物の構造を明らかにした。その結果、①の培養上清部より、シクロペンテノール化合物 Palmaenol A の類縁体である新規化合物 Palmaetriol (**1**)を単離し、②の培養条件では Palmaenol A の幾何異性体 Palmaenol B (**2**)および含塩素イソクマリン化合物 Palmaerin A (**3**)を単離した。一方、③の培養条件からは、含臭素イソクマリン化合物 Palmaerin B (**5**)、Palmaerin C (**6**)および Palmaerin D (**7**)を見出した。またこれら化合物について抗菌活性試験を行った結果、Palmaenone A および B に *Bacillus subtilis* や *Botrytis* sp.等に対する顕著な活性が見られたことから、活性発現には 6 位ケトンが重要であることが示唆された。一方、イソクマリン化合物ではシクロペンテノン化合物と比較すると弱い抗菌活性であったが、活性発現にはハロゲン元素の種類と結合位置が重要であることがわかった。またイソクマリン化合物はクレスに対し、高濃度では生長抑制を低濃度では生長促進活性を示すことを見出した。
　以上より、KCl や KBr を添加した培地を用いることにより、*L. palmae* の培養上清部から 7 種類の新規含ハロゲン化合物を単離・構造決定することに成功した。これらの化合物においてシクロペンテノン化合物は顕著な抗真菌活性を有することを見出した。一方、イソクマリン化合物にはオーキシン様活性が認められたことから、*L. palmae* と宿主植物との寄生関係が示唆される。

Discomycete, *Lachnum palmae*, dihydroisocoumarin

講演番号：2D12p11
講演日時、会場：3 月 27 日 16:10～ D 校舎 12 会場

カタユウレイボヤにおける薬剤の毒性評価系の構築

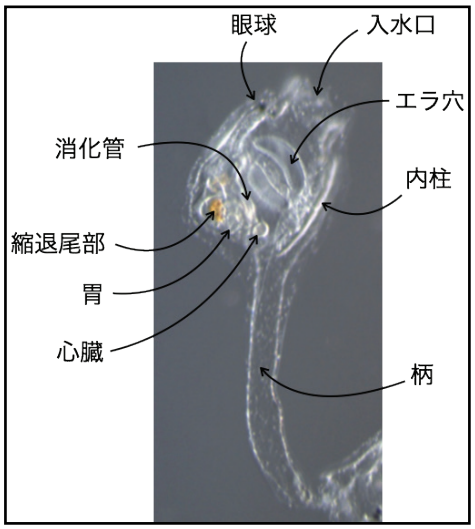
Establishment of toxicity evaluation system of compounds using *Ciona intestinalis*

○溝谷 優治、伊藤 俊、堀田 耕司、田代 悦、岡 浩太郎、井本 正哉（慶大）
○Yuji MIZOTANI, Shun ITOH, Kohji HOTTA, Etsu Tashiro, Kotaro Oka, Masaya Imoto (Keio Univ.)

【目的】カタユウレイボヤはヒトに近縁な脊索動物であり，発生のスピードが早く，低コストで大量発生が可能であるといったモデル生物としての利点を備える．本研究では将来的に既存のモデル生物に代わるハイスループットな薬剤の毒性評価試験動物として新たにホヤを用いる可能性を検討した．ホヤは受精後 2 日(2 dpf (days post fertilization)) を皮切りに臓器を形成しはじめ，中には胃，心臓，消化管といったヒトと相同な臓器も含まれる．本評価ではこの 2 dpf に細胞毒性を示す薬剤を処理し，ホヤの臓器形成を定量化することで毒性を判断するための指標となり得るかを検討することにした．

【方法】成体のホヤを解剖して卵と精子を取り出しシャーレ上で受精させた後，18℃のインキュベータで 2 dpf まで発生させた．2 dpf に 12 well プレートに 1 ml ずつ正常に発生したホヤ幼生(100 匹前後)をまき，ヒトにおいて細胞毒性を示す薬剤を添加して，3，4，5 dpf に光学顕微鏡でホヤの形態を観察した．

【結果】ミトコンドリア呼吸鎖阻害剤であるロテノンを処理したところ，3，4，5 dpf において濃度依存的にホヤの発生が全体的に抑制されている観察結果を得た．そこでこの発生の抑制を定量化するため，光学顕微鏡より得られたホヤの写真をもとに体面積，縮退尾部面積，柄の長さ，体軸角度，胃の面積を定量化したところ，いずれの評価項目もロテノンは濃度依存的に発生を阻害していたことから，これらの指標はロテノンが示す毒性の評価項目として用いられることが示唆された． 現在，他のミトコンドリア呼吸鎖阻害剤が同様のパターンでこれらの毒性指標が変動するのか，またミトコンドリアとは異なる標的に作用する薬剤は異なるパターンを示すのか検討中である．



ホヤの臓器

Ciona intestinalis, toxicity evaluation, rotenone

講演番号：2D12p12
講演日時、会場：3 月 27 日 16:21～ D 校舎 12 会場

in silico 及び天然物スクリーニングによる新規アンドロゲン受容体アンタゴニストの探索
Search for the novel androgen receptor antagonist using *in silico* and natural product screening
○齋藤 駿、藤巻 貴宏、榊原 康文、田代 悦、井本 正哉（慶應大理工）
○Shun SAITO, Takahiro FUJIMAKI, Yasubumi SAKAKIBARA, Etsu TASHIRO, Masaya IMOTO (Keio Univ.)

【目的】 前立腺がんは、男性ホルモン（アンドロゲン）がアンドロゲン受容体（以下 AR）に結合し転写因子として働くことで悪性化することから、これらの結合を阻害する AR アンタゴニストが治療薬の一つとして用いられている。しかし、既存薬は種類及び化学構造が限られているため、長期投与により耐性を示す変異体 AR の出現が問題視されてきた。そこで、*in silico* 及び天然物スクリーニングの二つの手法により、既存薬とは化学構造が異なり、耐性を克服できる化合物を探索した。
【方法･結果】*in vitro* での AR への結合活性を指標に AR アンタゴニストを探索したところ、*in silico* スクリーニングにより STK765173, 天然物スクリーニングにより Arabilin を取得した。続いて、両化合物が細胞レベルで AR アンタゴニスト活性を示すのか評価した。その結果、前立腺がんのマーカー遺伝子 PSA mRNA の発現及び前立腺がん細胞 LNCaP のアンドロゲン依存的な増殖を抑制した。最後に、既存の AR アンタゴニストに対して耐性を示す変異体 AR を作製し、両化合物が耐性を克服することができるのか、Luciferase reporter assay により評価した。その結果、既存の AR アンタゴニストは変異体 AR に対してアンタゴニスト活性を示さなかったが、Arabilin はアンタゴニスト活性を示し耐性を克服できる可能性が示唆された。尚、Arabilin のケミカルスペースは既存の AR アンタゴニストとは異なっており、有望な第 3 世代の治療薬シードになり得る可能性がある。

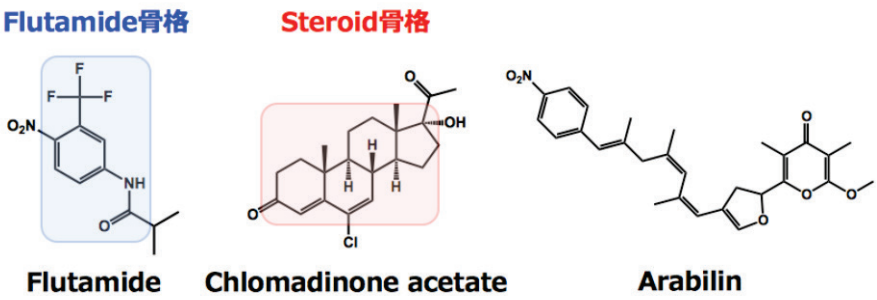


図. 既存の AR アンタゴニスト製剤と Arabilin の化学構造

prostate cancer, androgen receptor, drug resistance

講演番号：2D12p13
講演日時、会場：3 月 27 日 16:32～ D 校舎 12 会場

抗がん剤耐性と EMT の関係に着目した MET 誘導物質の探索系構築

Establishment of screening system for MET-inducing compound focusing on the relationship between EMT and anti-cancer drug resistant

○田代 悦、大嶽 弘之、奈良部 進、井本 正哉（慶大・理工）
○Etsu TASHIRO, Hiroyuki Oodake, Susumu Narabe, Masaya Imoto (Faculty of Science and Technology, Keio University)

EMT（Epithelial-Mesenchymal Transition）とは上皮がん細胞が間葉系細胞へとその形質を転換する現象で，EMT が誘導されたがん細胞は高い運動能や薬剤耐性などの悪性度を獲得するため，がん治療を困難にする．よって，EMT の逆プロセスである MET を誘導する化合物はがん細胞の悪性度を減衰させる新しいタイプの抗がん剤として期待できる．そこで我々は，抗がん剤耐性と EMT の関係に着目した MET 誘導物質の探索系の構築を行った．これまで抗がん剤耐性になったがん細胞では EMT が誘導されていたとの報告があるため(1)，まずは様々ながん細胞に様々な抗がん剤を長時間暴露して薬剤低感受性細胞の樹立を試みた. その結果, シスプラチン（CDDP）をヒト大腸上皮がん LoVo 細胞に約 3 ヶ月暴露し続けることで CDDP 低感受性な LoVo 細胞（LoVo-CDDP 細胞）を複数クローン得た．これらクローンの多くは細胞間接着が失われて間葉系細胞様へと形態変化し，さらに上皮マーカーE-Cadherin の発現が減少するとともに間葉マーカーN-cadherin や Vimentin の発現が増加していたことから，これらのクローンでは期待通り EMT が誘導されていた．さらに LoVo-CDDP 細胞では，EMT を促進させる転写因子 Snail も高発現していた．また，EMT が誘導されて間葉細胞の形質を示したクローンほど CDDP に対する感受性も低かったことから，EMT 誘導と CDDP 感受性が相関していると示唆された．以上より，LoVo-CDDP 細胞に MET を誘導して上皮細胞の形質に戻す物質は CDDP 感受性を増強することが期待でき，抗がん剤耐性を克服するシーズ薬になること考えられる.

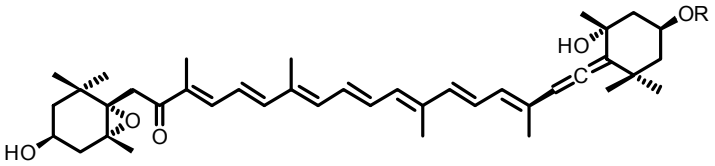
(1) Kajiyama H. *Int J Oncol* (2007) **2**, p277 (1) Kajiyama H. *Int J Oncol* (2007) **2**, p277

EMT, anti-cancer drug resistant, cadherin

講演番号：2D12p14
講演日時、会場：3 月 27 日 16:43～ D 校舎 12 会場

フコキサンチン及びフコキサンチノールに対するポリクローナル抗体の作製と性状
Preparation and the properties of polyclonal antibodies against fucoxanthin and fucoxanthinol
○上野 美紗、野村 駿、長 由扶子、此木 敬一、山下 まり (東北大院農)
○Misa UENO, Shun NOMURA, Yuko CHO, Keiichi KONOKI, Mari YAMASHITA (Tohoku Univ.)

【目的】フコキサンチン (1)は、褐藻や珪藻類の光合成に関与するカロテノイドであり、抗酸化活性、抗癌作用などをもつ生理活性物質である[1)]。1 は経口摂取後、大部分が消化管内で脱アセチル化され、より強い生理作用をもつフコキサンチノール (2)に変換されて吸収される[2)]。これらの化合物に対する実用可能な抗体を作製できれば、生体試料より抽出せずに局在などを分析できる可能性があり、生理作用の詳細解明に役立つのではないかと考えられた。本研究では、1 や 2 の簡便な分析法への応用を目指し、1 及び 2 に対するポリクローナル抗体を作製して、その反応性を比較した。
【方法・結果】1と2をそれぞれヘミスクシニル化して、KLH-conjugateを作製した。これらを抗原としてそれぞれウサギを免疫し、抗フコキサンチン及び抗フコキサンチノールポリクローナル抗体を作製した。競合ELISA法により、作製した抗体に対する1、2を含む4-5種のカロテノイドとの親和性を評価した。抗フコキサンチンポリクローナル抗体は、1に対する特異的親和性が示され、2や他のカロテノイドに対する親和性は1に比べて低かった。一方、抗フコキサンチノールポリクローナル抗体の2に対する親和性は低かったが、弱いながらも2を特異的に認識することが示された。これらの抗体の応用についても現在検討中で、合わせて報告する。



1 R=Ac, 2 R=H
The structures of fucoxanthin (1) and fucoxanthinol (2)

1) Kumar, S. R., Hosokawa, M., Miyashita, K., *Mar. Drugs*, **11**, 5130-5147, **2013.**
2) Sugawara, T., Baskaran, V., Tsuzuki, W., Nagao, A., *J. Nutr*. **132**, 946-951, **2002**.

fucoxanthin, fucoxanthinol, antibody

講演番号：2D12p15
講演日時、会場：3 月 27 日 16:54～ D 校舎 12 会場

シコニン類の光学異性体比の特徴を利用した(*R*)-shikonin 及び(*S*)-shikonin の効率的生産

Development of easy method for preparing (*R*)-shikonin and (*S*)-shikonin using characteristic of the RS mixture in the shikonins from Kōshikon and Nanshikon

○松本 恵実[1,2]、牧岡 富広[2]、柳瀬 笑子[1]、中塚 進一[1,2] ([1]岐阜大院連農、[2]長良サイエンス株式会社)
○Emi MATSUMOTO[1,2], Tomihiro MAKIOKA[2], Emiko YANASE[1], Shin-ichi NAKATSUKA[1,2]
([1]The United Graduate School of Agricultural Science, Gifu Univ., [2]Nagara Science Co., Ltd.)

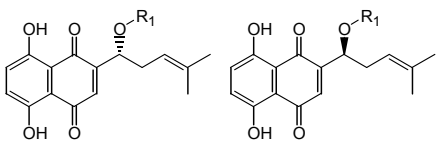
【目的】

硬紫根[*Lithospermum erythrorhizon* Siebold et Zuccarini (*Boraginaceae*)の根]及び軟紫根(*Arnebia euchroma* の根)は古来より染料や医薬品として用いられてきた。これらの主色素成分シコニン類は光学異性体の混合物として存在していると報告されているが、その混在理由は明確ではない。シコニン類の生合成や生理活性の詳細な研究を進める上でシコニン類の光学活性体は非常に重要である。従来、光学活性(*R*)-shikonin (**1R**)及び(*S*)-shikonin (**1S**)を得るためには、シコニン類混合物を加水分解した後に結晶化を繰り返す必要があった。今回、我々は光学活性体のより効率的な生産法を検討した。

【方法・結果】

我々は硬紫根から 6 種類、軟紫根から 5 種類のシコニン類を分離精製し、それぞれの光学異性体比をキラル HPLC 分析により決定した。その結果、硬紫根・軟紫根共に acetylshikonin (**2**)、β-hydroxyisovalerylshikonin (**3**)は光学異性体が約 10%以上混在しているが、isobutyrylshikonin(**4**), β,β-dimethylacrylshikonin (**5**), α-methyl-*n*-butyrylshikonin (**6**)及び isovalerylshikonin (**7**)は光学異性体の混在はわずか 5%以下であることが分かった。従来の製法では **2**～**7** の混合物を加水分解して **1R**/**1S** 混合物にした後に結晶化しているが、光学純度が 70%ee 程度で低いためラセミ体が優先的に析出し、光学活性体の高純度品を得ることは極めて困難であった。しかし、**4**～**7** の混合物を加水分解して得た **1R**/**1S** 混合物の光学純度が 90%ee 以上で高いため、ラセミ体よりも光学活性体が優先的に析出し、非常に効率よく光学活性体の高純度品が得られた。

本研究により光学活性 **1R** 及び **1S** を効率的に生産する方法を確立できた。光学活性 **1R** 及び **1S** をアシル化すればエステル型シコニン類の光学活性体を合成でき、生合成や生理活性の詳細な研究に役立つと考えている。



R　　S

R_1=H	**1R**	(*R*)-shikonin	**1S**	(*S*)-shikonin
R_1=$COCH_3$	**2R**	(*R*)-acetylshikonin	**2S**	(*S*)-acetylshikonin
R_1=$COCH_2C(CH_3)_2OH$	**3R**	(*R*)-β-hydroxyisovalerylshikonin		—
R_1=$COCH(CH_3)_2$	**4R**	(*R*)-isobutyrylshikonin	**4S**	(*S*)-isobutyrylshikonin
R_1=$COCH=C(CH_3)_2$	**5R**	(*R*)-β,β-dimethylacrylshikonin	**5S**	(*S*)-β,β-dimethylacrylshikonin
R_1=$COCH(CH_3)CH_2CH_3$	**6R**	(*R*)-α-methyl-*n*-butyrylshikonin	**6S**	(*S*)-α-methyl-*n*-butyrylshikonin
R_1=$COCH_2CH(CH_3)_2$	**7R**	(*R*)-isovalerylshikonin	**7S**	(*S*)-isovalerylshikonin

1) 松本, 柳瀬, 中塚, 日本農芸化学会要旨集, **2011**, 182 (2011). 2) Emi Matsumoto, Tomihiro Makioka, Emiko Yanase, Shin-ichi Nakatsuka, Jpn. J. Food Chem. Safety, **21**(1), 65-71 (2014).

shikonin, enantiomer, optical resolution

講演番号：2D12p16
講演日時、会場：3 月 27 日 17:15～ D 校舎 12 会場

ES 細胞の分化を阻害する化合物の探索
Screening for compounds that inhibit differentiation of ES cells

○藤巻 雄太[1,2]、小林 大貴[1,4]、西村 はる菜[1]、斎藤 臣雄[3]、長田 裕之[3]、中尾 洋一[2]、吉田 稔[1,4]（[1]理研 化学遺伝、[2]早大院先進理工、[3]理研 CSRS、[4]科技機構）
○Yuta FUJIMAKI[1,2], Hiroki KOBAYASHI[1,4], Haruna NISHIMURA[1], Tamio SAITO[3], Hiroyuki OSADA[3], Yoichi NAKAO[2], Minoru YOSHIDA[1,4] ([1]RIKEN, Chem. Genet., [2]Deot. Chem. Biochem., Acv. Sci. Eng., Waseda Univ., [3]RIKEN, CSRS, [4]JST, CREST)

【目的】多能性幹細胞の自己複製あるいは分化を制御する化合物は再生医療への応用が期待できる。そこでそのような活性をもつ新たな化合物を取得することを目的にマウス ES 細胞の分化阻害剤を探索した。

【方法】多能性マーカー遺伝子 Nanog のプロモーター制御下で GFP を発現する ES 細胞[RF8-NanogGIP #1A2 (Okita, 2007)]は白血病阻害因子 Leukemia Inhibitory Factor (LIF)、MAPK 阻害剤 PD0325901 および GSK3β阻害剤 CHIR99021 存在下では多能性を維持するため GFP を強く発現するが、LIF および 2 つの阻害剤（LIF/2i）を除去すると分化に伴い GFP の発現を失う。そこで LIF/2i 除去による GFP の発現減少を抑制する化合物を理研天然化合物バンクからスクリーニングした。GFP の検出は IN Cell Analyzer 2000 を使ったイメージングにより行った。

【結果】スクリーニングした 18,360 化合物のうち NPD13432 と NPD12123 の 2 化合物に GFP の発現減少を抑制する活性を見出し、それぞれ 10 μM で分化阻害活性を示すことがわかった。次に、すでにマウス ES 細胞の分化は MEK/ERK 経路の阻害あるいは GSK3 阻害により抑制されることが知られているため、取得化合物がこれらの経路に与える影響を検討した。ウェスタンブロットによりリン酸化 ERK を検出したところ、取得化合物は ERK のリン酸化に影響しなかったため、MEK/ERK 経路を阻害しないことが示唆された。一方、in vitro GSK3 キナーゼアッセイを行った結果 NPD12123 は GSK3 を阻害しなかったが、NPD13432 は IC_{50}値 92 nM で GSK3α を、IC_{50}値 310 nM で GSK3β を阻害し、その阻害様式は ATP 拮抗阻害であることがわかった。

【結論】マウス ES 細胞の分化阻害剤として NPD13432 および NPD12123 を見出した。NPD13432 は GSK3 を阻害することで分化を阻害することを明らかにした。一方、NPD12123 はこれまでに知られていない作用機序でマウス ES 細胞の分化を阻害している可能性があるため、今後作用機構を解析していく予定である。

ES cells, GSK-3, small molecule

講演番号：2D12p17
講演日時、会場：3 月 27 日 17:26～ D 校舎 12 会場

可逆的 tight junction 開口物質の探索

Screening of reversible tight junction opening compounds

○神田 祐輔[1]、南雲 陽子[1]、紙透 伸治[2]、菅原 二三男[2]、臼井 健郎[1] ([1]筑波大院生命環境、[2]東理大理工)
○Yusuke KANDA[1], Yoko NAGUMO[1], Shinji KAMISUKI[2], Fumio SUGAWARA[2], Takeo USUI[1] ([1]Univ. Tsukuba, [2]Tokyo Univ. of Sci.)

［背景・目的］

上皮細胞間接着構造の一つである Tight Junction (TJ) は、隣接した細胞間を強く接着することで上皮細胞間の隙間を介した物質の自由な移動を防いでいる。このため、バイオ医薬品をはじめとする生体膜透過性に乏しい薬剤の投与は、静脈注射などの侵襲的手法に頼らざるを得ないのが現状である。仮に TJ を可逆的に開口することができれば、細胞間経路を介した非侵襲的で患者への負担が少ない薬剤投与が可能になると考えられるものの、現在臨床で用いられている可逆的 TJ 開口剤は capric acid だけである。そこで本研究では、MDCKII 細胞層を用いて可逆的 TJ 開口物質のスクリーニングを行った。

[方法・結果]

Caco-2 細胞を用いた腸管上皮細胞層モデルの TJ を可逆的に開口する物質として、カプサイシンが報告されている [1)]。我々はこれまで MDCKII 細胞を用いてカプサイシンの可逆的 TJ 開口機構を解析し、細胞内への Ca^{2+}流入が重要であることを報告してきた [2,3)]。そこで単層形成させた MDCKII 細胞への Ca^{2+}流入を指標に薬剤のスクリーニングを行った。MDCKII 細胞を毎日培地交換しながら三日間培養して単層形成させた後、Ca^{2+}蛍光プローブである Fluo-8 を取り込ませ、種々の化合物を処理してからの蛍光を経時計測した。約 850 化合物をスクリーニングし、Ca^{2+}流入活性を示したうち上位約 5%（38 化合物）を活性ありと判断した。次にこれらの化合物が実際に細胞層の透過性を上昇させるかどうか、またその透過性上昇が可逆的であるかどうか検討した。MDCKII 細胞をトランズウェル上に単層形成させ、頂端部のバッファーにのみ蛍光物質 FD-4 を加えた。その後、細胞層に化合物を処理し、基底部のバッファーへ漏れでた FD-4 を経時的に測定することで、透過性亢進能、およびその可逆性を検討した。以上のスクリーニングを行った結果、可逆的 TJ 開口誘導する化合物を、複数得た。現在これらの化合物の作用機序について解析を行っており、合わせて報告する予定である。

1) *Cytotechnology*, **36**, 155-161 (2001)
2) *Biochem. Biophys. Res. Commun.,* **355**, 520-525 (2007)
3) *PLoS ONE,* **8**, e79954 (2013)

tight junction, reversible opening, screening

講演番号：2D12p18
講演日時、会場：3 月 27 日 17:37～ D 校舎 12 会場

ミトコンドリア分裂阻害剤の探索

Screening of mitochondrial fission inhibitor

○吉田 圭佑、南雲 陽子、臼井 健郎（筑波大院・生命環境）
○Keisuke YOSHIDA, Yoko NAGUMO, Takeo USUI (Univ. Tsukuba)

[背景・目的]

ミトコンドリアは常に融合と分裂を繰り返す極めて動的なオルガネラであり、ATP 産生を始めとする細胞内の様々な機能に関わっている。ミトコンドリアの形態は融合と分裂のバランスによって維持されており、バランスが崩壊して分裂に偏ると好気呼吸機能が低下し、代謝疾患などの様々な疾患を引き起こすことが知られている。このことからミトコンドリア分裂阻害剤は、ミトコンドリア分裂の分子機構の解明への糸口を与え、様々な疾患の治療薬となることが期待される。しかしながら、ミトコンドリア分裂阻害剤は現在まで mdivi-1[1]を含む 3 種類しか報告されていない。そこで、当研究室で作成した多剤感受性酵母[2]を用いてミトコンドリア分裂阻害剤のスクリーニングを行うこととした。

[方法・結果]

ミトコンドリア融合に関与する Fzo1p の遺伝子を破壊した酵母のミトコンドリアは融合が出来ず、グリセロール等の非醗酵性炭素源の培地では生育が出来なくなる。一方、ミトコンドリア分裂に関与する Fis1p の遺伝子を *fzo1* 遺伝子と同時に破壊すると、ミトコンドリアの融合と分裂のバランスが回復し、グリセロール培地で生育出来るようになることが知られている[3]。従って、ミトコンドリア分裂阻害活性を持つ化合物は、グリセロール培地で Fzo1p 破壊株の増殖を回復させると考えられる。この性質を利用してミトコンドリア分裂阻害剤のスクリーニングを行った。

多剤感受性酵母に TIR1p、及び C 末に AID-tag を付けた Fzo1p を発現させることで、インドール酢酸（IAA）依存的に Fzo1p が分解される変異株（Fzo1-aid 株）を作成した[4]。この株は IAA 存在下、グリセロール培地で増殖が出来ず、さらに *fis1* 遺伝子を破壊することで増殖が回復したことから、本株を用いてミトコンドリア分裂阻害剤のスクリーニングを行った。その結果、mTOR 阻害剤として知られる rapamycin が、Fzo1p 非存在下での酵母のグリセロール培地での増殖を回復させることを見出した。さらに動物細胞のミトコンドリア形態に及ぼす影響を検討したところ、rapamycin は、H_2O_2 処理により分裂に偏ったミトコンドリアの融合を促進した。現在 rapamycin のミトコンドリア融合を促進させる作用機構について解析を行っており、合わせて報告する予定である。

1) *Dev. Cell,* **14**, 193-204 (2008)
2) *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **75**, 1588-1593 (2011)
3) *J. Cell Biol.*, **151**, 367-380 (2000)
4) *Nature Methods*, **6**, 917-922 (2009)

mitochondrial fission and fusion, screening, rapamycin

講演番号：2D12p19
講演日時、会場：3 月 27 日 17:48～ D 校舎 12 会場

γチューブリン特異的阻害剤の探索と発見
Screening and identification of γ-tubulin specific inhibitor
○知念 拓実[1]、塩田 秀也[2]、Peng LIU[3]、Elmar SCHIEBEL[3]、早川 一郎[4]、木越 英夫[2]、臼井 健郎[1] ([1]筑波大院・生命環境、[2]筑波大院・数理物質、[3]ハイデルベルグ大学・分子生物学研究所、[4]岡山大院・自然科学)
○Takumi CHINEN[1], Shuya SHIODA[2], Peng LIU[3], Elmar SCHIEBEL[3], Ichiro HAYAKAWA[4], Hideo KIGOSHI[2], Takeo USUI[1] ([1]Grad. School of Life and Environmental Sciences, Univ. Tsukuba, [2]Grad. School of Pure and Applied Sciences, Univ. Tsukuba, [3]ZMBH, Heidelberg Univ., [4]Grad. School of Natural Science and Technology, Okayama Univ.)

[背景・目的]
微小管は、中心体に局在するγチューブリン複合体が足場となり、α/βチューブリンがリクルートされることで形成される筒状構造体であり、細胞内において染色体分配等の多くの機能を担っている。このため、微小管形成を阻害するα/βチューブリン作用薬は紡錘体形成阻害を介して、細胞分裂停止・アポトーシスを誘導することでがん細胞を死滅させることから抗がん剤として臨床応用されている。しかしながら微小管作用薬の多くは非分裂細胞にも作用し、末梢神経痛等の副作用を示すことが問題となっている。一方、γチューブリンは分裂期特異的に活性化すること[1)]、一部のがん細胞で発現が亢進していること[2)]、また中心体増幅によりγチューブリン活性が増強した細胞では浸潤能の亢進が見られること[3)]から、副作用の少ない抗がん剤の標的として有用であると考えられる。しかしながらγチューブリン特異的阻害剤は報告されていない。そこで本研究ではγチューブリン特異的阻害剤を探索し、微小管核形成への作用を検討することとした。

[方法・結果]
化合物結合時のトリプトファン蛍光変化を利用し、γチューブリン結合物質をスクリーニングした。γチューブリンとβチューブリンの相同性の高さや構造類似性から、βチューブリン作用薬及びその類縁体を中心に探索をおこなった結果、γチューブリン特異的結合物質として glaziovianin A（AG1）類縁体である O^7-demethyl benzyl AG1（gatastatin）を見出した。Gatastatin はα/βチューブリンよりも10倍以上強いアフィニティーでγチューブリンに結合し、γチューブリンの GTP 結合活性を阻害した。Gatastatin は *in vitro* チューブリン重合系において、γチューブリン非依存的な微小管重合は阻害せず、γチューブリン依存的微小管重合を特異的に阻害した。同様の結果は *Xenopus* egg extract でも観察され、gatastatin はγチューブリン非依存的な aster 形成には影響を与えず、Ran-GTP によるγチューブリン依存的な aster 形成を特異的に阻害した。以上の結果から、gatastatin はγチューブリン依存的微小管核形成に対する初の特異的阻害剤であることが示された。

1) *J. Cell Sci.,* **107**, 2825-2837 (1994)
2) *Neurochem. Res.,* **32**, 1387-1398 (2007)
3) *Nature.,* **510**, 167-171 (2014)

γ-tubulin specific inhibitor, microtubule nucleation

講演番号：2D12p20
講演日時、会場：3 月 27 日 17:59～ D 校舎 12 会場

抗ウイルス活性を示すインドール誘導体の細胞内における作用標的の解析

Target analysis of indole derivatives with antiviral activity at celluar level

○荒井 詩織[1]、唐津 悠[2]、袴田 航[1,2]、平野 貴子[2]、西尾 俊幸[1,2] ([1]日大院生資科、[2]日大生資科・生命化)
○Shiori ARAI[1], Yu KARATSU[2], Wataru HAKAMATA[1,2], Takako HIRANO[2], Toshiyuki NISHIO[1,2] ([1]Graduate School of Bioresource Sciences, Nihon Univ., [2]Chem. and Life Sci., College of Bioresource Sciences. Nihon Univ.)

【目的】近年、新興・再興ウイルス感染症が世界的な問題となっており、新規抗ウイルス剤が強く求められている。そこで我々は、それら原因ウイルスの感染・増殖に必須な *N*-結合型糖鎖に着目した。そのなかでも *N*-結合型糖鎖プロセシングに関わる小胞体グルコシダーゼ II（以下 GII）阻害剤は、ウイルス表面糖鎖を未成熟とし、ウイルスの感染力を大幅に低下させることが広く知られている。

そこで GII 阻害剤の抗ウイルス剤への展開を目指し、GII を標的とした阻害剤のバーチャルスクリーニングを行なった（*Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **22**, 62, 2012）。その結果、インドール誘導体（図 1）が、α-グルコシダーゼ阻害活性を有し、抗 HIV 活性を示すことを見出した（特許 2012-206959）。しかし、これらのインドール誘導体の細胞内における作用点が GII であるかが不明なため、これら誘導体の細胞内における作用点を明らかにすることを本研究の目的とした。これまでに、酵母のα-グルコシダーゼを用いて阻害機構の解析を行なったが、阻害型が不競争阻害型であったため、本酵素では GII 阻害活性が適切に評価できないと考えた。そこでヒト培養細胞を用いた GII 阻害活性・細胞毒性・小胞体ストレス応答について評価することとした。

【方法および結果】GII 阻害活性の評価は、我々がこれまでに開発した GII 特異的蛍光基質（図 2）を用いて、培養細胞における GII 阻害アッセイ系により阻害活性評価を行なった。その結果、インドール誘導体の一部が EC_{50}=20～30 μM と既知阻害剤と同等の値を示し、これら類縁体の細胞内での標的酵素は小胞体 GII であることが示された。細胞毒性は、WST8 法で評価し、GII 阻害濃度と細胞毒性濃度に比較的大きな差が認められたため、蛍光量の減少が GII 阻害によるものであることを推定した。小胞体ストレス応答は、既知グルコシダーゼ阻害剤を用いた DNA マイクロアレイ解析（GEO Accession No. GSE40279）により顕著な発現上昇を示した小胞体ストレス応答タンパク質 HSP90 の発現上昇をウエスタンブロット法によって確認した。その結果、これらの誘導体による HSP90 の発現上昇が認められた。以上のことから、インドール誘導体の細胞内における作用点が GII であることが強く示唆された。

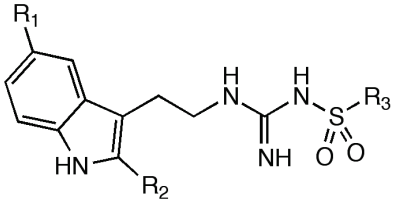


図 1．インドール誘導体の母格

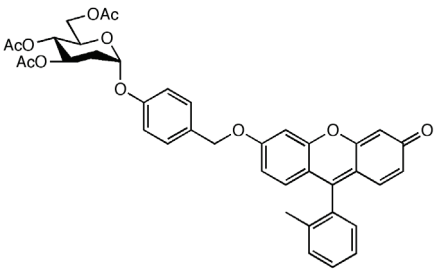


図 2．GII 特異的蛍光基質

glucosidase inhibitor, antiviral activity, ER stress

講演番号：2E11a02
講演日時、会場：3 月 27 日 09:11～ E 校舎 11 会場

Cremeomycin のジアゾ基形成に関与する新規亜硝酸生合成経路

A novel nitrite biosynthetic pathway for the biosynthesis of diazo group of cremeomycin

○菅井 佳宣、勝山 陽平、大西 康夫（東大院・農生科・応生工）
○Yoshinori SUGAI, Yohei KATSUYAMA, Yasuo OHNISHI (The University of Tokyo)

【目的・背景】N-N 結合をもつ天然化合物は約 200 種類程報告されており、強力な生理活性をもつものも含まれているが、その生合成機構はほとんど解明されていない。放線菌 *Streptomyces cremeus* が生産する cremeomycin は天然には珍しいジアゾ基（$-N_2$）を含む抗生物質である。生合成中間体と予想された 3-amino-4-hydroxybenzoic acid（3,4-AHBA）の生合成酵素を手掛かりに、これまでに *S. cremeus* から cremeomycin 生合成遺伝子クラスター（約 14 kb）の取得に成功していた。このクラスターは 3,4-AHBA 生合成遺伝子（*creI, H*）に加えて 4 つの生合成遺伝子（*creG, K, M, O*）を含んでいた。さらにコスミド上での遺伝子破壊と異種発現系を用いた解析から、CreO によるメチル化とそれに続く CreM による水酸化を受けて 3,4-AHBA が 3-amino-2-hydroxy-4-methoxybenzoic acid（3,2,4-AHMBA）に変換されることが判明していた（菅井ら、2014 年度日本放線菌学会大会）。今回、CreK と CreG の機能を解析し、cremeomycin の全生合成経路を解明した。

【結果・考察】これまでの結果から、CreK と CreG が 3,2,4-AHMBA から cremeomycin へのジアゾ化を担うと予想した。これら遺伝子の破壊株から 3,2,4-AHMBA 以外の中間体が検出されなかったことから、CreK もしくは CreG は何らかの窒素含有分子を基質として反応し、ジアゾ基末端側の窒素（-N≡N）を供給すると考えた。そこでこれら組換え酵素を調製し、基質の探索を行った。20 種類のアミノ酸を基質に酵素反応を行ったところ、CreK がアスパラギン酸を基質とした反応を触媒することを見出した。各種機器分析により、この反応生成物はアスパラギン酸のアミノ基が酸化されたニトロコハク酸であることが強く示唆された。一方、CreK 反応系に CreG を加え酵素反応を行ったところ、亜硝酸が検出されたことより、CreG はニトロコハク酸を基質として亜硝酸を生成する反応を触媒することが強く示唆された。弱酸性条件下で亜硝酸と 3,2,4-AHMBA を混合すると非酵素的にジアゾ化が起こり cremeomycin が生成した。当初、CreG は亜硝酸の生成だけでなく 3,2,4-AHMBA の酵素的ジアゾ化も触媒すると予想したが、CreG の *in vitro* 反応においてジアゾ化活性は検出されなかった。さらに *S. cremeus* の細胞抽出液からもジアゾ化活性が確認されなかったことから、cremeomycin 生合成における亜硝酸による 3,2,4-AHMBA のジアゾ化は非酵素的に進行すると結論した。

本研究により、わずか 2 種類の酵素（CreK, CreG）からなる新規な亜硝酸生合成経路が発見され、ジアゾ基の N-N 結合形成に関与していることが明らかになった。CreK, CreG のホモログは放線菌に広く分布しており、硝化や窒素同化とは異なる二次代謝に特化した亜硝酸生合成経路と考えられる。

diazo compound, nitrite, *Streptomyces*

講演番号：2E11a03
講演日時、会場：3 月 27 日 09:22～ E 校舎 11 会場

Streptomyces cremeus における Cremeomycin 生合成に関与する新規亜硝酸脱離酵素 CreG の X 線結晶構造解析

X-ray crystallographic analysis of the novel nitrous acid lyase CreG involved in the cremeomycin biosynthesis in *Streptomyces cremeus*

勝山 陽平[1]、○東山 洋輔[2]、佐藤 優花里[3]、菅井 佳宣[1]、千田 美紀[3]、千田 俊哉[3]、大西 康夫[1]（[1]東大院・農生科・応生工、[2]東大農・生命化学工学、[3]高エネ機構・物構研・PF・構造生物）

Yohei KATSUYAMA[1], ○Yosuke HIGASHIYAMA[2], Yukari SATO[3], Yoshinori SUGAI[1], Miki SENDA[3], Toshiya SENDA[3], Yasuo OHNISHI[1]（[1]The University of Tokyo, [2]Tokyo Univ., [3]KEK）

[背景]

放線菌 *Streptomyces cremeus* が生産する cremeomycin は、ジアゾ基を有する珍しい二次代謝産物である。我々のこれまでの研究により、このジアゾ基形成には、CreK, G という 2 つの酵素が担う新規亜硝酸生合成経路が関与していることが明らかになった。この経路では、まず CreK がアスパラギン酸のアミノ基を酸化し、ニトロコハク酸を合成する。次に、CreG がこのニトロ基の脱離を触媒し、亜硝酸とフマル酸が生成する。この亜硝酸が、CreI, H, M, O によって生成される 3-amino-2-hydroxy-4-methoxybenzoic acid と非酵素的に反応することで cremeomycin が生成する。*creKG* のホモログは種々の放線菌にオペロンを形成して保存されているため、この亜硝酸生合成経路は、放線菌の二次代謝生合成に幅広く用いられていることが予想される。アスパラギン酸のアミンを脱離する酵素は良く知られているが、ニトロ基を脱離する酵素は知られていない。本研究の目的は、CreG の結晶構造解析を行うことで、構造生物学的側面からこの酵素の機能を明らかにすることである。

[方法と結果]

組換え CreG の調製にはコールドショック発現系を用いた。N 末端に His_6-tag と Factor Xa 認識サイトを付加できる pColdI ベクターに *creG* をクローニングし、pColdI-*creG* を構築した。terrific broth に pColdI-*creG* を保持した大腸菌 BL21(DE3)を植菌し、37°C で OD_{600} が 0.5 に達するまで培養を行った。これに 0.02 mM IPTG を加えて発現を誘導し、15°C でさらに 30 時間培養した。菌体を超音波によって破砕し、組換え CreG を Ni^{2+}アフィニティークロマトグラフィーにより精製した。タンパク溶出画分を濃縮、脱塩した後、Factor Xa により His_6-tag を切除した。その後、陰イオン交換クロマトグラフィーによりさらに精製を行った。得られた精製タンパク質を 8 mg/ml まで濃縮し、Hampton 社が市販するスクリーニングキット (Index および Crystal Screen)を用いて、sitting-drop 蒸気拡散法により結晶化条件を探索したところ、複数の条件で微結晶が見られた。この初期条件をもとに結晶化条件の最適化を行った結果、0.2 M ammonium acetate, 0.1 M Bis-Tris pH 6.3～6.4, 25% PEG3,350 を含むリザーバー溶液と 10 mg/ml のタンパク溶液を混合し、20°C で 2～3 日静置することで、結晶が再現性よく得られた。PF でこれらの結晶に X 線を照射したところ、分解能約 6.0 Åの回折像が得られた。現在、抗凍結剤等を検討することで分解能の改善を試みている。また、セレノメチオニン含有 CreG の結晶を作製して、MAD 法により位相決定を行う予定である。

diazo compound, nitrite, *Streptomyces*

講演番号：2E11a04
講演日時、会場：3 月 27 日 09:33～ E 校舎 11 会場

Streptomyces sp. JE-08 由来シクロペンタ[*b*]ピリジン環構造を有するポリケタイド JBIR-70 の生合成

Biosynthesis of JBIR-70, a polyketide with a cyclopenta[*b*]pyridine ring from *Streptomyces* sp. JE-08

○太島 有香[1]、勝山 陽平[1]、泉川 美穂[2]、大野 翔登[1]、荒川 孝俊[1]、伏信 進矢[1]、新家 一男[3]、大西 康夫[1] ([1]東大院・農生科・応生工、[2]JBIC、[3]AIST)

○ Yuka TAJIMA[1], Yohei KATSUYAMA[1], Miho IZUMIKAWA[2], Syoto OHNO[1], Takatoshi ARAKAWA[1], Shinya FUSHINOBU[1], Kazuo SHIN-YA[3], Yasuo OHNISHI[1] ([1]Tokyo Univ., [2]JBIC, [3]AIST)

【背景】

放線菌 *Streptomyces* sp. JE-08 の生産する二次代謝産物である JBIR-70（streptazone E）は、シクロペンタ[*b*]ピリジン環という天然では珍しい構造を有することが知られている。我々のグループによるこれまでの研究から、この化合物の生合成は I 型ポリケタイド合成酵素遺伝子を含む遺伝子クラスター（*stz* 遺伝子クラスター）が担っていることが、ゲノムシーケンシング並びに遺伝子破壊実験により明らかとなっていた。しかし、破壊株の生産する生合成中間体の構造が未同定であったため、生合成経路の提唱には到っていなかった。本研究の目的は、破壊株において生産される JBIR-70 生合成中間体の構造決定、並びにシクロペンタ[*b*]ピリジン環構造に関わる酵素の機能を明らかとすることである。

【方法と結果】

これまでの研究より JBIR-70 のシクロペンタ[*b*]ピリジン環形成は、StzE, F という 2 つの環化酵素によって触媒されると予想された。そこで、*stzE, F* 破壊株の低分子化合物を LC-MS によって分析したところ、いずれの破壊株も JBIR-70 を生産しておらず、代わりに 380 nm に極大を持つポリエン構造を有する生合成中間体と考えられる化合物 **1** を生産していた。2 L の *stzE* 破壊株培養液より、化合物 **1** の精製を試みたが、精製過程で分解する不安定な化合物であったため、化合物 **1** を $NaBH_4$ により還元、安定化した後に精製を行った。得られた還元型化合物 **1** を ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR, H-H COSY, HMQC, HMBC, HR-MS により解析した結果、その構造が明らかとなり、化合物 **1** の構造も予想できた。化合物 **1** はエポキシ環構造を有しており、それ故に求電子性が高くなっている。このことから環化酵素 StzE, F によって、エポキシ環開裂と、それに続く 5 員環形成が触媒されることで、シクロペンタ[*b*]ピリジン環の形成が行われていることが示唆された。

次に、環化酵素 StzE, F の *in vitro* 解析を行った。プルダウンアッセイにより、StzE, F は互いに相互作用を行っていることが示唆され、ゲル濾過分析により、StzE, F はそれぞれ二量体を形成して存在することが示唆された。また、これらの酵素の立体構造に興味がもたれたため、精製が容易な StzE について結晶化を行い、X 線結晶構造解析に供した。その結果、分解能 2.2 Å の回折像が得られた。現在、セレノメチオニン含有型 StzE を用いて MAD 法による位相決定を行っている。さらに、StzE, F と中間体の *in vitro* における酵素活性を調べるため、反応条件を検討している。

biosynthesis, Streptomyces, polyketide

講演番号：2E11a05
講演日時、会場：3 月 27 日 09:44～ E 校舎 11 会場

SARP ファミリー転写活性因子の過剰発現による Streptomyces sp. JE-08 の休眠生合成遺伝子の活性化

Activation of cryptic biosynthetic genes by overexpression of SARP family transcriptional activators in Streptomyces sp. JE-08

○杜 丹ヤオ[1]、勝山 陽平[1]、新家 一男[2]、大西 康夫[1] ([1]東大院・農生科・応生工、[2]産業技術総合研究所)
○DANYAO DU[1], YOHEI KATSUYAMA[1], KAZUO SHINYA[2], YASUO OHNISHI[1] ([1]The university of Tokyo, [2]AIST)

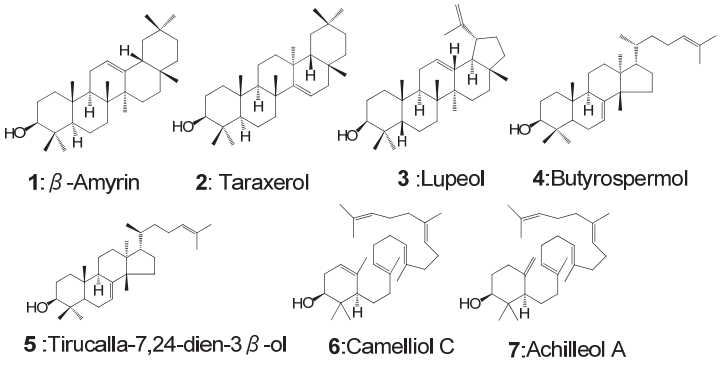
【背景と目的】*Streptomyces* 属放線菌のゲノムには 20-30 個程度の二次代謝産物生合成遺伝子クラスターが存在しているが、その多くは通常の実験室培養条件では発現しない「休眠生合成遺伝子クラスター」であることが示唆されている。これらの休眠遺伝子を活性化することによって、新規構造を有する化合物が取得されることが期待できることから、さまざまな手法による休眠生合成遺伝子クラスターの活性化が試みられてきている。放線菌 *Streptomyces* sp. JE-08（以下 JE-08 と略す）は okicenone および streptazone 類の生産菌である。JE-08 のドラフトゲノム解析の結果、これらの化合物の生合成遺伝子クラスター以外にも 25 個程度の二次代謝産物生合成遺伝子クラスターが見出されたが、その多くは休眠生合成遺伝子クラスターであると考えられた。本研究では、JE-08 から新規構造をもつ化合物を単離し、その生合成遺伝子を明らかにすることを目的として、SARP (*Streptomyces* antibiotic regulatory protein) の過剰発現による休眠遺伝子の活性化を試みた。SARP は放線菌で保存されている転写活性化因子であり、近辺にコードされている二次代謝産物生合成遺伝子クラスターの経路特異的転写活性化因子としてはたらく例が多く知られているが、過剰発現させた場合は、離れた位置に存在する二次代謝産物生合成遺伝子クラスターを直接的あるいは間接的に活性化する可能性もあると考えた。【方法と結果】JE-08 のドラフトゲノムから SARP 遺伝子を BLAST 検索した結果、未知化合物の生合成に関与していると思われる SARP 遺伝子を 8 つ見出した。これらの SARP 遺伝子を *ermE**プロモーターの下流に配置して pTYM19 にクローニングし、JE-08 ゲノムに組み込ませることによって、各 SARP 遺伝子の過剰発現株を構築した。種々の培養条件で SARP 遺伝子過剰発現株と野生株の代謝プロファイルを比較したところ、野生株では生産されていない化合物が、ORF07803 の過剰発現株で 1 つ（化合物 **1**）、ORF02288 の過剰発現株で 2 つ（化合物 **2**、**3**）見つかった。化合物 **1** を単離精製し、^{1}H NMR、^{13}C NMR、COSY、HMBC、HMQC で構造解析した結果、この化合物はポリエン構造をもつカルボン酸と β-アラニンが結合した新規化合物であることが明らかになった。ポリエン構造を合成すると予測されるポリケチド合成酵素遺伝子を含む遺伝子クラスターは、ORF07803 の上流と下流に 1 つずつ、さらに、ゲノム上のその他の場所に 2 つ存在していた。現在、いずれの生合成遺伝子クラスターが化合物 **1** の生合成を担っているかについて遺伝子破壊による確認を試みている。一方、化合物 **2**、**3** は UV 吸収スペクトラム等から類縁体であることが示唆された。化合物 **3** は非常に不安定であり単離精製が困難であったため、化合物 **2** を単離精製し、現在、構造決定を進めている。

cryptic gene, SARP, Streptomyces

講演番号：2E11a06
講演日時、会場：3 月 27 日 10:05～ E 校舎 11 会場

β-アミリン合成酵素：L734 および V483 部位のかさ高さが環化反応に及ぼす影響
β-Amyrin biosynthesis: influence of the steric bulk at 734 and 483 positions on the polycyclization cascade
○中川 和也、仲田 知佳、伊藤 遼介、仲野 千秋、星野 力 (新潟大農)
○Kazuya Nakagawa, Chika Nakada, Ryousuke Ito, Chiaki Nakano, Tsutomu Hoshino (Fac. Agri., Niigata Univ.)

【目的と背景】天然甘味料のグリチルリチン酸は、植物に普遍的に存在するβ―アミリンから生合成される。トリテルペン環化酵素は、鎖状の（オキシド）スクアレンを環化して、主に 4 環や 5 環性骨格を構築する。現在、アミノ酸レベルでの詳細な機能解析は、我々が行ってきたホペン[1)] やラノステロール酵素のみである。[2)] 我々はβ―アミリン合成酵素(EtAS)のアミノ酸レベルでの触媒機構解明を進めてきたが、[3)] 今回 L734 と V483 を取り上げる。【方法】QuikChange 法により EtAS L734 残基を G、A、V、H、I、M、F、Y、W に、V483 残基を G、A、I、F、に、それぞれ置換し、*S. cerevisiae* GIL77 へ形質転換した。野生株と各変異株の酵素産物の変化を *in vivo* で解析した。【結果】**Ⅰ）L734 残基**：GC-MS 解析の結果、L734 変異体では **1** 以外に **2**～**5** のプロダクトを産生した（下図）。**1** の生産量は野生株に対し G (30.4%)、A (35.8%)、V (86%)、H (78.3%)、I (82.9%)、M (88.3%)、F (89%) であった。全ての変異体において Taraxerol の生産が確認され、サイズの小さな G、A 変異体ではその割合が高かった（(G69.6%)、A(64.2%)）。従って L734 残基は基質の D 環付近に位置し、側鎖の適切なバルクサイズが正常な環化反応に必須であることが示唆された。また、H 変異体では、微量であるが Lupeol の生産を確認した。**Ⅱ）V483 残基**：この残基は、カメリオール合成酵素（AtCAMS1）では A484、[4)] シクロアルテノール合成酵素（AtCAS1）では I481 に相当する。AtCAS1 の I481G、I481A の変異体から単環性プロダクトの生成が報告された。[5)] EtAS V483 も同様な機能があるか検討した。**1** 以外に **4**～**7** の生成を確認した。**1** の生産量は野生株に対し G(10.5%)、A (38.2%)、I (96.5%)であった。F 変異体では活性がなかった。即ち、側鎖のバルクサイズが野生株の V に近づくと、正常な環化物が多くなった。また、単環性プロダクトの生産量は G (89.5%), A (61.7%)であり、EtAS においてもサイズの小さな残基の置換によって単環性化合物の生産量が増えた。



1) Hoshino; Sato, *Chem. Commun*. **2002**、291（Review）. 2) Wu, T. K.et al, *Chem. Rec*., **2008**, 8, 302 (Review). 3) *FEBS, J* **2013**,*280*,1267; *Chem-Eur, J* **2013**, *19*, 17150; *OBC* **2014**, *12*, 3836; *Org. Lett*., **2014**, *16*, 3548. 4) Kolesnikova et al.**,** *Org. Lett*, **2007**, *9*, 5223. 5) Matsuda et al., *Org. Lett.*, **2000**, *2*, 2261.

β-amyrin, triterpene cyclase, oxidosqualene

講演番号：2E11a07
講演日時、会場：3 月 27 日 10:16～ E 校舎 11 会場

β-アミリン合成酵素：M729 部位のかさ高さが環化反応に及ぼす影響
β-Amyrin biosynthesis: influence of the steric bulk at 729 position on the polycyclization cascade
○仲田 知佳[1]、中川 和也[2]、伊藤 遼介[1]、天利 佳奈子[2]、仲野 千秋[1]、星野 力[1,2] ([1]新潟大院自、[2]新潟大農)
○Chika NAKADA[1], Kazuya NAKAGAWA[2], Ryousuke ITO[1], Kanako AMARI[2], Chiaki NAKANO[1], Tsutomu HOSHINO[1,2] ([1]Grad. Sch. Sci. Technol., Niigata Univ., [2]Fac. Agri., Niigata Univ.)

【目的と背景】β-amyrin 合成酵素の M729 残基は、五環性トリテルペン合成酵素において高く保存されている。また、M729 の隣の F728 残基は D/E 環近傍に位置し、カチオンーπ相互作用により四環性及び五環性カチオンの安定化を担うことを我々は明らかにしてきた[1)]。M729 残基も D/E 環近傍に存在し触媒に何らかの影響を及ぼしていると考え *in vivo* での機能解析を行った。【方法】QuikChange 法により EtAS M729 残基を G、A、V、F、W に置換し、*S. cerevisiae* GIL77 へ形質転換した。菌体内で生成する EtAS 量は western blot 法で求めた。この際 GAPDH を内部標準として利用した。一方、生産されたトリテルペンは GC で定量した。【結果】GC-MS 解析の結果、M729 変異体では **1**～**6** のプロダクトを産生していることがわかった（図１）。G、A 変異体では野生株では生成されない **2**、**3**、**4** を生成した。一方、W 変異体はプロダクトを生成しなかった。これは M729 部位での側鎖のサイズの重要性を示唆している。実際に、β-amyrin(**1**)の相対活性を見てみると、G(30.0%)、A(63.8%)、V(68.4%)、L(99.6%)、F(71.5%)となっており、側鎖の van der Waals 体積に比例する結果となった。H 変異体は例外な結果を示した。野生株とほぼ同等のバルクサイズであるにも関わらず **1** の相対活性は 17.2%だった。また、ルペオールの生成比率が 19.5%と高い数値を示した。これは、His 残基がルペニルカチオン付近に存在し、脱プロトン塩基として働いたことを示している。

1) Ito R. *et al. Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 17150-17158.

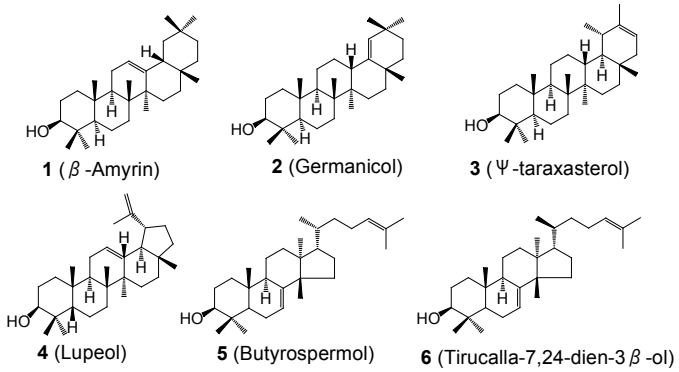


図 1. M729 変異体の産生するプロダクト

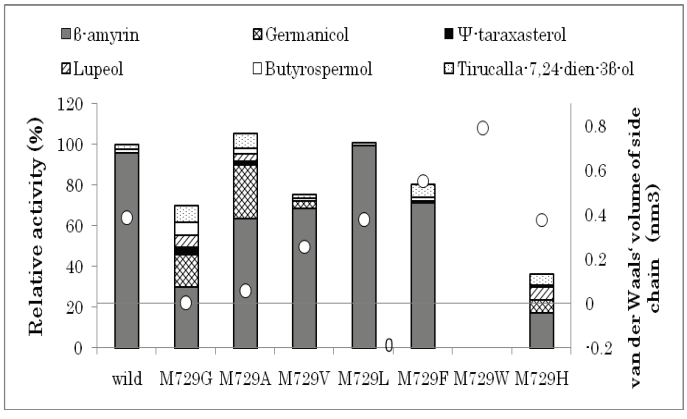


図 2. 野生株及び M729 変異体の相対活性(%)

β-amyrin, triterpene cyclase, oxidosqualene

講演番号：2E11a08
講演日時、会場：3 月 27 日 10:27～ E 校舎 11 会場

病原性結核菌に特異的に存在する Rv3378c の X 線構造解析とその触媒機構

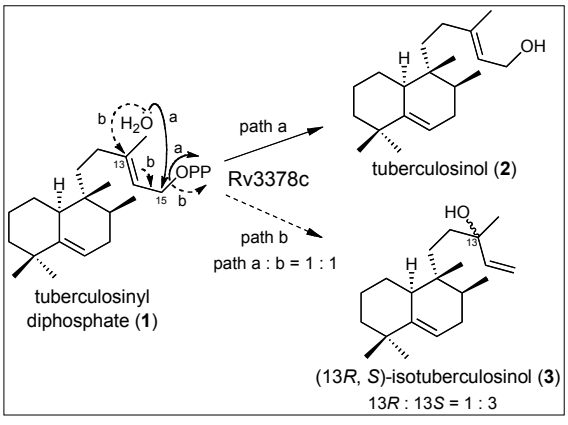
X-ray crystal structure and catalytic mechanism of Rv3378c specific to the virulent *Mycobacterium* species

Hsiu-Chien Chan[2]、Xinxin Feng[3]、Tzu-Ping Ko[4]、○仲野 千秋[1]、星野 力[1]、Eric Oldfield[3]、Rey-Ting Guo[2] ([1]新潟大院自、[2]中国科学院天津工業生物技術研究所、[3]イリノイ大学化学科、[4]中央研究院生物化学研究所)

Hsiu-Chien Chan[2], Xinxin Feng[3], Tzu-Ping Ko[4], ○Chiaki Nakano[1], Tsutomu Hoshino[1], Eric Oldfield[3], Rey-Ting Guo[2] ([1]Grad. Sch. Sci. Technol., Niigata Univ., [2]Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, [3]Department of Chemistry, University of Illinois, [4]Institute of Biological Chemistry, Academia Sinica)

【背景】我々は、結核菌 *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv のジテルペン合成酵素 Rv3377c と Rv3378 の機能解析を世界に先駆けて発信し、また、両遺伝子が病原菌株のみに特異的に存在することも初めて報告した[1~3]。即ち Rv3377c が GGPP から tuberculosinyl diphosphate (**1**) を、隣接する Rv3378c が **1** の二リン酸の脱離に伴う水付加反応を触媒し、tuberculosinol (**2**) や (13*R*, *S*)-isotuberculosinol (**3**) を合成するジテルペン合成酵素であった[1~3]。また、**2** と **3** がヒトマクロファージ様細胞の貪食活性を抑制したことから、両遺伝子は結核菌の病原性に深く関与することも明らかにした[4]。Rv3378c は既知のテルペン合成酵素と相同性をもたない新規酵素である。我々は触媒機構の解明のため国際共同研究を実施し、Rv3378c の X 線結晶構造解析に成功した[5]。

【方法・結果】2.1 Å の分解能を得た。Rv3378c は、配列相同性を持たないが大腸菌由来の undecaprenyl diphosphate synthase (EcUPS) 等のシス型プレニルトランスフェラーゼと同じ全体構造を取ることが判明した。そこで EcUPS-Mg^{2+}-*S*-*thiolo*-FPP の共結晶体と Rv3378c を重ね合わせ、活性部位の推定を行った。その結果、Rv3378c の Y51 と Y90 が *S*-*thiolo*-FPP の二リン酸側のアリル部位に近接していたことから、本残基が活性部位として推定された。Y51F/Y90F 変異株の活性は野生株の 5%と低下した。本変異株を用い、**1** との共結晶体を得た。共結晶の構造から、Y51 と Y90 は **1** の C-15 および C-13 と近接していたことから、両残基のフェノキシドイオンが水分子と水素結合を形成し、水付加反応を活性化することが示唆された[5]。また、EcUPS の D26 は Mg^{2+}と配位し、R30 は二リン酸と水素結合を形成し、FPP の二リン酸との結合および脱離反応を行う[6]。Rv3378c においても D34 および R38 が保存されていた。D34A、R38A 変異株は、主に **3** の生産が大幅に低下したことから、両残基は **1** の二リン酸との結合および脱離反応に関与することが示唆された[5]。本研究により、Rv3378c の反応機構を明らかにすることができ、新たな抗結核菌薬開発へと繋がることが期待される。



1) C. Nakano *et al*., *Chem. Commun*., 1016, (2005). 2) C. Nakano & T. Hoshino, *ChemBioChem*, **10**, 2060, (2009). 3) C. Nakano *et al*., *BBB*, **75**, 75, (2011). 4) T. Hoshino *et al*., *OBC*, **9**, 2156, (2011). 5) H.-C. Chan *et al*., *JACS*, 2892, (2014). 6) R.-T. Guo *et al*., *JBC*, 20762, (2005).

diterpene, *Mycobacterium tuberculosis*, terpene synthase

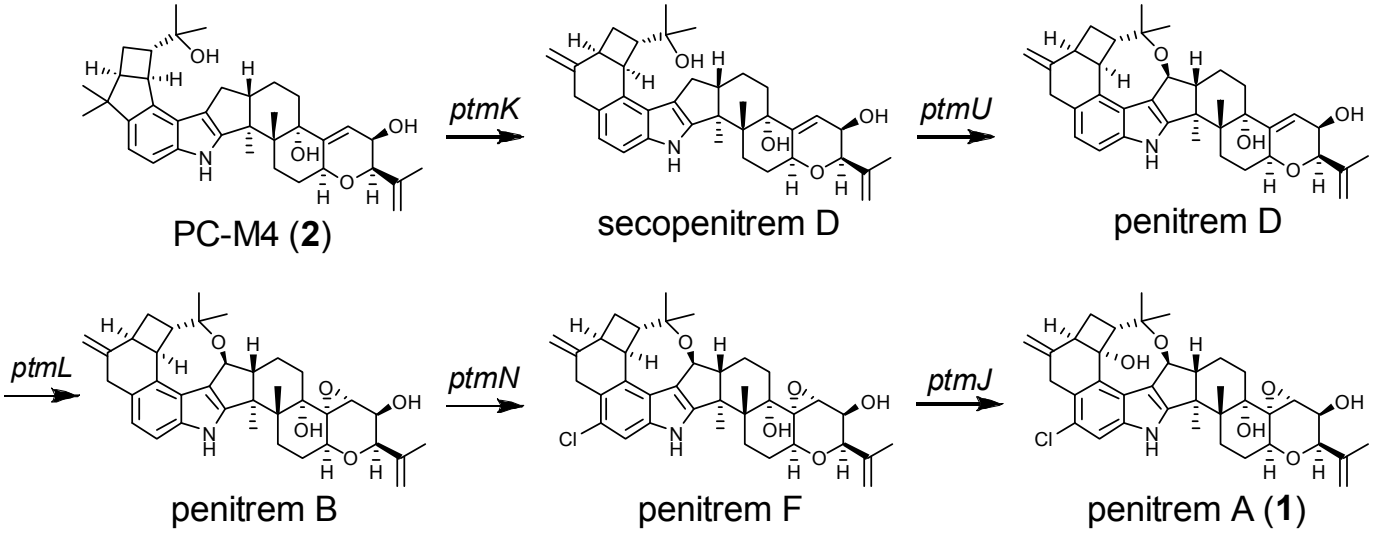
講演番号：2E11a09
講演日時、会場：3 月 27 日 10:38～ E 校舎 11 会場

麹菌異種発現系を利用したインドールジテルペン、ペニトレムの生合成研究-1
Reconstitution of biosynthetic machinery for indole-diterpene penitrem in Aspergillus oryzae-1

○松本 知之[1]、劉 成偉[2]、田上 紘一[1]、南 篤志[2]、鈴木 秀幸[3]、五味 勝也[4]、及川 英秋[2]([1]北大院総化、[2]北大院理、[3]かずさ DNA、[4]東北大農)
○Tomoyuki MATSUMOTO[1], Chengwei LIU[2], Koichi TAGAMI[1], Atsushi MINAMI[2], Hideyuki SUZUKI[3], Katsuya GOMI[4], Hideaki OIKAWA[2] ([1]Grad. Sch. Chem. Sci. Eng., Hokkaido Univ., [2]Hokkaido Univ., [3]Kazusa DNA Res. Inst., [4]Tohoku Univ.)

研究背景)糸状菌 *Penicillium crustosum* から単離されたマイコトキシンである penitrem A (**1**) は、インドール環とテルペノイド骨格が融合した構造を有する、インドールジテルペンである。**1** は多くの酸素官能基が導入された複雑な環構造を有し，その骨格構築機構に興味が持たれている。生産菌から単離された同族体の化学構造を比較すると、**1** は PC-M4 (**2**)に対する酸化的な修飾反応により生合成されることが予想された。本研究では麹菌 *Aspergillus oryzae* NSAR1 **株を用いた**異種発現系を利用して **2** から **1** への酸化的修飾反応の解明を目指し、生合成遺伝子の機能解析を試みた。

方法・結果)まず、penitrem 生産菌である *P. crustosum* のゲノム解析および RNA-seq 解析により、17 個の酵素遺伝子からなる生合成遺伝子クラスターを同定した。このうち、4 種の Cytochrome P450 とフラビン依存性酸化酵素が **2** に対する酸化的修飾反応に関与すると予想された。反応に関与する遺伝子の同定を行うため、複数の候補遺伝子を導入した *A. oryzae* 形質転換体を作製し、同族体を用いた投与実験をおこなった。その結果、K/U/N 導入株では環拡大/エーテル環化/ハロゲン化を、K/O/L 導入株および K/J/L 導入株では環拡大/エポキシ化の進行を確認した。これより、以下の図に示すように酸化的修飾反応を推定できた。推定した個々の反応は、各遺伝子の単独導入株に対する投与実験においても確認された。現在は、真の生合成経路を決定するため、ハロゲン化酵素による同族体の変換量の違いについて検討している。



indole-diterpene, penitrem, biosynthesis

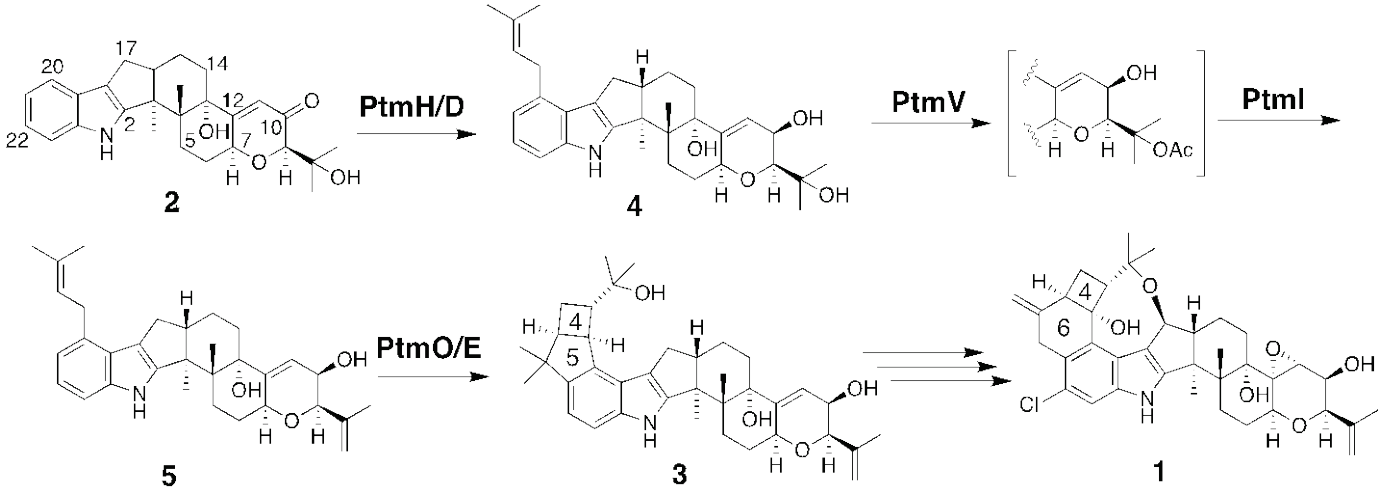
講演番号：2E11a10
講演日時、会場：3 月 27 日 10:49～ E 校舎 11 会場

麹菌異種発現系を利用したインドールジテルペン、ペニトレムの生合成研究- 2
Reconstitution of biosynthetic machinery for indole-diterpene penitrem in Aspergillius oryzae-2

○劉 成偉[1]、田上 紘一[2]、松本 知之[2]、南 篤志[1]、鈴木 秀幸[3]、五味 勝也[4]、及川 英秋[1]([1]北大院理、[2]北大院総化、[3]かずさＤＮＡ、[4]東北大農)
○Chengwei LIU[1], Koichi Tagami[2], Tomoyuki Matsumoto[2], Atsushi Minami[1], Hideyuki Suzuki[3], Katsuya Gomi[4], Hideaki Oikawa[1] ([1]Hokkaido Univ., [2]Grad. Sch. Chem. Sci. Eng., Hokkaido Univ., [3]Kazusa DNA Res., Inst., [4]Tohoku Univ.)

【目的】インドールジテルペン系化合物の中でもペニトレム（**1**）は、最も複雑な構造を有するマイコトキシンである。**1** はパキシリン（**2**）などの類縁化合物とは異なり、インドール環に隣接する特徴的な 4 / 6 員環縮環構造を有する。さらに、**1** の生合成中間体と思われる PC-M4（**3**）は 4 / 5 員環を有する。本研究では **3** の骨格構築を触媒する酵素の特定と生合成経路の解明を目指して研究を行った。

【方法・結果】PC-M4 にみられる特徴的な 4 / 5 員環部分は、パキシリン骨格に体するプレニル化とそれに続く環化反応により構築されると推定できるが、関与する酵素およびその基質や各反応の順序などは予想が困難であった。そこで、複数の候補遺伝子を導入した麹菌異種発現株を調製し、**2** の投与実験を行った。生成物の分析の結果、6 種の修飾酵素（H/D/V/I/O/E）を導入した株から新たな生成物が確認され、各種スペクトルデータよりその構造は **3** と決定した。また、2 種の遺伝子導入株（H/D）と 5 種の遺伝子導入株（H/D/V/I/E）からはモノプレニル化体である **4** と **5** がそれぞれ得られた。これより、**2** から **3** への生合成経路を下図に示すように推定できた。続いて、組換え酵素 PtmD を用いた in vitro 解析を行った。プレニル基受容体に対する基質特異性を検討したところ、**2** から **4** への変換は環元/プレニル化の順番で進行することが分かった。現在、酸化酵素 PtmO とプレニル基転移酵素 PtmE による 4 /5 員環の構築機構を解明するため、異種発現系を利用した生合成中間体の同定と in vitro での機能解析を検討している。



indole-diterpene, penitrem, paxilline

講演番号：2E11a11
講演日時、会場：3 月 27 日 11:10～ E 校舎 11 会場

安定同位体標識生合成中間体を用いた麻痺性貝毒生合成研究

Study on the biosynthesis of paralytic shellfish toxins using stable isotope labeled biosynthetic intermediates

○土屋 成輝[1]、長 由扶子[1]、此木 敬一[1]、長澤 和夫[2]、大島 泰克[3]、山下 まり[1] ([1]東北大院農、[2]東京農工大院工、[3]東北大院生命科学)

○Shigeki Tsuchiya[1], Yuko Cho[1], Keiichi Konoki[1], Kazuo Nagasawa[2], Yasukatsu Oshima[3], Mari Yotsu-Yamashita[1] ([1]Tohoku Univ. Agr., [2]Tokyo Univ. of Agric. and Technol. Tech., [3]Tohoku Univ. Life Sci.)

【背景・目的】麻痺性貝毒 (PSTs)は、電位依存性 Na^+チャネルを特異的に阻害する水溶性アルカロイド群であり、代表的な化合物としてサキシトキシン(STX, **1**)がある。また、多くの類縁体が存在することも知られている。これらは、淡水産藍藻や海産渦鞭毛藻が生産する。生合成に関する研究では、淡水産藍藻(*Anabaena circinalis*, *Lyngbya wollei*)および海産渦鞭毛藻(*Alexandrium fundyense*, *A. minutum*)のゲノム中に STX 生合成遺伝子クラスターや相同遺伝子が見つかり、生合成経路が推定されている[1]。しかし、生合成中間体の構造に関し、詳細な化学的証明はなされていなかった。

我々は、生合成中間体 (Int-A' (**3**), Int-C'2 (**4**))を化学合成し、LC-MS で藍藻有毒株 *A. circinalis* (TA04)、渦鞭毛藻有毒株 *A. tamarense* (Axat-2)から同定した[2]。今回は、すでに同定した化合物が、麻痺性貝毒生合成の前駆体であることを完全に証明するために、安定同位体でラベルした **3**,**4** を合成し、*A. circinalis* (TA04)における取り込み実験を行った。

【方法・結果】$[^{15}N_2]$Ornithine を出発物質とし、$[^{15}N_2]$Int-A'及び$[^{15}N_2]$Int-C'2 を合成した。*A. circinalis* (TA04)の培地に添加し、これらラベル化中間体が生合成に利用され、TA04 の主要な生産麻痺性貝毒(C2 (**5**))がラベル化されるか LC-MS で分析した。

$[^{15}N_2]$Int-A'及び$[^{15}N_2]$Int-C'2 を添加したところ、ラベル化された C2 (**5**)のピーク強度の増加が観測された。これは、Int-A' (**3**)、Int-C'2 (**4**)が麻痺性貝毒の生合成中間体であることを示唆する結果である。

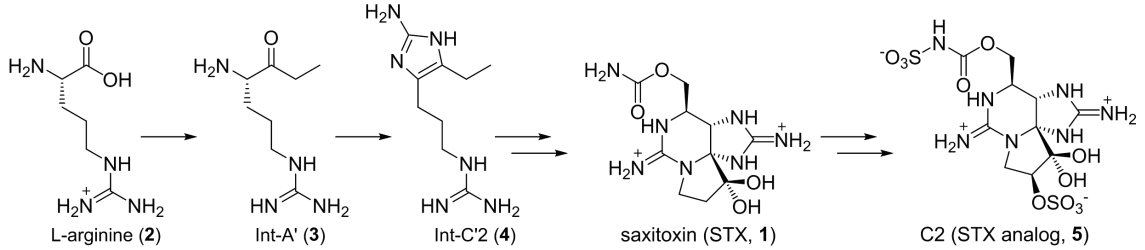


Fig. 1. Putative biosynthetic pathway of PSTs.[1,2]

[1] a) R. Kellmann, T. K. Mihali, Y. J. Jeon, R. Pickford, F. Pomati, B. A. Neilan, *Appl. Environ. Microbiol.*, **2008**, *74*, 4044-4053.
b) A. Stüken, R. J. S. Orr, R. Kellmann, S. A Murray, B. A. Neilan, K. S.Jakobsen, *PLoS One*, **2011**, *6*, e20096.
[2] S. Tsuchiya, Y. Cho, K. Konoki, K. Nagasawa, Y. Oshima, M. Yotsu-Yamashita, *Org. Biomol. Chem.*, **2014**, *12*, 3016-3020.

paralytic shellfish toxins, biosynthetic intermediate, saxitoxin

講演番号：2E11a12
講演日時、会場：3 月 27 日 11:21～ E 校舎 11 会場

麻痺性貝毒の予想生合成中間体 E'の探索と精製

Screening and purification of the predicted biosynthetic intermediate E' of paralytic shellfish toxins in the cyanobacterium Anabaena circinalis

○吉岡 廉平[1]、長 由扶子[1]、土屋 成輝[1]、此木 敬一[1]、小柴 生造[2]、大島 泰克[3]、山下 まり[1]([1]東北大院農、[2]東北大東北メデイカル・メガバンク機構、[3]東北大院生命科学)

○Renpei Yoshioka[1], Yuko Cho[1], Shigeki Tsuchiya[1], Keiichi Konoki[1], Seizo Koshiba[2], Yasukatsu Ohshima[3], Mari Yamashita[1] ([1]Grad. Sch. of Agri. Sci., Tohoku Univ., [2]Tohoku Medical Megabank Org., Tonoku Univ., [3]Grad. Sch. of Life Sci., Tohoku Univ.)

【背景・目的】 麻痺性貝毒(PSTs)は saxitoxin (STX, **1**)[1)]骨格を有する化合物群の総称であり、電位依存性 Na^+チャネルを特異的に阻害する神経毒である。30 以上の類縁体が確認されており、食中毒の原因物質として知られている。近年、淡水産藍藻(*Anabaena circinalis, Lyngbya wollei*)及び海産渦鞭毛藻(*Alexandrium fundyense, A. minutum*)のゲノム中に STX 生合成遺伝子クラスター及び相同遺伝子が発見され、アルギニン(**2**)からの STX の生合成経路が推定された(Fig.1) [2-4)]。推定された STX 予想生合成中間体の中で、初期中間体 2 種を当研究室の土屋が合成し、その存在を証明したが[5)]、その他の STX 予想生合成中間体の化学的同定は未だ不十分である。

本研究では、STX 予想生合成中間体の化学的同定を行うため、PSTs 生産藍藻 *A. circinalis* TA04 株の細胞および培養液中を探索した。その結果から存在が示唆された中間体について精製を行い、より多くの構造情報を得て構造を証明することを目的とした。

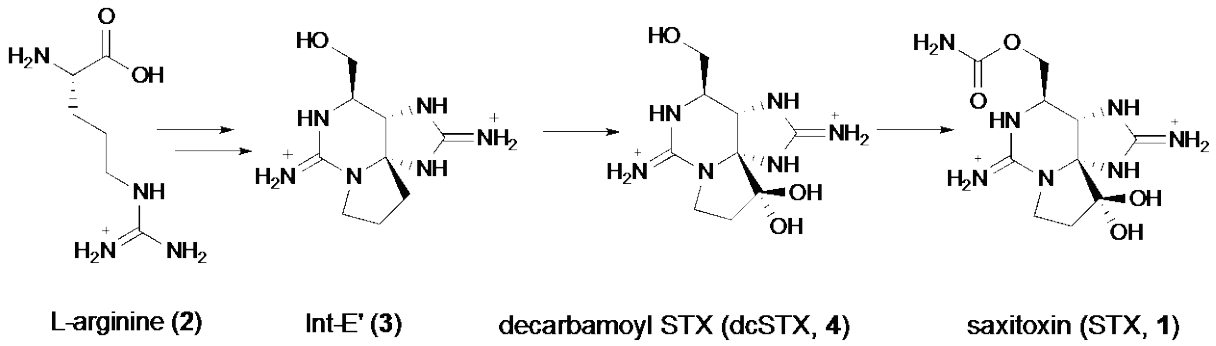


Fig.1 Putative biosynthetic pathway of PSTs[2-4)]

【方法･結果】 *A.circinalis* TA04 株の培養細胞及び培養液中に、Int-E' (**3**)(Fig.1)と同じ分子式($C_9H_{16}N_6O$)をもつ化合物が複数存在することが HR-LC-MS により示された。そこで、LC-MS でモニターしながら、各種カラムクロマトグラフィーを用いて、この分子式を示す化合物群の中で最も存在量が多い化合物の精製を試みた。得られた量は極微量であったが、本化合物を HR-LC-MS/MS, NMR(TOCSY, HSQC)測定に供して分析した。その結果、HR-MS/MS スペクトルでは Int-E'と構造類似の dcSTX (**4**)(Fig.1)と類似したフラグメントパターンを示し、また NMR スペクトルでも本化合物が Int-E'であることを支持するデータが得られた。現在、さらに検討を続けている。

Ref.) 1) Llewellyn, L. *et al.*, *Nat. Prod. Rep.* **23**, 200-222 (2006). 2) Kellmann, R. *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 4044-4053 (2008). 3) Mihali, T. K. *et al.*, *PLoS One* **6**, e14657 (2011). 4) Stüken, A. *et al.*, *PLoS One* **6**, e20096 (2011). 5) Tsuchiya, S. *et al.*, *Org. Biomol. Chem.* **12**, 3016-3020 (2014).

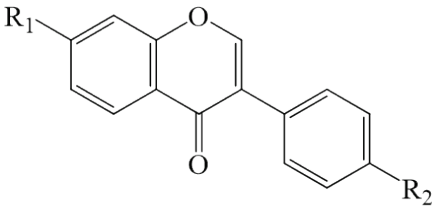
Paralytic Shellfish Toxin, Biosynthesis, LC-MS

講演番号：2E11a13
講演日時、会場：3 月 27 日 11:32～ E 校舎 11 会場

ダイズ葉に flavonoid 類を誘導する FACs
Fatty acid amino acid conjugates inducing flavonoids in soybean leaves
○青木 謙太[1]、中田 隆[1]、吉永 直子[1]、寺石 政義[1]、奥本 裕[1]、小野 肇[1]、西田 律夫[1]、森 直樹[1]、シュメルツ エリック[2] ([1]京都大農、[2]カリフォルニア大学サンディエゴ校)
○Kenta AOKI[1], Ryu NAKATA[1], Naoko YOSHINAGA[1], Masayoshi TERAISHI[1], Yu OKUMOTO[1], Hazime ONO[1], Ritsuo NISHIDA[1], Naoki MORI[1], Eric SCHMELZ[2] ([1]Kyoto Univ., [2]UCSD)

植物は外敵に対して様々な防御応答を持つ．例えばダイズ・トウモロコシ・タバコ等では，鱗翅目幼虫に食害を受けると揮発成分を放出し，寄生蜂はその揮発成分を利用して寄主を発見すると考えられている．これは植物の間接防御反応である．植物に揮発成分を放出させるエリシターとして，数種の鱗翅目幼虫の吐出し液から FACs (Fatty acid Amino acid Conjugates) が同定されている．我々は，鱗翅目幼虫に食害されたダイズの葉で，揮発成分の放出以外にも daidzein, daidzin, malonyldaidzin, formononetin, ononin, malonylononin 等の flavonoid 類とその配糖体，マロニル配糖体 (Fig. 1) の生成が誘導されることを見出し，本大会で発表した．本研究ではダイズ葉に対してこれらの flavonoid 類を誘導するエリシターの探索に向けて，有機合成した様々な FACs のダイズに対する flavonoid 類の誘導活性を調べた．

鱗翅目幼虫の持つ FACs である *N*-linolenoyl-L-glutamine, *N*-linoleoyl-L-glutamine とその構造類縁体 *N*-linoleoyl-L-glutamate 等を有機合成し，ダイズに供試したところ，*N*-linolenoyl-L-glutamine, *N*-linoleoyl-L-glutamine で処理したダイズで daidzin, malonyldaidzin が誘導された．しかし，formononetin の誘導は確認できなかった．また，その他のアミノ酸縮合物にはエリシター活性は確認できなかった．鱗翅目幼虫の吐き出し液中の FACs で食害により誘導される flavonoid の一部である daidzin, malonyldaidzin が誘導された結果から，FACs がダイズ葉に flavoniod 類を誘導するエリシターの一つであることが示唆された．食害時に誘導される formononetin の誘導には他の因子が関与する可能性が示唆された．また，構造類縁体 FACs にエリシター活性が認められなかった結果から，ダイズがエリシターのアミノ酸部分を厳密に認識していることが示唆された．



R_1=OH, R_2=OH : Daidzein
R_1=OH, R_2=OCH_3 : Formononetin
R_1=O-Glc, R_2=OH : Daidzin
R_1=O-Glc, R_2=OCH_3 : Ononin
R_1=O-Malonyl Glc, R_2=OH : Malonyldaidzin
R_1=O-Malonyl Glc, R_2=OCH_3 : Malonylononin

Fig. 1 誘導された isoflavone の構造

biological interaction, insect-derived elicitor, defense mechanism of the plant

講演番号：2E11a14
講演日時、会場：3 月 27 日 11:43～ E 校舎 11 会場

ハイグロマイシン B 処理によるルシラクタエン生産糸状菌 Fusarium sp.RK97-94 における二次代謝生産誘導

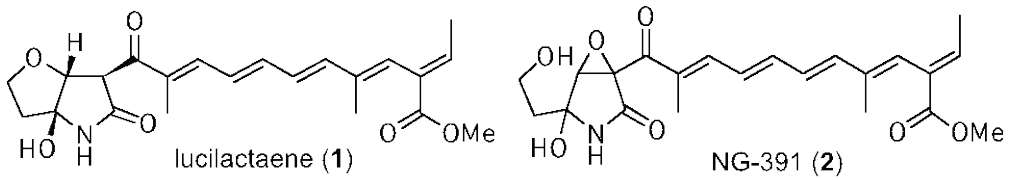
Induction of secondary metabolite production in the lucilactaene producing fungus Fusarium sp. RK97-94 treated with hygromycin B

○加藤 翔[1,2]、本山 高幸[1]、鎌倉 高志[2]、長田 裕之[1] ([1]理研 抗生物質、[2]東理大)

○Sho KATO[1,2], Takayuki Motoyama[1], Takashi Kamakura[2], Hiroyuki Osada[1] ([1]RIKEN, [2]Tokyo Univ. Sci)

【目的】ルシラクタエン(**1**)は糸状菌 *Fusarium* sp. RK97-94 が生産する低分子化合物であり、がん抑制遺伝子 p53 不活化細胞で細胞周期阻害活性を示す。そのため、抗がん剤のリード化合物として注目され、生合成経路の解明が必要とされている。ルシラクタエン(**1**)生産菌は同時に環状エーテルが開環している類縁体 NG-391(**2**)を主要代謝物として生産する。8 遺伝子からなる生合成遺伝子クラスターによりルシラクタエンは生合成される。我々はルシラクタエン生合成遺伝子の破壊体取得にハイグロマイシン B 耐性遺伝子マーカーを用いているが、形質転換体の一部においてハイグロマイシン B 存在下で菌体の黒色化が観察された。ハイグロマイシン B 処理による菌体の黒色化は野生型株においても起こった。黒色化はメラニン生合成阻害剤カルプロパミドで抑制されることから、メラニン生産が誘導されていることが示唆された。今回、ハイグロマイシン B の二次代謝産物生産への影響を解析した。

【方法と結果】野生型株にハイグロマイシン B を処理した培養液を抽出し、UPLC/MS を用いて分析したところ、ルシラクタエンの生産性が 5 倍程度上昇していることが明らかになった。同時に、野生型株には見られない代謝物のピークを多数確認できたことから二次代謝誘導が起きている可能性が示唆された。ルシラクタエン生合成は糸状菌における二次代謝グローバルレギュレーターLaeA のオルソログ Lae1 により制御されていることを見出しているが、野生型株と同様に *lae1* 破壊株へハイグロマイシン B を処理しても生産誘導は認められず、*lae1* 大量発現株にハイグロマイシン B を処理するとルシラクタエン(1)と NG-391(2)の生産性の向上が確認された。このことから、ハイグロマイシン B の作用点は Lae1 の上流に存在していることが示唆された。また、ルシラクタエン生合成遺伝子クラスター中の制御因子候補の遺伝子破壊株においてもハイグロマイシン B 処理の効果が認められた。今回の結果より、ルシラクタエン生産の制御モデルを推定した。



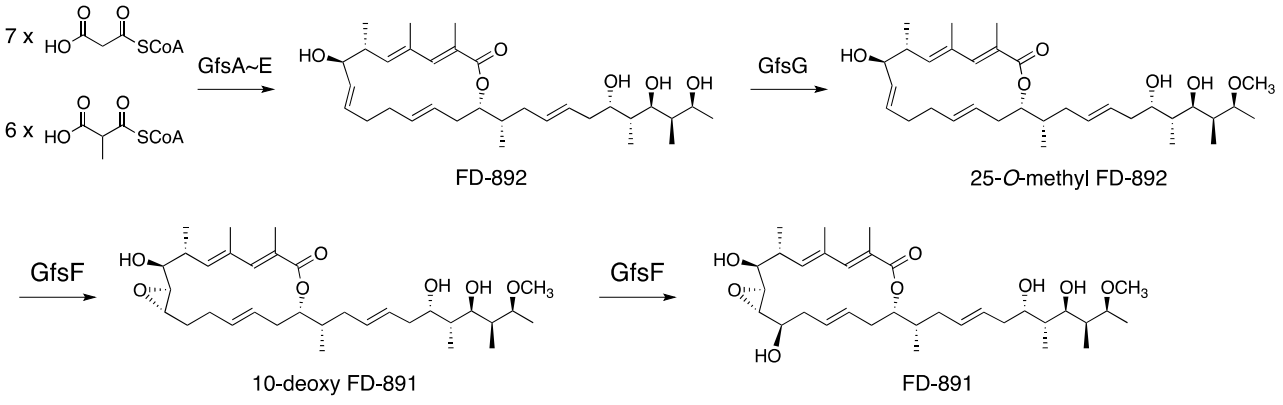
secondary metabolism, fungi, regulation

講演番号：2E11p02
講演日時、会場：3 月 27 日 14:11～ E 校舎 11 会場

FD-891 生合成に関わるシトクロム P450 酸化酵素 GfsF の結晶構造解析
Crystal structure of cytochrome P450 monooxygenase GfsF involved in FD-891 biosynthesis

○宮永 顕正、古谷 隆、工藤 史貴、江口 正（東工大院理工）
○Akimasa MIYANAGA, Takashi FURUYA, Fumitaka KUDO, Tadashi EGUCHI (Tokyo Tech.)

[目的] 放線菌 *Streptomyces graminofaciens* A-8890 株が生産する 16 員環マクロライド抗生物質 FD-891 はヒト白血病細胞に対して顕著な細胞毒性を示す。FD-891 の生合成経路を明らかにした結果、生合成最終段階において、シトクロム P450 酸化酵素である GfsF が、ポリケチド骨格の C8,9 位のエポキシ化を行った後に、C10 位を水酸化するという二段階の酸化反応を触媒することが明らかとなった。このような順序で段階的酸化反応を触媒する P450 は GfsF が初めての例である。エポキシ化と水酸化の順序は厳密に制御されていると考えられ、その基質認識機構について興味が持たれた。そこで、本研究では、GfsF のユニークな段階的反応の基質認識機構を解明することを目的として、GfsF の結晶構造解析を行った。
[方法と結果] まず、GfsF の組み換えタンパク質を大腸菌にて発現させ、精製した。この GfsF 組み換えタンパク質が活性を有しているかを確認するため、*in vitro* 反応を行ったところ、25-*O*-methyl-FD-892 を基質として用いた時に反応の進行を確認することができた。次に、GfsF の結晶化を行った。種々検討の結果、N 末端側の 15 残基を含まない GfsF (GfsFΔN15) を発現させ、結晶化に用いたところ、良質な結晶を得ることに成功した。X 線回折データを収集し、分子置換法による位相決定を行い、分解能 1.95 Å にて立体構造を決定した。構造解析の結果、GfsFΔN15 は疎水的な基質結合ポケットを持っていることが明らかになった。現在、反応順序の制御に関係するアミノ酸残基を探るべく、基質結合ポケットのアミノ酸残基の部位特異的変異実験を進めており、その結果も併せて報告する予定である。



polyketide, cytochrome P450, crystal structure

講演番号：2E11p03
講演日時、会場：3 月 27 日 14:22～ E 校舎 11 会場

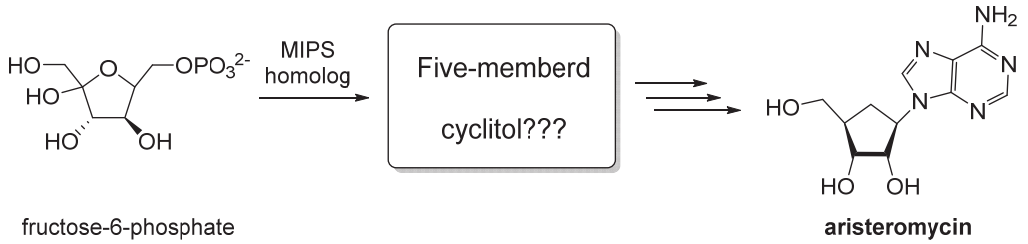
ヌクレオシド系抗生物質アリステロマイシン生合成に関わる Orf2 の機能解析
Characterization of ORF2 enzyme involved in aristeromycin biosynthesis
○角田 毅、高島 惇、宮永 顕正、工藤 史貴、江口 正 (東工大院理工)
○Takeshi TSUNODA, Makoto TAKASHIMA, Akimasa MIYANAGA, Fumitaka KUDO, Tadashi EGUCHI (Tokyo Tech.)

【目的】
アリステロマイシンは、放線菌 *Streptomyces citricolor* IFO 13005 培養液から 1968 年に単離されたヌクレオシド系抗生物質である。アデノシンの D-リボース環内の酸素原子が炭素原子に置換された特徴的な化学構造を有し、S-アデノシル-L-ホモシステイン加水分解酵素を阻害すること、いくつかの菌に対し抗菌活性を有することが知られている。アリステロマイシンの炭素五員環部位の構築機構は古くから興味が持たれ、取り込み実験などの生合成研究が行われてきた。

当研究室では、アリステロマイシン生産菌 *S. citricolor* のゲノム DNA 配列中から推定生合成遺伝子クラスターを見いだし、異種発現によりアリステロマイシンの異種菌生産に成功している。本研究では、アリステロマイシン生合成遺伝子クラスター中にコードされる *myo*-イノシトール-1-リン酸合成酵素（MIPS）のホモログ酵素である Orf2 の *in vitro* での機能解明を目指した。MIPS はグルコース 6-リン酸（G6P）を基質として NAD^+を酸化剤として用いて MIP 形成を触媒する。従って、Orf2 がアリステロマイシン生合成において炭素五員環形成に関与すると推定した。

【方法、結果】
Orf2 は通常の方法により、大腸菌にて発現、精製して酵素反応を検討した。サイクリトールリン酸と考えられる Orf2 酵素反応生成物は特徴的な UV 吸収がないため、^{31}P-NMR を用いて反応の進行を追跡することにした。その結果、NAD^+を補酵素、フルクトース 6-リン酸（F6P）を基質として反応させたときに、基質とは異なる生成物由来と考えられる新たなシグナルが検出された。G6P を基質として用いたときは、反応の進行が観測されなかったことから Orf2 の基質は F6P であることがわかった。また、細胞破砕時に NAD^+を添加することで生成物と見られるピークの増大が観測された。

現在、この知見を活かし、酵素反応生成物の構造決定をするために、大スケールで酵素反応を行い単離、精製を進めている。



fructose-6-phosphate　　**aristeromycin**

aristeromycin, biosynthesis, cyclitol

講演番号：2E11p04
講演日時、会場：3 月 27 日 14:33～ E 校舎 11 会場

配糖体エンジニアリングを見据えた柑橘由来α-ラムノース転移酵素の特性解析

Characterization of Citrus α-rhamnosyltransferase toward glycoside engineering

○大橋 貴生、長谷川 友香、三崎 亮、藤山 和仁 (大阪大学)
○Takao OHASHI, Yuka HASEGAWA, Ryo MISAKI, Kazuhito FUJIYAMA (Osaka Univ.)

柑橘類に含まれるヘスペリジンや大豆に含まれるダイズイソフラボンといった配糖体には冷え症改善や生活習慣病予防など様々な健康機能があることが知られている。配糖体はフラボノイドなどの低分子化合物に糖鎖が結合した構造を有し、その糖鎖構造が機能に非常に重要な役割を果たしていることが知られている。柑橘類において、苦味はナリンギンなどのフラバノン配糖体の糖鎖構造によって決定される。例えば、フラバノン配糖体は糖鎖内のラムノース残基がα1,6-結合の場合は苦味を呈さないが、α1,2-結合の場合は苦味を呈することが知られている。そのため糖鎖構造を改変することで、新機能を有する配糖体を創成できると期待される。

配糖体エンジニアリングを行う手段として糖転移酵素を用いて行う場合、その糖転移酵素の持つ機能や特性を知る必要がある。糖転移酵素は糖の供与体として UDP 糖を利用するが、UDP-ラムノースなどの一部の UDP 糖が入手困難であるため、それらの UDP 糖を基質とするラムノース転移酵素などは詳細な機能解析が行われていない例も多い。一方、我々のグループでは以前分裂酵母を利用した種々の UDP 糖生産に成功しており、市販品の入手が困難な UDP-ラムノースや UDP-キシロースを用いた糖転移酵素 *in vitro* 機能解析が可能である。そこで、本研究では配糖体エンジニアリングに向けたα-ラムノース転移酵素の特性解析を目的とした。

今回は、フラバノン配糖体であるナリンギンおよびナリルチン合成に関わるラムノース転移酵素の機能解析を行った。まず、既知遺伝子であるブンタン由来α1,2-ラムノース転移酵素遺伝子（Cm12RhaT）およびオレンジ由来α1,6-ラムノース転移酵素遺伝子（Cs16RhaT）の単離を行った。さらに、縮重プライマーを用いた PCR 法により、ブンタンから新たにα1,6-ラムノース転移酵素候補遺伝子（Cm16RhaT）を取得した。次に各遺伝子を分裂酵母で発現させ、粗酵素を抽出後、ウエスタンブロッティング法によりα-ラムノース転移酵素タンパク質の発現を確認した。次に UDP–ラムノースおよびナリンゲニン-7-グルコシドを基質として用いた酵素反応を行い、酵素生成物の HPLC および ESI-MS 分析を行った。その結果、３つのα-ラムノース転移酵素について *in vitro* での活性を初めて検出することに成功した。各種 UDP 糖や受容体基質についても特異性を調べたところ、Cs16RhaT、Cm16RhaT はケルセチン-3-グルコシドに対してもラムノース転移活性が認められた。

今後はドメインスワッピングなどを用いてこれらの糖転移酵素の基質特異性を変えることにより自然界に存在しない糖鎖構造を有する配糖体の創成が可能となる。

flavanone-glycoside, rhamnosyltransferase, *Shizosaccharomyces pombe*

講演番号：2E11p05
講演日時、会場：3 月 27 日 14:44～ E 校舎 11 会場

Candida versatilis SN-18 株由来マンニトールデヒドロゲナーゼの機能解析
Characterization of Mannitol Dehydrognase in *Candida versatilis* SN-18
○石牧 優規、水島 大貴、加藤 順、荻原 淳、春見 隆文（日大 生資利用）
○Yuki ISHIMAKI, Daiki MIZUSHIMA, Jun KATO, Jun Ogihara, Takafumi KASUMI (Sci., Nihon Univ.)

[目的] 食品、医薬品、化粧品や化成品の原料など様々な用途が存在するグリセロールは、油脂工業の副産物や化学合成により製造されている。近年、機能性素材や食品などの分野においては、より高い純度や安全性などの観点から浸透圧耐性微生物を用いた発酵生産が注目されている。

演者らが対象とする *Candida verasatilis* SN-18 株は高糖濃度条件下、特に 20%グルコース・1%酵母エキス培地(20% GY 培地)で著量のグリセロールを生成する浸透圧耐性酵母の一種である。しかし本菌のグリセロール変換効率は、消費グルコース当たり 25%（培養 10 目）であり、実用レベルからは低い。本菌はグリセロールの他にマンニトールを副生することから、グリセロール変換率向上を目指す上でマンニトールの生成を抑制することが必要と考えられた。そこで、本菌のマンニトール生成メカニズム並びにその機能に関する知見を得ることを目的とした。

真菌において、これまでにマンニトールの生成には 2 つの系路が知られているが、ここでは解糖系の代謝中間体であるフルクトース-6-リン酸が脱リン酸化されて生じたフルクトースを、マンニトールに変換する酵素であるマンニトールデヒドロゲナーゼ（MDH）に着目し、その酵素活性の動態について検討を行った。

[方法] *C. versatilis* SN-18 株を 500 mL 容三角フラスコで、100 mL の 2%GY 培地 3 日間、30℃、200 rpm で振盪培養を行い、乳鉢と乳棒で破砕して粗タンパク抽出液を得た。得られた粗タンパクを 4 μg 相当分取し、10 mM フルクトースと 1 mM NADPH を添加し、340 nm の吸収度の変化から酵素活性を測定した。また、本菌を上記と同条件で 10 日間培養を行い、1 日おきに菌体を回収して菌体内マンニトール含量及び MDH 活性を測定した。さらに、菌体内マンニトール含量が培養液中の金属塩の影響を受けることから、フレンチプレスを用いて抽出した粗タンパク抽出液を硫酸アンモニウム沈殿法で分画し、$CaCl_2$、$CoCl_2$、$CuCl_2$、$MgCl_2$、$MnCl_2$、$NiCl_2$、$ZnCl_2$ をそれぞれ 1 mM ずつ反応液に添加して MDH 活性への影響を検討した。

[結果] 本菌の粗タンパク液は上記反応液中で明らかな MDH 活性を示した。また、培養 0 日目(2% GY 培地での前培養終了時)では菌体内のマンニトール蓄積、MDH 共にほとんどみられなかったが、菌体内のマンニトール含量が上昇する 2 日目に MDH 活性も上昇し、0 日目と比較して約 7 倍の 335 U/mg protein となった。さらに 6 日目以降はマンニトール含量の低下に伴い MDH 活性も低下した。菌体内のマンニトール含量と MDH 活性の推移が相関していることから、本菌の MDH がマンニトール生成に関与していることが示唆された。一方、培養液に $CoCl_2$ 又は $NiCl_2$ を 50 mg/L 添加するとマンニトールの蓄積は起こらなかったが、MDH 活性は $CoCl_2$ 、$NiCl_2$ 共にコントロールの 84%程度を示したため、培養液添加時の金属塩によるマンニトールの生成阻害は別の要因によって起こると推測された。

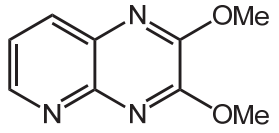
Mannitol, Candida, Mannitol Dehydrognase

講演番号：2E11p06
講演日時、会場：3 月 27 日 15:05～ E 校舎 11 会場

フェロモン活性を有するトゲナシシロトビムシ由来ピリドピラジンの生合成前駆体
Biosynthetic precursor of the pheromone pyridopyrazine in the family Onychiuridae, *Onychiurus folsomi*

○清水 伸泰、糸井 瑞希、荻野 佳稀（京都学園大バイオ環境）
○Nobuhiro SHIMIZU, Mizuki ITOI, Yoshiki OGINO (Kyoto Gakuen Univ.)

【背景と目的】
トビムシ類は土壌に生息する節足動物の中では，ササラダニ類に匹敵するほど個体数の多い生物種である．シロトビムシ科トビムシには眼がなく，各体節に多数の擬小眼と呼ばれる独特な分泌腺をもつ．本科トゲナシシロトビムシ *Onychiurus folsomi* の擬小眼から放出される分泌物として，アルカロイドのピリドピラジン **1** を同定した [1)]．本化合物 **1** は成虫と幼虫の共通成分であり，濃度の違いにより警報フェロモン活性あるいは集合フェロモン活性を示す [2)]．化合物 **1** はピリジン環とピラジン環が縮合した構造をもち，これまでトビムシ以外での報告例はない．本研究では，化合物 **1** の生合成前駆体を特定することを目的として，安定同位体標識アミノ酸の取り込み実験を行った．



化合物 **1**

【方法と結果】
化合物 **1** のピリジン環部分の前駆体は，植物のニコチン酸生合成の報告例からトリプトファンとアスパラギン酸が挙げられる．それらに加えピペリジン環を形成することが知られるリジンを含むアミノ酸 3 種をピリジン環の前駆体候補と推定し，取り込み実験を行った．飼育用の飼料（乾燥酵母にクロレラを混ぜたもの）に重水素あるいは ^{13}C で同位体標識されたアミノ酸をそれぞれ 20%混合したものを実験用飼料とし，特定のトビムシ飼育容器に 1 ヶ月間，2 日間隔で適量加え続けた．化合物 **1** へのアミノ酸の取り込みの有無は，ガスクロマトグラフ質量分析計（GC-MS）を使用して得られたマススペクトルから判断した．コントロール（通常の飼育飼料）の M^++1 イオン（192）とベースイオン（191）の比と，同位体標識アミノ酸を与えたものの比とを比較した．その結果，トリプトファンが化合物 **1** に取り込まれていることが判明した．同様の方法でピラジン環部分の前駆体となるアミノ酸も検討した．候補アミノ酸としてグリシンとバリンを用いて実験を行った結果，バリンが化合物 **1** に取り込まれた．よって化合物 **1** はトリプトファンとバリンから生合成されると結論できたので，それらのアミノ酸から化合物 **1** への生成機構について考察した．

1）和田ら，2012，日本農芸化学会 関西支部大会，B05
2）清水ら，2014，日本土壌動物学会 第 37 回大会，O7

pyridopyrazine, *Onychiurus folsomi*, amino acid

講演番号：2E11p07
講演日時、会場：3 月 27 日 15:16～ E 校舎 11 会場

クサギカメムシにおけるトリデカン生合成経路とそれに関わる酵素

Biosynthesis of tridecane in the brown marmorated stink bug, *Halyomorpha halys*

○藤盛 春奈、田母神 繁、阿部 誠、野下 浩二（秋田県大・生資科）
○Haruna FUJIMORI, Shigeru TAMOGAMI, Makoto ABE, Koji NOGE (Akita Pref. Univ.)

【背景と目的】カメムシ類やダニ類を含む節足動物には，石油の一成分として知られるトリデカンを作る種が存在する．特にカメムシ科クサギカメムシ *Halyomorpha halys* はトリデカンを主要な成分として分泌腺に蓄える．カメムシ類におけるトリデカン生合成の詳細はわかっていないが，これを解明することで石油燃料の生物的合成への応用を期待できる．そこで，クサギカメムシ（以下カメムシ）におけるトリデカン生合成経路の特定とそれに関わる酵素の同定を計画した．カメムシにおいてトリデカンは，グルコース分解で生じたアセチル CoA からミリスチン酸が合成された後，ミリスチルアルデヒドへの還元と脱カルボニル化を経て合成されると予想した．この予想経路を，1)飽和脂肪酸であるミリスチン酸の生合成と 2)そのトリデカンへの変換の 2 段階ととらえ，前者については分泌腺の脂肪酸組成を調べることで，一方，後者については分泌腺内におけるミリスチン酸変換酵素の探索から検討した．

【方法と結果】カメムシ分泌腺にはトリデカン生合成の原料となるミリスチン酸が顕著に含まれると予想し，分泌腺の脂肪酸組成を常法に従い調べた．比較のため，腸管，主要なエサであるピーナッツも同様に調べた．その結果，ミリスチン酸はいずれのサンプルにおいても全脂肪酸の 1%未満と少なく，分泌腺に顕著に存在するわけではなかった．

また，トリデカン生合成経路の特定ため，^{13}C で標識されたグルコース水溶液のみで若虫を約 1 か月飼育し，トリデカンへの取り込みを検討した．^{13}C を与えたカメムシ分泌腺の抽出液を GC/MS 分析すると，天然のトリデカンで見られる *m/z*=122, 184 のピークに対して，1 マスもしくは 4 マス増えた *m/z*=123, 188 のピークが大きく見られた．これより ^{13}C のトリデカンへの取り込み，すなわちカメムシ体内でグルコースを原料にトリデカンが生合成されることが示唆された．また，カメムシ成虫の分泌腺の抽出液を用いて，ミリスチン酸もしくはミリスチルアルデヒドを代謝できる酵素を探索したところ，NAD^+ もしくは $NADP^+$ 存在下でミリスチルアルデヒドをミリスチン酸へ酸化するアルデヒドデヒドロゲナーゼ（ALDH）を 1 種見出した．一般に ALDH は可逆反応を触媒することが知られており、このことから，今回見出したカメムシ ALDH がトリデカン生合成においてミリスチン酸からミリスチルアルデヒドへの還元に関与していると考えられる．

tridecane, aldehyde dehydrogenase, miristic acid

講演番号：2E11p08
講演日時、会場：3 月 27 日 15:27～ E 校舎 11 会場

Pseudomonas spp.によるクマリンの分解代謝－メリロト酸からの代謝追跡
Coumarin degradation metabolism via Melilotic acid by *Pseudomonas* spp.
○田村 駿、島崎 真実、今井 政裕、小野田 光希、岡田 貴博、清水 文一（東洋大生命）
○Shun TAMURA, Mami SHIMAZAKI, Masahiro IMAI, Kouki ONODA, Takahiro OKADA, Bun-ichi SHIMIZU (Toyo Univ.)

【目的】
サクラの葉には芳香性を示す物質クマリンの前駆体が蓄積する。クマリンは抗菌・抗酸化活性を示し、植物の防御物質の一種であると考えられている。
サクラの葉は秋から冬にかけて落葉し、葉に含まれるクマリンがサクラ根圏環境に供給されるが、土壌中においてクマリンの蓄積は見られない。よって、サクラ根圏中にはクマリンを分解する何らかの機能が存在していると考えられるが、根圏におけるクマリンの動態については不明である。
これまでに、我々のグループはサクラ根圏よりクマリン分解能を示す微生物として *Pseudomonas* spp.および *Klebsiella* spp.を単離した。サクラの葉を食害するアメリカシロヒトリ（*Hyphantria cunea*）幼虫のフンより単離した *P. taiwanensis* STDX-1 はクマリンを分解代謝し、時間の経過とともに添加したクマリンの含有量が減少する一方で、培養前には見られなかった melilotic acid (3-(2'-hydroxyphenyl)propionic acid) および 3-(2',3'-dihydroxyphenyl)propanoic acid を生じることを、昨年までの日本農芸化学会大会で報告した。
本研究では、本菌における 3-(2',3'-dihydroxyphenyl)propanoic acid からの代謝をさらに解析したので報告する。また、数種の *Pseudomonas* spp.と *Klebsiella* spp.における、クマリン代謝もあわせて報告する。

【結果】
P. taiwanensis STDX-1 による代謝を逆相 HPLC にて追跡したところ、3-(2',3'-dihydroxyphenyl)propanoic acid の次段階の代謝物と考えられるピークを確認した。この代謝物を LC/Q-TOFMS を用いて質量分析したところ m/z = 213.1438 $[M-H]^-$を示し、その組成式は $C_9H_{10}O_6$ と決定した。これは、3-(2',3'-dihydroxyphenyl)propanoic acid のベンゼン環が開環したものと予想された。そこで、本代謝物を逆相 HPLC にて単離・精製を行い ^1H、^{13}C-NMR を用いて代謝物の構造決定を行った。
また、本菌以外の *Pseudomonas* spp.および *Klebsiella* spp.のクマリンの代謝を逆相 HPLC を用いて追跡を行い、微生物種によって代謝速度に違いを見出した。

Melilotic acid, *Pseudomonas* spp., Metabolism

講演番号：2E11p09
講演日時、会場：3 月 27 日 15:38～ E 校舎 11 会場

カイガラムシ色素の生合成遺伝子に関する研究

Studies on the biosynthetic genes responsible for mealybug pigments

○豊田 将大[1]、山城 敬範[1]、菊池 直也[1]、片山 琢也[2]、堀内 裕之[2]、鈴木 道生[1]、長澤 寛道[1]、作田 庄平[1] ([1]東大院農生科・応生化、[2]東大院農生科・応生工)
○ Masahiro TOYOTA[1], Takanori YAMASHIRO[1], Naoya KIKUCHI[1], Takuya KATAYAMA[2], Hiroyuki HORIUCHI[2], Michio SUZUKI[1], Hiromichi NAGASAWA[1], Shohei SAKUDA[1] ([1]Graduate School of Agricultural and Life Sciences, Univ. Tokyo, [2]Dept. of Biotechnol., Univ. of Tokyo)

【背景・目的】

カイガラムシは、体内に鮮やかな赤色の色素を蓄積することから、資源生物としての役割を持っている。カイガラムシ色素を大量生産する方法として生合成遺伝子を利用することが考えられるが、生合成遺伝子は明らかになっていない。これまでに、当研究室では、フジコナカイガラムシ（*Planococcus kraunhiae*）色素の生合成研究を行い、endocrocin が主成分であることを明らかにし、また、EST データベースを作成し、各々の断片配列の BLAST 検索の結果の中で相同性の最も高い遺伝子名に対して fatty acid、および polyketide のキーワード検索を行い、3 種の候補生合成遺伝子を選出した。さらに、RNAi 法を用いたノックダウン実験を行い、虫体の湿重量の増加に対する endocrocin の増加量の割合を求めると、候補生合成遺伝子 *pks01* のノックダウン効果により endocrocin の産生量が有意に減少することが確かめられている。本研究では、糸状菌を宿主として候補遺伝子 *pks01* を発現し、色素生合成遺伝子であることを最終的に証明することを目的とする。

【方法・結果】

pks01 が色素生合成遺伝子であることを証明するために、糸状菌 *Aspergillus nidulans* を用いて形質転換実験を行うことにした。まずフジコナカイガラムシの虫体から候補遺伝子のクローニングを行い、糸状菌のベクターに導入し、相同組み換えを行うことで形質転換株を作成した。遺伝子プロモーターには、炭素源をグルコースからスレオニンに切り替えることで誘導をかけることのできる alcA プロモーター、およびチアミンを培地に添加していなければ常時発現する thiF プロモーターを検討した。形質転換株で組み換え遺伝子が発現していることを、actin 遺伝子との発現量を比較して確認した。現在、候補遺伝子 *pks01* を形質転換した株を用い、種々の条件で培養を行い、得られた培養液の抽出物を LC-MS および HPLC を用いて分析し、野生株と形質転換株での代謝産物の違いを調べている。

mealybug, pigment, biosynthesis

講演番号：2E11p10
講演日時、会場：3 月 27 日 15:49～ E 校舎 11 会場

Comparative analysis of oligonucleotide primers for high-throughput screening of NRPS genes in actinomycetes

○Dana Ulanova[1], Tomas Bakal[2], Kian-Sim Goo[1], Lucie Najmanova[2] ([1]Kochi Univ., [2]Institute of Microbiology, AS CR)

Actinomycetes, especially members of a genus *Streptomyces*, are producers of more than 70% of clinically used natural bioactive compounds. Studies of actinomycete genomes revealed a great number of gene clusters, making genome mining approach a promising way to discover novel compounds. One of the major natural product groups, nonribosomal peptides, is produced by modular nonribosomal synthetases (NRPS), adenylation domains (AD) of which are responsible for substrate selection and activation. The majority of recent AD screening studies used a pair of degenerate primers A3F/A7R designed based AD conserved regions A3 and A7 from six actinomycete NRPS clusters[1]. However, the increasing number of sequenced NRPS biosynthetic gene clusters shows the nucleotide sequence variations in these conserved regions, which could significantly affect the primer-binding specificity and lead to overlook of less conserved sequences.

In this study we report the design of an oligonucleotide primer set, which enables to extend the coverage of AD sequence abundance of analyzed sample in addition to the widely used A3F/A7R primers. A pair of new degenerate primers was designed using the alignment of 28 amino acid sequences representing actinomycetal ADs from 20 biosynthetic clusters with a special focus on stand-alone ADs. Newly designed primers, as well as known A3F/A7R pair, were used for identification of AD sequences in chromosomal DNA of 20 environmental actinomycete strains isolated from soil and marine sediments by 454 pyrosequencing. Annotation and statistical analysis of obtained sequences revealed the total number and diversity of identified ADs were noticeably extended using newly designed primers.

References:

1. Ayuso-Sacido A, Genilloud O (2005) New PCR primers for the screening of NRPS and PKS-I systems in actinomycetes: Detection and distribution of these biosynthetic gene sequences in major taxonomic groups. Microbial Ecology 49: 10-24.

adenylation domain, degenerate primers, pyrosequencing

講演番号：2E11p11
講演日時、会場：3 月 27 日 16:10～ E 校舎 11 会場

メタン生成アーキア由来のシス型プレニルトランスフェラーゼホモログに触媒される head-to-tail 型および non-head-to-tail 型縮合

Head-to-tail and non-head-to-tail condensation catalyzed by a *cis*-prenyltransferase homologue from a methanogenic archaeon

○小川 拓哉、吉村 徹、邊見 久 (名大院生命農)
○Takuya OGAWA, Tohru YOSHIMURA, Hisashi HEMMI (Nagoya Univ.)

【背景】*Methanosarcina* 属のメタン生成アーキアやその近縁種は 2,6,10,15,19-ペンタメチルイコサン (PMI) を特異的に生産する。PMI は C_{10} ユニットと C_{15} ユニットが tail-to-tail 型で連結した非対称形のセスタテルペンである。地球化学の分野において、PMI は地質試料中のメタン生成アーキアの存在を示すバイオマーカーとして扱われている。しかしながら、その生合成に関する遺伝子レベルの知見はない。我々は、ホモロジー検索の結果、*Methanosarcina* 属アーキアがシス型プレニルトランスフェラーゼ (cPT) のホモログの遺伝子を複数有し、そのうちの 1 つがアーキアの中でも同属にのみ保存されていることを見出した。cPT はアリル性二リン酸基質とイソペンテニル二リン酸 (IPP) を head-to-tail の様式で連続的に縮合してポリプレニル鎖を合成するが、一部の cPT ホモログはアリル性二リン酸どうしの non-head-to-tail 型の縮合を触媒し、不規則な骨格のイソプレノイド鎖を合成することが知られている。このことから、*Methanosarcina* 属特異的な cPT ホモログが PMI 生合成に関わる可能性を考え、組換え酵素を用いた *in vitro* アッセイにより機能解析を行った。
【結果】cPT ホモログを大腸菌中で異種発現させ、Ni^{2+}-NTA クロマトグラフィを用いて精製した。この精製酵素は IPP とファルネシル二リン酸 (FPP) を基質とした場合、典型的な head-to-tail 型の連続的縮合反応を触媒して *Z,Z,Z,E,E*-ヘキサプレニル二リン酸を主生成物として与えた。さらに、IPP の代わりにジメチルアリル二リン酸 (DMAPP) もしくはゲラニル二リン酸を用いたところ、同酵素は DMAPP 存在下でのみ FPP から未知生成物を生じた。質量分析の結果から、この未知生成物は化学式 $C_{20}H_{36}O_7P_2$ から成ることが示された。また、同生成物の二リン酸基は酸に対して不安定だったため、アリル性二リン酸構造をもつことが示唆された。以上のことから、本 cPT ホモログは non-head-to-tail 型の縮合を触媒し、DMAPP の 2 位にファルネシル基が付加した化合物を生成することが推定された。このような構造をもつ化合物はこれまでに自然界から見つかっておらず、PMI とは異なる未同定のイソプレノイドの代謝への関与が考えられる。現在、生成物のより詳細な構造解析および本酵素の速度論解析を行っており、これらの結果についても併せて報告したい。

prenyltransferase, archaea, isoprenoid

講演番号：2E11p12
講演日時、会場：3 月 27 日 16:21～ E 校舎 11 会場

大腸菌におけるアーキア膜脂質の生合成強化
A trial for elevated production of archaeal membrane lipid in *Escherichia coli*
○森 健、磯部 圭祐、吉村 徹、邊見 久 (名大院生命農)
○Takeshi MORI, Keisuke ISOBE, Tohru YOSHIMURA, Hisashi HEMMI (Nagoya Univ.)

【背景】アーキアの膜脂質はそのグリセロール部分にイソプレノイドアルコールがエーテル結合した構造をもっており、これは脂肪酸がグリセロール部分にエステル結合している他の生物の膜脂質の構造とは大きく異なっている。このイソプレノイド鎖は一般的には完全還元されたフィタニル基であり、さらにアーキア種によっては水酸基が付加したものや、フィタニル基が 2 分子 head-to-head 型で縮合したビフィタニル基など様々な構造をもつことが知られている。当研究室では Methanosarcina acetivorans に由来する複数のアーキア膜脂質生合成酵素をクローニングし、大腸菌に導入することで、大腸菌内に完全還元型のアーキア膜脂質の生合成経路を再構成することに成功している。本研究ではアーキア膜脂質生合成による大腸菌への影響を明確にするため、その生産増強を試みた。
【結果】本来大腸菌はイソプレノイド化合物の前駆体であるイソペンテニル二リン酸の生合成経路として、メチルエリスリトールリン酸経路のみを有している。我々はアーキア膜脂質生産大腸菌株に酵母由来の別のイソペンテニル二リン酸合成経路であるメバロン酸経路の全酵素遺伝子がクローニングされたプラスミド pJBEI-2999 [Peralta-Yahya et al, Nature Commun., 2011]を導入した。この形質転換体をメバロン酸経路の中間体であるメバロノラクトンを加えた LB 培地で培養し、集菌した大腸菌から脂質を抽出した。この脂質を HPLC により分析したところ、アーキア膜脂質の生産量の大幅な増加が確認された。さらに、同大腸菌株の生体膜においてアーキア膜脂質が占める割合を確認するために二次元薄層クロマトグラフィーを行った。その結果、大腸菌体中のリン脂質に占めるアーキア膜脂質の割合は大腸菌の脂質と同程度であることが確認された。増殖曲線を測定したところ、ネガティブコントロールとして用いたアーキア膜脂質非生産株は 70 時間ほどで死滅期に入り OD600 値が減少し始めたが、アーキア膜脂質生産株の OD600 値は増加し続けた。加えて位相差顕微鏡による形態観察も行った。その他、バクテリア型とアーキア型の膜脂質からなるキメラ生体膜を有する同大腸菌株において観察された表現型について報告する。

Archaea, isoprenoid, membrane lipid

講演番号：2E11p13
講演日時、会場：3 月 27 日 16:32～ E 校舎 11 会場

麹菌アシル CoA 合成酵素欠失株による遊離脂肪酸の高生産
Increased Production of Free Fatty Acid by the Acyl-CoA Synthetase Disruptant of *Aspergillus oryzae*

○玉野 孝一[1]、ブルーノ ケネス[2]、小池 英明[1]、石井 智子[1]、三浦 愛[1]、山根 倫子[1]、梅村 舞子[1]、ベーカー スコット[2]、町田 雅之[1] ([1]産総研生物プロセス、[2]パシフィックノースウエスト国立研)
○Koichi TAMANO[1], Kenneth BRUNO[2], Hideaki KOIKE[1], Tomoko ISHII[1], Ai MIURA[1], Noriko YAMANE[1], Maiko UMEMURA[1], Scott BAKER[2], Masayuki MACHIDA[1] ([1]AIST, BPRI, [2]PNNL)

化石燃料の世界的な需要の増加に伴い、バイオマスなどの植物成分から環境への負荷の少ないバイオ燃料を生産する技術が求められている。そこで、麹菌 *Aspergillus oryzae* 等の糸状菌は物質分解と合成の能力に優れていることから、この能力を活かして、更に代謝工学的な遺伝子改変を駆使することにより、バイオ燃料やその原料を高生産する技術開発を進めてきた。麹菌の作る脂肪酸や脂肪（トリグリセリド）はバイオディーゼルの原料として利用が可能なことから、これらの高生産化をこれまでに中心的に試みてきた。

脂肪酸代謝には多数の酵素が関与するが、そのうちのアシル CoA 合成酵素は、遊離脂肪酸をアシル CoA に変換する反応を触媒する。その役割は、脂肪酸やトリグリセリドの合成と分解の両方に関与する。本研究では当酵素遺伝子に注目し、それを遺伝子組換えにより欠失させることで脂肪酸の生産性向上を試みた。

まず麹菌の当酵素遺伝子の探索を行った。酵母 *S. cerevisiae* や *A. nidulans* 等他の真菌で同定されている当酵素に対して麹菌ゲノムの全翻訳産物を相同性検索した結果、当酵素に特徴的なドメインの配列を明確にもつ遺伝子が 6 個確認された。次にこれらの各欠失破壊株を作製し、菌体内脂肪酸量等を調べた。その結果、当ホモログの内の 1 個の欠失株で、菌体内脂肪酸量が大きく向上した。一方、他の 5 個は欠失しても、菌体内脂肪酸量が向上しなかった。また、菌体内トリグリセリド量に関しては、いずれの欠失株でも野生株と同一であった。現在、脂肪酸生産量が向上した当欠失株のゲノム発現情報を解析し、脂肪酸合成の律速となっている代謝反応を予測して、それを組換えにより強化することで、更なる向上を目指している。

Acyl-CoA synthetase, Free fatty acid, *Aspergillus oryzae*

講演番号：2E11p14
講演日時、会場：3 月 27 日 16:43～ E 校舎 11 会場

バラ香気成分 2-Phenylethanol の高温期特異的な生成に関する転写解析
Transcripts analysis for specific production of 2-Phenylethanol during high-temperature season
○平田 拓[1]、大西 利幸[2,3]、鈴木 秀幸[4]、渡辺 直治[1] ([1]静岡大・創造、[2]静岡大・農、[3]静岡大・グリーン、[4]かずさＤＮＡ研究所)
○HIROSHI HIRATA[1], Toshiyuki Ohnishi[2,3], Hideyuki Suzuki[4], Naoharu Watanabe[1] ([1]Shizuoka Univ. Graduate School of Science and Technology, [2]Shizuoka Univ. Graduate School of Agriculture, [3]Shizuoka Univ. Research Institute of Green Science and Technology, [4]Kazusa DNA Research)

【背景】
2-Phenylethanol (2PE) はバラの主要な香気成分であり、その特徴的な芳香から産業的にも重要な化合物である。これまでの研究により 2PE は通年、芳香族アミノ酸脱炭酸酵素 AADC（PAAS） およびフェニルアセトアルデヒド還元酵素 PAR により L-Phenylalanine から生合成され、高温期（夏期）には Phenyl pyruvic acid (PPA) 代謝酵素が関わる、新規生合成経路が主要であることを示唆してきた。本発表では新規経路における生合成酵素の通常期 / 高温期における発現挙動と、高温期特異的な経路活性化要因について報告する。
【方法】
まず、高温期における 2PE 生成の要因を調べるため、高温期と通常期のバラ (*Rosa x hybrida* ‘Yves Piaget’)の花弁における生合成関連遺伝子の qRT-PCR による発現解析を行った。また、人工的に高温期を再現して 2PE 生成量と転写産物の挙動を経時的に追跡した。次に高温期における環境要因がバラにどのような影響を与えるかを調べるために次世代シーケンサーを用いた RNA-seq 解析を行った。
【結果】
2PE 生合成酵素遺伝子の転写物解析の結果、PPA 代謝酵素遺伝子の発現のみ高温期に亢進していた。また、人工的高温条件においては 2PE 生成量と PPA 代謝酵素遺伝子の発現が経時的に増加していた。これらの結果から、高温期における 2PE の生成には PPA 代謝酵素遺伝子の発現上昇が寄与していることが示唆された。さらに RNA-seq 解析の結果、2PE 生合成に関与すると考えられる転写調節因子を見出した。これらの転写物解析から高温期特異的な 2PE 生合成の活性化に関する知見を得たので報告する。

Rose, 2-Phenylethanol, Phenylpyruvic acid

講演番号：2E11p15
講演日時、会場：3 月 27 日 16:54～ E 校舎 11 会場

オオムギに含まれるセロトニン二量体合成酵素の性状解析

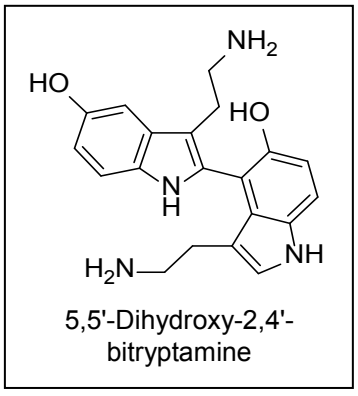
Characterization of the biosynthetic enzyme of serotonin dimer in barley

○坂口 七瀬[1]、八木 佑香里[2]、中島 廣光[2]、石原 亨[2] ([1]鳥取大院農、[2]鳥取大農)
○Nanase SAKAGUCHI[1], Yukari YAGI[2], Hiromitsu NAKAJIMA[2], Atsushi ISHIHARA[2] ([1]Grad. Sch. Agr.,Tottori Univ., [2]Tottori Univ.)

【目的】植物は病原菌が感染すると様々な二次代謝産物を蓄積する。イネ科植物では、トリプトファン経路に由来する二次代謝産物が蓄積する例が多い。これまでの研究でオオムギではイネ科斑点病菌(*Bipolaris sorokiniana*)を接種するとセロトニンやその二量体 5,5’-dihydroxy-2,4’-bitryptamine が蓄積してくることがわかった。5,5’-Dihydroxy-2,4’-bitryptamine はセロトニンが二量化して生合成されると推定されるが、この反応に関わる酵素については全く不明である。本研究ではセロトニンの二量体 5,5’-dihydroxy-2,4’-bitryptamine の生合成に関与する酵素の特徴解析を目的とした。

【方法】播種後約２週間のオオムギの葉にイネ科斑点病菌(*B. sorokiniana* OB-25-1 株)を接種した。接種から一定時間培養したオオムギ葉を緩衝液で磨砕した後、遠心分離を行い、得られた上清を粗酵素液とした。この粗酵素液を用いセロトニンを基質として、NADP などの補酵素の存在下で酵素反応を行った。生成物は HPLC で定量した。

【結果】イネ科斑点病菌を接種したオオムギ葉から調製した粗酵素とセロトニン、NAD を用いて酵素反応を行うと、5,5’-dihydroxy-2,4’-bitryptamine が蓄積することが分かった。粗酵素、セロトニン、NAD のいずれかを用いなかった場合や、沸騰湯浴中で失活させた粗酵素を添加し酵素反応を行った場合には、5,5’-dihydroxy-2,4’-bitryptamine は生成しなかった。補酵素として NAD、NADP、NADH、NADPH をそれぞれを用いて反応を行ったところ、NADP を用いた場合に 5,5’-dihydroxy-2,4’-bitryptamine の生成量が最大となった。また、生成物の蓄積量は、反応時間や投入する粗酵素液の量に依存して増加した。これらの結果より、セロトニン二分子から NADP を補酵素とする酵素反応により 5,5’-dihydroxy-2,4’-bitryptamine が生成するものと推定された。また、酵素反応の最適温度は 40° C、至適 pH は６であった。また、本酵素のセロトニンに対する K_m は 1.6 mM であった。さらに、病原菌の接種後の酵素活性の変化を調べた。酵素活性は病原菌を接種していない植物体からはほとんど検出されず、接種後増大しはじめ、72 時間後に最大となった。



5,5'-Dihydroxy-2,4'-bitryptamine

barley, serotonin, secondary metabolism

講演番号：2E11p16
講演日時、会場：3 月 27 日 17:15～ E 校舎 11 会場

低酸素癌細胞選択的毒性物質 rakicidin 類の生合成研究

Biosynthesis of Rakicidins, Hypoxia-Selective Cytotoxins from Actinomycetes

○石川 愛理沙[1]、小牧 久幸[2]、市川 夏子[2]、パンバングレッド ワタナライ[3]、五十嵐 康弘[1] ([1]富山県立大学、[2]（独）製品評価技術基盤機構、[3]マヒドン大学)
○Arisa Ishikawa[1], Hisayuki Komaki[2], Natsuko Ichikawa[2], Watanalai Panbangred[3], Yasuhiro Igarashi[1] ([1]Toyama Prefectural University, [2]NITE, [3]Mahidol University)

Rakicidin 類は、癌細胞内部の低酸素状態の細胞に対して選択的毒性を示すリポペプチドである[1]。これまで rakicidin 類として、rakicidin A[2], B[2], C[3], D[4]および E[5]が知られている。これらは、放線菌の二次代謝産物のみに見られる 4-アミノ-2,4-ペンタジエノン酸(APDA)を含んでいるが、その生合成は明らかにされていない。そこで、^{13}C 標識化合物の添加培養を行うことにより、APDA の生合成前駆体の解明を試みた。

生合成経路を推定するにあたり、rakicidin A 生産菌 *Micromonospora* sp. DSW-705 株と rakicidin D 生産菌 *Streptomyces* sp. MWW064 株のドラフトゲノム解析を行い、rakicidin A と D の生合成遺伝子クラスターを特定した。PKS-NRPS 遺伝子のドメイン機能予測から、APDA 部位の 5 炭素のうち 2 炭素は酢酸、3 炭素はセリンに由来することが推定された。この推定をもとに、MWW064 株を用いて 2-^{13}C-酢酸ナトリウム添加培養と 1-^{13}C- セリン添加培養を行い、それぞれの培養液をブタノール抽出した。続いて、ブタノール抽出物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーと HPLC 分取により精製した標識 rakicidin D の ^{13}C NMR 測定を行った。その結果、2-^{13}C-酢酸ナトリウムの添加培養では 9 位炭素が、1-^{13}C- セリン添加培養では 10 位炭素のシグナル強度が増加し、APDA は酢酸とセリンに由来することが証明された。以上により、rakicidin 類はアシル CoA をスターターとして脂肪酸アルキル鎖が伸長した後、セリン、マロニル CoA、グリシン、アスパラギンが縮合して生じたペプチド鎖のラクトン化、水酸化、セリン側鎖水酸基の脱水を経て生合成されることが明らかになった。

＜参考文献＞

1. Y. Yamazaki *et al*, *Biol. Pharm. Bull.* **2007**, *30*, 261-265.
2. K. D. Mcbrien *et al*, *J. Antibiot.* **1995**, *48*, 1446-1452.
3. J-F. Hu. *et al*, *Eur. J. Org. Chem.* **2000**, 3353-3356.
4. Y. Igarashi *et al*, *J. Antibiot.* **2010**, *63*, 563-565.
5. N.Oku *et al*, *J. Nat. Prod.* **2014**, *77*, 2561-2565

rakicidin, biosynthesis, hypoxia-selective cytotoxins

講演番号：2E11p17
講演日時、会場：3 月 27 日 17:26～ E 校舎 11 会場

植物病原菌 *Bipolaris coicis* の生産する植物毒素 radicinin の生合成
Biosynthesis of phytotoxin radicinin produced by phytopathogen *Bipolaris coicis*
○西田 直人[1]、北野 生薫[1]、赤木 靖典[2]、児玉 基一朗[2]、藪田 行哲[2]、石原 亨[2]、中島 廣光[2] ([1]鳥取大院農、[2]鳥取大農)
○Naoto NISHIDA[1], Takashige KITANO[1], Yasunori AKAGI[2], Motoichiro KODAMA[2], Yukinori YABUTA[2], Atsushi ISHIHARA[2], Hiromitsu NAKAJIMA[2] ([1]Grad. Sch. Agric., Tottori Univ., [2]Fac. Agric., Tottori Univ.)

【背景と目的】Radicinin は植物に葉枯れや根の生育阻害を引き起こす植物毒素である。これまでにいくつかの植物病原菌によって生産されることが報告されている。Radicinin はポリケチド化合物であり、ポリケチド合成酵素 (PKS) によって生合成されると考えられている。しかし、これまでに報告された他のポリケチドでは、異なる 2 本のポリケチド鎖がエーテル結合やエステル結合を介して C-O 間で結合するのに対して、radicinin では「C-C 結合を形成した後、環化する」という特徴的な生合成機構が提唱されていた。このことから、我々は遺伝子レベル、酵素レベル、物質レベルで radicinin の生合成機構を明らかにすることを目的として研究を開始した。本研究で用いた *Bipolaris coicis* はハトムギやジュズダマに葉枯病を引き起こす植物病原菌である。これまでに、*B. coicis* H-13-3 株が radicinin とその類縁体 3-*epi*-radicinin などを生産することやそれらが示す植物毒性について報告してきた。さらに、無細胞系での deoxyradicinin から radicinin への変換も報告している。今回、我々は radicinin 生合成に関わる PKS 遺伝子を見出し、生合成遺伝子クラスターの解析を行い、さらに、*Pichia* 酵母発現系を構築し、酵素レベルでの radicinin 生合成機構の解明を目指したので報告する。
【方法と結果】次世代シーケンサーによる解析からゲノム上に PKS をコードする 14 の遺伝子を見出した。これらの遺伝子について、相同組換えによる遺伝子破壊を行い、radicinin 生産への影響を解析したところ、一つの PKS 遺伝子が radicinin 生合成に関与することが明らかとなった。次に、この PKS 遺伝子の周辺に存在する遺伝子を探索し、同様の方法により、radicinin 生産への影響を調べた結果、三つの遺伝子 *orf5*、*orf6*、*orf7* が生合成に関わることが明らかになった。この結果より、radicinin が一つの PKS によって生合成される 1 本のポリケチド鎖から生成されるということが考えられた。そこで、^{2}H、^{13}C で二重標識された酢酸ナトリウムを radicinin に取り込ませ、生合成開始ユニットの位置を解析したところ、radicinin の構造中に一つだけ存在することが分かった。このことにより、radicinin が 1 本のポリケチド鎖から生合成されていることが明らかになった。次に、酵母 *Pichia pastoris* を用いた発現系を構築し、4 つの生合成遺伝子がコードするタンパク質の機能を解析することを目指した。遺伝子をそれぞれ、プラスミド pPICZα の分泌シグナル α-factor 下流にクローニングし、エレクトロポレーションで *P. pastoris* SMD1168H に形質転換した。現在、deoxyradicinin から radicinin への変換に関わる monooxygenase をコードしていると考えられる ORF5 タンパク質の反応系を構築し、解析を行っている。

radicinin, *Bipolaris coicis*, phytotoxin

講演番号：2E11p18
講演日時、会場：3 月 27 日 17:37～ E 校舎 11 会場

ヤマカガシ属ヘビ *Rhabdophis pentasupralabialis* が頸腺に蓄積するステロイド毒
Defensive steroids accumulated in nuchal glands of the Asian snake *Rhabdophis pentasupralabialis*

○吉田 達哉[1]、城野 哲平[2]、竹内 寛彦[3]、吉永 直子[1]、小野 肇[1]、西田 律夫[1]、丁 利[2]、唐 並忠[2]、森 哲[3]、森 直樹[1]（[1]京都大農、[2]成都生物研究所、[3]京都大理）
○Tatsuya Yoshida[1], Teppei Jono[2], Hirohiko Takeuti[3], Naoko Yoshinaga[1], Hajime Ono[1], Ritsuo Nishida[1], Li Ding[2], Yezhong Tang[2], Akira Mori[3], Naoki Mori[1] ([1]Kyoto Univ. Department of Agriculture, [2]Chengdu Institute of Biology, [3]Kyoto Univ. Department of Science)

[背景と目的] 日本に生息するヤマカガシ (*Rhabdophis tigrinus*) は口腔内に開口する毒腺とは別に、首の後ろにある頸腺に毒液を蓄積し、天敵に対する防御に役立てている。この毒液の主成分は bufadienolide と呼ばれるステロイドで、ヤマカガシはこの化合物を餌であるヒキガエルから摂取し、一部構造を改変して利用している。頸腺と類似した器官を持つヘビはヤマカガシを含め世界で 16 種が報告されているが、ヤマカガシ以外の種が持つ毒成分についてはほとんど研究されていない。中国に生息するヤマカガシ属のヘビ *R. pentasupralabialis* はミミズを主食とし、頸部背面だけでなく胴体背面にも同様の器官を持ち、頸背腺と呼ばれる。本研究では *R. pentasupralabialis* の頸背腺毒の成分分析と、その成分の由来となる生物の探索を行った。
[方法と結果] *R. pentasupralabialis* の成体から得た頸背腺液のメタノール抽出物を LCMS で分析し、日本のヤマカガシが持つ成分と比較した。その結果個体間で含有成分に違いが認められ、大別すると *R. pentasupralabialis* に特有な未知の bufadienolide のみを持つ個体と、それらに加えてヤマカガシと同じ bufadienolide も持つ個体に分けられた。同一個体の頸部と胴体部の成分組成には大きな違いは見られなかった。また、*R. pentasupralabialis* の子ヘビに孵化直後から 1 ヶ月間ヒキガエルのみ、もしくはミミズのみを与えて飼育し、頸部の液を分析した。その結果、ヒキガエルを与えた個体ではヤマカガシと同じ bufadienolide が増加した。これらの成分は孵化直後の子ヘビはほとんど持っておらず、ミミズを与えた個体では増加は見られなかった。さらに、NMR 分析によりヒキガエルのみを与えた子ヘビで増加した成分のうちの一つを arenobufagin と同定した。これらの結果から *R. pentasupralabialis* はヤマカガシと同様にヒキガエルに由来する、arenobufagin 等の bufadienolide を頸背腺に蓄積していると示唆された。

bufadienolide, snake, steroid

講演番号：2E11p19
講演日時、会場：3 月 27 日 17:48～ E 校舎 11 会場

有毒イモリからのテトロドトキシンの推定生合成中間体の探索

Screening of the possible biosynthetic intermediate of tetrodotoxin from the toxic newt

○工藤 雄大、長 由扶子、此木 敬一、山下 まり（東北大院農）
○Yuta Kudo, Yuko Cho, Keiichi Konoki, Mari Yotsu-Yamashita (Tohoku Univ.)

[背景] フグ毒テトロドトキシン (Tetrodotoxin, TTX, **1**, Figure 1)は致死性の食中毒を引き起こす強力な神経毒である。フグ、カニ、巻貝などの多様な海洋生物、陸棲のイモリ、カエルが TTX を保持することが知られているが、その生合成経路は未解明である。我々は生合成経路解明の手掛かりを得るため、これまで多種の新規 TTX 類縁体を構造決定してきた [1)]。そして最近、有毒イモリから 4,9-anhydro-10-hemiketal-5-deoxyTTX (**2**, Figure 1)を同定し、その骨格構造から、モノテルペンを由来とした TTX の生合成経路を新たに推定した [2)]。本発表では、推定生合成経路における中間体の探索について報告する。

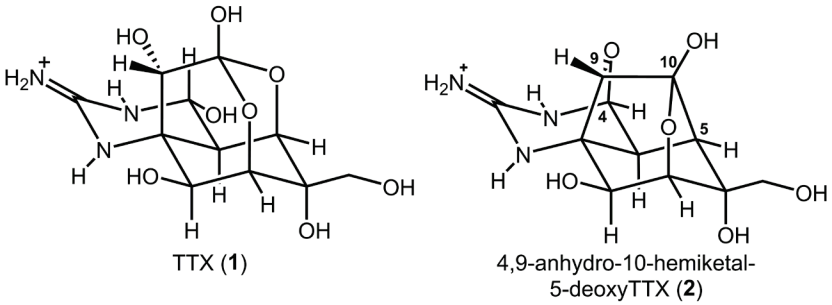


Figure 1. The structures of TTX (**1**) and its analogue (**2**).

[方法] TTX を高濃度に含むオキナワシリケンイモリ (*Cynops ensicauda popei*)の抽出物を LC-MS/MS で精査したところ、生合成中間体と予想される微量成分 (**3**)が検出された。そこで、**3** を各種カラムクロマトグラフィーを用いて単離し、^{1}H NMR, COSY, TOCSY, HSQC, HMBC, NOESY 1D で構造を解析した。

[結果] 高分解能 ESI-MS を用いて **3** の分子式を決定し、さらに各種 NMR スペクトルから、交換性プロトンを除く全てのプロトン、及びカーボンシグナルを帰属した。**3** はグアニジン基を含む二環性の新規化合物と同定され、我々が想定する TTX の生合成経路を支持する構造を有していた。

[References] 1. a) Kudo, Y.; Finn, J.; Fukushima, K.; Sakugawa, S.; Cho, Y.; Konoki, K.; Yotsu-Yamashita, M. *J. Nat. Prod.* **2014**, *77*, 1000−1004; b) Yotsu-Yamashita, M.; Abe, Y.; Kudo, Y.; Ritson-Williams, R.; Paul, V. J.; Konoki, K.; Cho, Y.; Adachi, M.; Imazu, T.; Nishikawa, T.; Isobe, M. *Mar. Drugs* **2013**, *11*, 2799–2813.
2. Kudo, Y.; Yamashita, Y.; Mebs, D.; Cho, Y.; Konoki, K.; Yasumoto, T.; Yotsu-Yamashita M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, in press (DOI: 10.1002/anie.201408913).

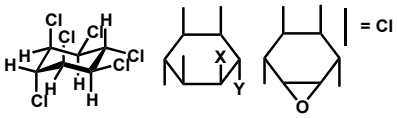
tetrodotoxin, biosynthesis, LC-MS

講演番号：2E21a01
講演日時、会場：3 月 27 日 09:00～ E 校舎 21 会場

γ-BHC 類縁体・関連化合物の合成と活性

Synthesis of γ-BHC analogs and related compounds and their activities

○永崎 果鈴[1]、田中 啓司[2]、尾添 嘉久[3]、松田 一彦[1]、森本 正則[1]、栗原 紀夫[4] ([1]近畿大農、[2]近畿大農&名古屋大エコトピア科研、[3]島根大生資、[4]京都大)
○Karin NAGASAKI[1], keiji Tanaka[2], Yoshihisa Ozoe[3], Kazuhiko Matsuda[1], Masanori Morimoto[1], Norio Kurihara[4] ([1]Kinki Univ., [2]Kinki Univ. & Nagoya Univ., [3]Shimane Univ., [4]Kyoto Univ.)



[I] [II] [III]

【目的】BHC (1,2,3,4,5,6-Hexachlorocyclohexane、HCH)は、第二次世界大戦後の日本の食糧事情を救った代表的な殺虫剤であるが、過去の殺虫剤である。しかし、BHC の活性本体であるγ-BHC[I]の作用する部位-抑制性神経伝達物質 GABA 受容体 Cl イオンチャンネル[1)] は、現在も新規殺虫剤開発に最もホットな話題を提供している。BHC には理論上８種類の立体異性体が存在するが、その中で、γ-BHC[Cl 原子の配位(e,e,e,a,a,a)]にのみ高い殺虫活性が、そしてα-BHC（e,e,e,e,a,a）にごく弱い活性が認められる以外、他の立体異性体には殺虫活性がない。なぜか？報告者らは、以前、γ-BHC と同じ Cl 原子の立体配位を維持しながら、他の置換基（CH3、OCH3、SCH3、Br、F、I、H など）に置換した化合物([II]）の殺虫活性と置換基との相関研究から、一定の構造-活性の相関を得ている[2)]。しかし、当時、作用部位は不明で、なぜγ-BHC にだけ特異的に高い殺虫活性が存在するのか？は不明のままであった。 その後、γ-BHC とは全く異なる化学構造のピクロトキシニンなどが、γ-BHC と作用部位を共有することが明らかにされた[3)]。本研究では、その作用部位周辺の構造、γ-BHC などとの結合の様子とイオンチャンネルとして作動するメカニズムなどを知るため、改めてγ-BHC 類縁体などを合成し、GABA 受容体 Cl イオンチャンネルに対する作用を調べている。

【方法】γ-BHC 類縁体、関連化合物を新たに合成し、これら化合物にどの程度の GABA アンタゴニスト活性が存在するかを、以下の系を用いて調べた。*In vivo* では、イエバエなどに対する殺虫活性や中毒症状の観察で、また *in vitro* の試験系として、GABA 作動性 Cl イオンチャンネルを昆虫の培養細胞に発現させ、膜電位感受性蛍光プローブで、さらには、イエバエ頭部やラット脳から調製した神経膜画分に対する[^{3}H]-EBOB 結合阻害試験等で評価した。

【結果および考察】 供試した化合物の中で、GABA アンタゴニスト活性を有している化合物は、基本的にシクロヘキサン環上のγ体の位置に少なくとも３～４個以上の Cl 原子を有する化合物であったが、その置換位置で活性に大きな違いがあること、また、Cl 原子を OH 基で置換した類縁体にも高い GABA アンタゴニスト活性、殺虫活性を認め、さらにはγ体の立体構造を持たない化合物[Ⅲ]にも多少の殺虫活性や GABA アンタゴニスト活性を認めるなど、非常に興味ある結果が得られている。

1)J.Environ Sci Health B 18:1-14(1983)、2)Pestic.Biochem.Physiol. 8 33 (1978)
3) 3) Pestic. Biochem. Physiol. 22 124 (1984)

BHC, GABA receptor, Cl ion channel

講演番号：2E21a02
講演日時、会場：3 月 27 日 09:11～ E 校舎 21 会場

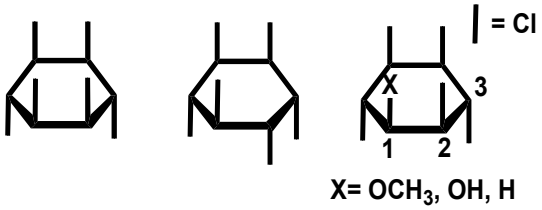
1 位置換γ-BHC 類縁体のラセミ体光学分割とそれら鏡像異性体の［3H］EBOB 結合阻害活性

Optical resolution of the enantiomers of 1-substituted-γ-BHC analogs and their comparative inhibitory activities on [3H]EBOB binding to rat brain membrane fraction

○田中 啓司[1]、永崎 果鈴[2]、松田 一彦[2]、尾添 嘉久[2]、森本 正則[3]、栗原 紀夫[4]([1]近畿大農&名古屋大エコトピア科研、[2]近畿大農、[3]島根大生資、[4]京都大)
○Keiji Tanaka[1], Nagasaki Karin[2], Kazuhiko Matsuda[2], Yoshihisa Ozoe[2], Masanori Morimoto[3], Norio Kurihara[4] ([1]Kinki Univ. & Nagoya Univ., [2]Kinki Univ., [3]Shimane Univ., [4]Kyoto Univ.)

【目的】

BHC（Hexachlorocyclohexane）には 8 種類の立体異性体が存在するが、その中でγ-BHC にのみ高い殺虫活性が認められている。γ-BHC は昆虫の抑制性神経伝達物質である GABA の受容体に対してアンタゴニストとして作用し、その殺虫活性を発揮していることが知られているが、どうして GABA のアンタゴニスト活性や、その結果である殺虫活性に cyclohexane 上の Cl 原子の厳密な立体配位が必要なのかは不明である。γ-BHC の 1 位の Cl 原子を他の置換基で置換したγ-BHC 類縁体は光学活性であり、これら光学活性な類縁体の各鏡像体間で、昆虫 GABA 受容体に対する活性に対して差が認められるかを調べ、その結果をこれまで本学会で報告してきている。今大会では、哺乳動物の GABA 受容体に対するこれら鏡像体の活性について報告する。



γ-BHC　　α-BHC　　1-X 類縁体

【方法】

1-OCH_3、1-OH、1-H のγ-BHC 類縁体およびα-BHC を供試し、これらの各鏡像体分割には HPLC 用キラルカラムを用いた。各鏡像異性体の哺乳動物 GABA 受容体に対する活性比較は、ラット脳から分画した神経膜画分（P2 fr.）を用い、この分画に対する[^{3}H]EBOB 結合阻害活性評価で行った。

【結果および考察】

昆虫（イエバエ）の GABA 受容体はβサブユニットのホモ 5 量体であるが、一方、ラット脳の GABA 受容体はα、β、γサブユニットからなるヘテロ 5 量体で構成されていることが知られている。

ラット脳から調製した神経膜画分に対する[^{3}H]EBOB 結合阻害実験では、1-OCH_3-γ-BHC 類縁体、1-OH 類縁体、1-H 類縁体、そしてα-BHC いずれの鏡像体も、その阻害活性に鏡像体間でほとんど差が認められなかった。

gamma-BHC, GABA receptor, EBOB

講演番号：2E21a03
講演日時、会場：3 月 27 日 09:22～ E 校舎 21 会場

希少糖の貯穀害虫に対する成長阻害活性

Growth inhibitory activity of rare sugar against stored product pest

○瀬尾 晃平[1]、廣島 恵[1]、手林 慎一[1]、佐藤 正資[2]、秋光 和也[2]、何森 健[3] ([1]高知大農、[2]香川大農、[3]香川大希少糖)
○Kohei Seo[1], Megumi Hiroshima[1], Shinichi Tebayashi[1], Masashi Sato[2], Kazuya Akimistu[2], Ken Izumori[3] ([1]Kochi Univ, [2]Kagawa Univ, [3]Kagawa Univ Rare sugar)

【目的】

植物は害虫に対する成長阻害物質や周辺植物に対する生長阻害物質など様々な化学的防御物質を生存戦略に利用している。演者らは植物の生存戦略の理解と応用利用のために、様々な植物から殺虫活性物質の探索を行ってきた。その結果、コバノズイナ(*Itea virginica*)の葉の抽出物がスジコナマダラメイガ(*Ephestia kuehniella*)に対して成長阻害活性を示すことを見出したため、この活性本体の解明を目指した。

（供試植物）高知大学構内で栽培しているコバノズイナを試験に供した。

（供試昆虫）ノシメマダラメイガ(*Plodia interpunctella*)、ノコギリヒラタムシ(*Oryzaephilus surinamensis*)、ヒラタコクヌストモドキ(*Tribolium confusum*)は本研究室で累代飼育している個体群を用いた。スジコナマダラメイガおよびジンサンシバンムシ(*Stegobium paniceum*)は住化テクノサービスから購入した。

（供試希少糖）D体およびL体のプシコース、ソルボース、タガロース、フルクトースは希少糖研究センターから分与されたものを用いた。

（生物試験方法）昆虫飼育用餌に植物抽出物あるいは希少糖を混合し、これを餌として供試して前記の貯穀害虫を飼育した。飼育試験終了時の虫体数および生体重を測定した。

【結果】

コバノズイナ葉のメタノール抽出物はノシメマダラメイガに対して強い成長阻害活性を示したことから、この粗抽出物を水可溶部とメタノール可溶部に分離し生物試験を行うと、両画分に活性が確認された。水画分の主要な成分は D-プシコースであることから、標準物質を用いた生物試験を行った。その結果、8%の D-プシコースを餌に混合すると 80%以上の強い成長阻害活性を示し、1%の混合でも 50%以上の成長阻害活性を示した。これらのことから D-プシコースはコバノズイナ葉のメタノール抽出物中に含まれる成長阻害活性の一部を担うものと考えられた。さらに他の貯穀害虫に対する D-プシコースの成長阻害活性を調べると、ノシメマダラメイガやノコギリヒラタムシの成虫に対しては殺虫活性を示さなかったものの、貯穀害虫の幼虫類に対しては 50-90%程度の成長阻害活性を示した。また、D-プシコース以外の希少糖および D-フルクトースの成長阻害活性を調べると、D-フルクトース以外の糖には成長阻害活性が確認され、これらを利用した害虫防除技術の開発が期待された。

growth inhibitory, rare sugar, stored product pest

講演番号：2E21a04
講演日時、会場：3 月 27 日 09:33～ E 校舎 21 会場

D-アラビノース：線虫成長阻害試験で見つかった新規な生物活性希少糖

D-Arabinose: A novel bioactive rare sugar discovered by a *C. elegans* growth assay

○佐藤 正資[1]、砂古口 博文[1]、吉原 明秀[2]、新谷 知也[3]、大隈 一裕[3]、何森 健[2]（[1]香川大農、[2]香川大希少糖研究セ、[3]松谷化学工業(株)）
○ Masashi Sato[1], Hirofumi SAKOGUCHI[1], Akihide YOSHIHARA[2], Tomoya SHINTANI[3], Kazuhiro OKUMA[3], Ken IZUMORI[2] ([1]Fac. of Agric., Kagawa Univ., [2]Rare Sugar Res. Center, Kagawa Univ., [3]Matsutani Chem. Ind. CO.,LTD)

【目的】　希少糖とは「自然界に存在量が少ない単糖及びその誘導体」と定義される。希少糖は，その存在量の少なさと化学合成の困難さから，生物活性についてはほとんど調べられていなかった。しかし，香川大学において微生物由来の酵素を用いて希少糖を効率的，かつ網羅的に合成する手法が開発され，希少糖の生物活性が精力的に研究された。その結果，D-フルクトースの C3 エピマーである D-プシコースや，D-グルコースの C3 エピマーである D-アロースに血糖値減少，脂肪合成抑制，癌細胞増殖抑制，血管新生抑制，抗老化などの様々な生物活性が報告されている。

これら希少糖の生物活性は，糖の取り込みや代謝（解糖系）を抑制することにより発現すると考えられる。我々は，このような糖代謝関連機能を抑制する希少糖の簡便なスクリーニング法として線虫成長阻害試験が利用できるのではと考えた。すでに，ケトヘキソース（全 8 種）及びアルドヘキソース（全 16 種）の線虫成長阻害活性を調査し，上述の D-プシコースや D-アロースが線虫の成長を阻害することを報告している。今回，さらにアルドペントース異性体(D-及び L-リボース，アラビノース，キシロース，リキソースの全 8 種)の線虫成長阻害試験を行った。

【方法・結果】*Caenorhabditis elegans* 第一期幼虫(L1)を同調培養により得た。試験容器として 24 ウェルカルチャープレートを用い，各ウェルに試料を含んだ液体培地と L1 約 10 頭を入れ，20℃で静置培養を行った。3 日後，線虫個体を顕微鏡撮影し，その画像ファイルを画像解析ソフト(ImageJ)で処理し，各個体の投影面積値を求めた。対照線虫の面積値を基準として，線虫の成長を 50%阻害する濃度(IC_{50} 値)をプロビット法で計算した。その結果，D-アラビノースに強い活性が認められ，IC_{50} 値は 4.2 mM であった。それ以外の 7 種のアルドペントース異性体には，ほとんど活性は認められなかった。D-プシコース，D-アロースの IC_{50} 値はそれぞれ 53 mM，200 mM であり，それらと比較すると 10 倍以上の活性の強さを持つことが明らかになった。植物の多糖として自然界に大量に存在する L-アラビノースには α-アミラーゼ阻害活性が知られている。一方，希少糖 D-アラビノースに生物活性は知られておらず，本研究が初めての報告である。

D-arabinose, *Caenorhabditis elegans*, growth inhibition

講演番号：2E21a05
講演日時、会場：3 月 27 日 09:44～ E 校舎 21 会場

デオキシ-ケトヘキソース異性体の線虫成長阻害活性

Growth inhibitory activity of deoxy-ketohexose isomers in *C. elegans*

○砂古口 博文[1]、吉原 明秀[2]、新谷 知也[3]、大隈 一裕[3]、何森 健[2]、佐藤 正資[1]（[1]香川大農、[2]香川大希少糖研究セ、[3]松谷化学工業(株)）
○Hirofumi SAKOGUCHI[1], Akihide YOSHIHARA[2], Tomoya SHINTANI[3], Kazuhiro OKUMA[3], Ken IZUMORI[2], Masashi SATO[1]（[1]Fac. of Agric., Kagawa Univ., [2]Rare Sugar Res. Center, Kagawa Univ., [3]Matsutani Chem. Ind. CO.,LTD）

【目的】希少糖とは「自然界に存在量が少ない単糖及びその誘導体」と定義される。その存在量と化学合成の困難さから，希少糖の生物活性はほとんど調べられていなかった。しかし，何森らは微生物由来の酵素を用いて希少糖を効率的，かつ網羅的に合成する手法(Izumoring)を開発し，生物活性研究のための試料提供が可能になった。そして，現在，がん細胞増殖抑制，血糖値降下，脂肪合成抑制，血管新生抑制，抗老化などの様々な生物活性が報告されている。我々はモデル生物である線虫 *Caenorhabditis elegans* の幼虫を用いて希少糖の成長阻害活性を調査し，D-フルクトースの C3 エピマーである D-プシコース(D-Psi)や D-グルコースの C3 エピマーである D-アロースが活性を示すことを報告している。我々は，この線虫成長阻害試験が生物活性希少糖の簡便な一次スクリーニング法となると考えている。今回，上述の方法で酵素的に合成した 1-デオキシ-ケトヘキソース異性体全 8 種及び 6-デオキシ-D-プシコース(6-d-D-Psi)などデオキシ-ケトヘキソース希少糖の線虫成長阻害活性について報告する。

【方法・結果】 *C. elegans* 第一期幼虫(L1)を同調培養により得た。試験容器として 24 ウェルカルチャープレートを用い，各ウェルに試料を含んだ液体培地と L1 約 10 頭を入れ，20℃で静置培養を行った，3 日後，線虫個体を顕微鏡撮影し，その画像ファイルを画像解析ソフト(ImageJ)で処理し，各個体の投影面積値を求めた。対照線虫の平均面積値を基準として，線虫の成長を 50%阻害する濃度(IC_{50}値)をプロビット法で計算した。その結果，1-デオキシ-D-プシコース（1-d-D-Psi）に強い成長阻害活性が認められ，IC_{50}値は 5.4 mM と計算された。D-Psi の IC_{50}値は 53 mM であり，D-Psi は 1 位のデオキシ化により約 10 倍，活性が上昇した。1-d-D-Psi 以外の 1-デオキシ-ケトヘキソース異性体には活性は認められなかった。解糖系の強力な阻害剤である 2-デオキシ-D-グルコースの IC_{50}値は 19 mM となり，1-d-D-Psi はこれよりも強い成長阻害活性を示した。また，6-デオキシ-D-プシコースには全く成長阻害活性が認められなかった。このことから D-プシコースの活性発現には，6 位の水酸基の存在が必須であることが明らかになった。以上から推定される D-Psi 及び 1-d-D-Psi の成長阻害メカニズムについて考察する。

rare sugar, *Caenorhabditis elegans*, growth inhibition

講演番号：2E21a06
講演日時、会場：3 月 27 日 10:05～ E 校舎 21 会場

D-プシコース処理線虫におけるストレス応答タンパク質の遺伝子発現
Gene expression of stress-response proteins in D-psicose treated nematodes
○山口 大貴[1]、吉原 明秀[2]、新谷 知也[3]、大隈 一裕[3]、何森 健[2]、佐藤 正資[1]（[1]香川大農、[2]香川大希少糖研究セ、[3]松谷化学工業(株)）
○Taiki YAMAGUCHI[1], Akihide YOSHIHARA[2], Tomoya SHINTANI[3], Kazuhiro OKUMA[3], Ken IZUMORI[2], Masashi SATO[1] ([1]Fac. of Agric., Kagawa Univ., [2]Rare Sugar Res. Center, Kagawa Univ., [3]Matsutani Chem. Ind. CO.,LTD)

【目的】摂取カロリーの制限は，様々な実験動物の寿命を延長することが報告されている。ヒトにおいても，カロリー制限は糖尿病，癌など加齢性疾患の発症を遅らせ，その結果，寿命を延長すると考えられている。その詳細な作用機序は明らかではないが，細胞内エネルギーレベルの低下が insulin/IGF-I シグナル(IIS)経路，sirtuin などの複数のエネルギーセンサーによって媒介され，ストレス応答タンパク質の発現増強やミトコンドリア機能の保全などが誘導される。その結果，寿命延長が起こると考えられている。しかし，栄養のバランスを保ちながらカロリー制限を長期間続けることは苦痛と困難が伴う。そこで，食事と一緒に摂取することでカロリー制限と同様の抗老化効果が得られるカロリー制限模倣物質(calorie restriction mimetics, CRM)の開発が注目されている。これまで，CRM の候補として，解糖系酵素の阻害剤 2-deoxy-D-glucose，sirtuin を活性化する resveratrol などが報告されているが，毒性や効果に問題があり実用化されたものは無い。我々は，糖代謝を抑制する希少糖が CRM として働く可能性があると考え，老化研究のモデル生物である線虫 *Caenorhabditis elegans* を用いて研究を行い，D-psicose の寿命延長効果を報告した。本研究では，D- psicose による寿命延長の作用メカニズムを明らかにすることを目的として，ミトコンドリア局在型スーパーオキシドデスムターゼ(SOD-3) などのストレス応答タンパク質の遺伝子発現量をレポーターアッセイ(GFP)により調査した。
【方法・結果】 実験には，SOD-3::GFP 融合遺伝子を導入した変異体 CF1553(muIs84)を用いた。この変異体を同調培養し，成熟成虫を得た。得られた成虫を D-psicose を含む液体培地に移し，20℃で静置培養を行った。ここから毎日あるいは隔日で 10～20 個体を取り出し，蛍光顕微鏡写真を撮影した。得られた画像は imageJ を用いて輝度を定量し，*sod-3* 発現量とした。D-psicose 処理をした線虫の *sod-3* 遺伝子発現量は対照線虫と比較すると，培養前半（処理開始 5－9 日）では，減少傾向が認められ，培養後半（処理開始 10－14 日）では逆に増加傾向が認められた。また，*sod-3* と同様に IIS 経路下流の転写因子 DAF-16 (FOXO の線虫ホモログ)の影響を受けていると考えられるストレス応答タンパク質，small heat shock protein (*hsp-16*)，glutathione-*S*-transferase (*gst-4*)などの遺伝子発現量の変化を報告する。

D-psicose, *Caenorhabditis elegans*, stress response protein

講演番号：2E21a07
講演日時、会場：3 月 27 日 10:16～ E 校舎 21 会場

抗 HIV 活性を有する EFdA の合成

Total synthesis of the Potent Anti-HIV Nucleoside EFdA

○福山 圭[1]、大類 洋[2]、桑原 重文[1] ([1]東北大院農、[2]横浜薬大)
○Kei Fukuyama[1], Hiroshi Ohrui[2], Shigefumi Kuwahara[1] ([1]Tohoku Univ., [2]Yokohama coll. of Pharm.)

【目的】

AIDS は世界的規模で問題となっているウイルス感染症である。現在の主要な治療法である HARRT 療法は著しい効果があるものの薬剤耐性ウイルスの出現が問題となっており、薬剤耐性を生じず、低毒性な治療薬とその供給法の開発は喫緊の研究課題である。

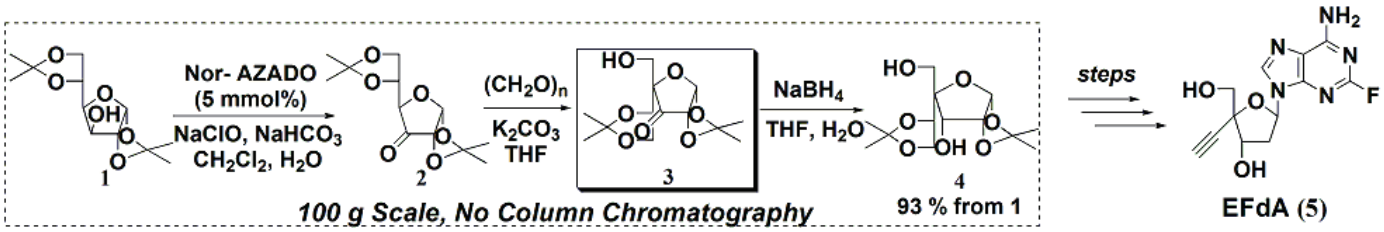
近年、4'- *C* -置換ヌクレオシド類の特異な生物活性に注目が集まっている。我々は新規リボース 4 位増炭法を見出し、抗 HIV 候補薬 EFdA **(5)** の効率的合成を達成したのでここに報告する。

【方法】及び【結果】

2 とパラホルムアルデヒドとのアルドール反応により新規 4 位増炭体 **3** とし、反応液を濾過後に $NaBH_4$ で還元することにより 4-*C*-増炭 D-リボース保護体 **4** を 100 g スケールで得ることに成功した (3 工程、93%)。得られた **4** を Corey-Fuchs 法を含む 3 工程で定量的に保護アルキン体に変換した。N-グルコシル化に Vorbrüggen 変法を適用することで望む*β*-ヌクレオシド体を定量的に得ることにも成功した。その後 2'位の脱酸素化を経て EFdA へと導いた。

【考察】

既知法の約 2 倍となる通算収率 37%で EFdA **(5)** の効率的合成に成功した。



EFdA, anti-HIV nucleoside, 4-C-substituted-furanoribose

講演番号：2E21a08
講演日時、会場：3 月 27 日 10:27～ E 校舎 21 会場

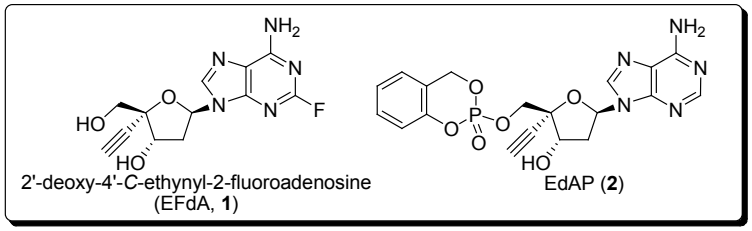
抗インフルエンザウイルス活性を有する核酸誘導体 EdAP の合成研究

Synthetic Study and Anti-influenza Virus Activity of Nucleic Acid Derivative EdAP

○林 瑛[1]、竹内 倫文[1]、櫻庭 彩子[1]、ノングラック スリウィライジャロエン[2]、志村 聡美[1]、林 京子[3]、鈴木 康夫[2]、紙透 伸治[1]、菅原 二三男[1]、大類 洋[4] ([1]東理大院・理工、[2]中部大・生命健康、[3]富山大・医薬、[4]横浜薬科大・薬)

○Ei HAYASHI[1], Toshifumi TAKEUCHI[1], Ayako SAKURABA[1], Nongluk Sriwilaijaroen[2], Satomi SHIMURA[1], Kyoko HAYASHI[3], Yasuo SUZUKI[2], Shinji KAMISUKI[1], Fumio SUGAWARA[1], Hiroshi OHRUI[4] ([1]Fac. of Sci. and Tech., Tokyo Univ. of Sci., [2]Chubu Univ., [3]Toyama Univ., [4]Yokohama college of Pharmacy)

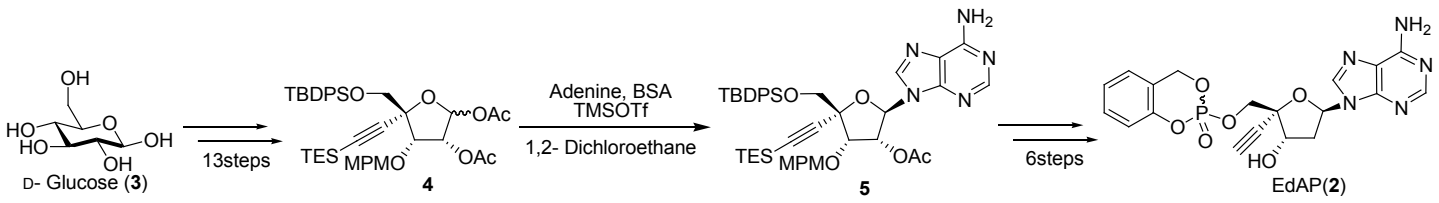
【背景】ウイルスとの戦いに勝つ為に新しい抗ウイルス薬の開発が求められている。



【目的】2'-deoxy-4'-*C*-ethynyl-2-fluoroadenosine (EFdA, **1**) は、抗 HIV 薬として設計・合成された逆転写酵素阻害剤である[1) 2)]。化合物 (**1**) は、核酸アナログとして HIV の伸長 DNA 鎖に取り込まれるが 3'- OH が反応性の低いネオペンチル型 2 級アルコールのため DNA 鎖の伸長が止まる。ウイルスの RNA 合成酵素が 2'-デオキシヌクレオシドを受け入れることから、ウイルス RNA 合成酵素の阻害を目的として、細胞膜透過性の上昇と 5'-O-モノリン酸への効率の良い加水分解を期待して、リボースの 5'位に環状リン酸エステル基を持つ化合物 **2** (EdAP) を分子設計した。これは **2** が細胞内に取り込まれた後、5'-O-モノリン酸への加水分解が起こり速やかに活性型（5'-O-トリリン酸）となることを期待したものである。本研究は、EdAP (**2**) の合成と活性評価を目的とした。

【方法と結果】D-Glucose (**3**) を出発原料とし、13 工程で **4** へと導いた。**4** を Vorubrugen 方によりアデニンを導入した後、6 工程で EdAP (**2**) を合成した。

EdAP (**2**) の抗インフルエンザウイルス活性試験を、培養細胞を用いて評価したところ、活性を示した。また、動物試験でも抗インフルエンザウイルス活性を示すことが明らかとなった。



1) H. Ohrui, *Proc. Jpn. Acad.,* Ser. B 87, **2011**, 53-65

2) S. G. Sarafianos, *et al*, *J. Biol. Chem.*, **2014**, 289:24533-24548

Anti-influenza Virus, EFdA, EdAP

講演番号：2E21a09
講演日時、会場：3 月 27 日 10:38～ E 校舎 21 会場

化学アゴニスト選択的 TRPM8 アンタゴニストであるボアカンジンの類縁化合物を用いた構造-活性相関研究

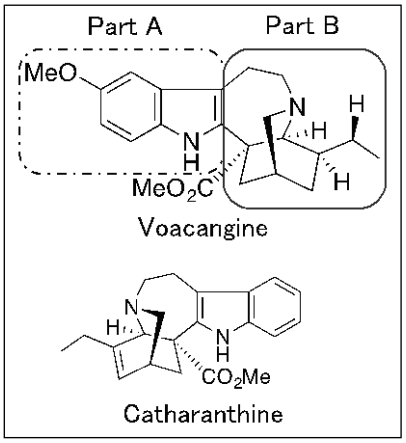
Structure-activity relationship study of voacangine analogues; the chemical agonist-selective TRPM8 antagonist

○寺田 祐子[1]、北島 満里子[2]、田口 芙悠美[2]、高山 廣光[2]、堀江 俊治[3]、渡辺 達夫[1] ([1]静県大食、[2]千葉大薬、[3]城西国際大薬)
○Yuko TERADA[1], Mariko Kitajima[2], Fuyumi Taguchi[2], Hiromitsu Takayama[2], Syunji Horie[3], Tatsuo Watanabe[1] ([1]Univ. of Shizuoka, [2]Chiba Univ., [3]Josai International Univ.)

【背景・目的】Transient Receptor Potential Melastatin 8 (TRPM8) は、低温や冷感物質 menthol・icilin で活性化し、それらによる冷感を受容するイオンチャネルである。TRPM8 は口腔内から消化器官・皮膚など、全身の感覚神経に発現している。TRPM8 遮断薬は、冷的アロディニア・冷的痛覚過敏に対して優れた鎮痛効果を示すことから、精力的に開発が進められている。私たちは、アフリカ伝承薬 *Voacanga africana* に特有のアルカロイドである voacangine が、新規骨格の TRPM8 アンタゴニストあることを明らかにした。既存の TRPM8 アンタゴニストは、全てのアゴニスト刺激（化学アゴニスト・低温）を阻害するのに対し、voacangine は化学アゴニスト選択的阻害（menthol と icilin を選択的に阻害し、低温による受容体の活性化は阻害しない特性）を示した[1)]。今回は、主に天然由来の voacangine 類縁化合物 11 種を用いた構造-活性相関研究から、TRPM8 阻害、特に化学アゴニスト選択的阻害に重要な構造を明らかとすることを目的とした。

【方法】TRPM8 を発現させた発現 HEK 細胞を用いた。FLEX station Ⅱ（Molecular Devices）と蛍光顕微鏡（AF7000, Leica）により細胞内 Ca^{2+}濃度の変化を測定し、voacangine 類縁体による TRPM8 遮断活性を評価した。

【結果・考察】voacangine の part A を変化させても、TRPM8 阻害活性は大きく変化しなかった。全ての voacangine タイプ化合物（part B, iboga 構造の 6 員環が 7 員環より手前に位置する）は、化学アゴニストを選択的に阻害し、低温による TRPM8 の活性化を阻害しなかった。一方、catharanthine タイプ化合物（iboga 骨格の 6 員環が 7 員環より奥側に位置する）は、化学アゴニストと低温の両方を強力に阻害した。これらの結果から、voacangine の part B が TRPM8 阻害活性に重要であり、特に voacangine タイプ化合物に見られる iboga の立体構造が、化学アゴニスト選択的阻害に決定的に重要であることが示唆された[2)]。TRPM8 遮断薬は、冷的アロディニア・冷的痛覚過敏に対する鎮痛薬として期待されているが、副作用として深部体温の低下を生じる。voacangine は現在報告されている唯一の化学アゴニスト選択的 TRPM8 アンタゴニストであり、生体において低体温を生ずるか否か興味深い。



1）Terada Y et al, *J. Nat. Prod.* 2014, **77**, 285-97
2）Terada Y et al, *J. Nat. Prod.* 2014, **77**, 1831-8

TRPM8 antagonist, voacangine, iboga-structure

講演番号：2E21a10
講演日時、会場：3 月 27 日 10:49～ E 校舎 21 会場

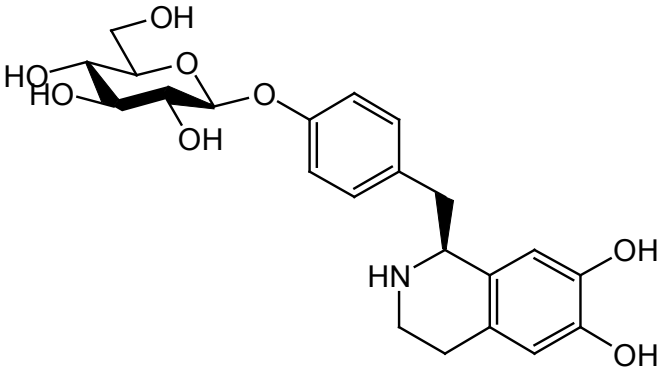
ヒゲナミン配糖体の骨格筋糖取り込み促進活性に関する構造活性相関研究

Structure activity relationship study of glucose uptake enhancing activity of higenamine glucoside against skeletal muscle

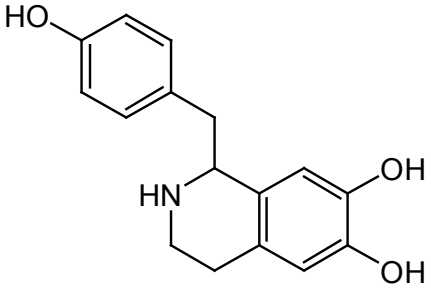
○木村 駿介、加藤 英介、川端 潤（北大院農）
○ Shunsuke KIMURA, Eisuke KATO, Jun KAWABATA (Graduate School of Agriculture, Hokkaido Univ.)

生活習慣病は世界中で問題となっており、特に糖尿病患者数の増加は深刻な問題である。食後に上昇した血糖値は骨格筋へと糖が取り込まれて代謝されることで低下するが、この際血液中の糖の骨格筋への取り込みを調節しているホルモンはインスリンである。糖尿病患者においては、このインスリン分泌量の低下もしくはその働きの低下が問題となっているため、インスリンのように骨格筋への糖の取り込み促進作用を有する化合物には糖尿病に対する効果が期待できる。我々は、骨格筋への糖取り込みを促進する化合物として昨年度、蓮芯より Higenamine 4'-*O*-glucoside (**1**) の単離を報告した。本研究では、**1** の類縁体を合成し、その構造活性相関研究を行った。

まず **1** より、グルコースが外れたアグリコン (**2**) を合成して活性を測定した。その結果、糖取り込み促進活性が維持されることが確認され、このアグリコン部位が活性に寄与していることが分かった。現在は **2** の構造活性相関研究を行うため、**2** の水酸基やアミノ基など官能基についてメチル化など誘導体化した化合物を合成しており、その糖取り込み活性を評価する予定である。



Higenamine 4'-*O*-glucoside (**1**)



Higenamine (**2**)

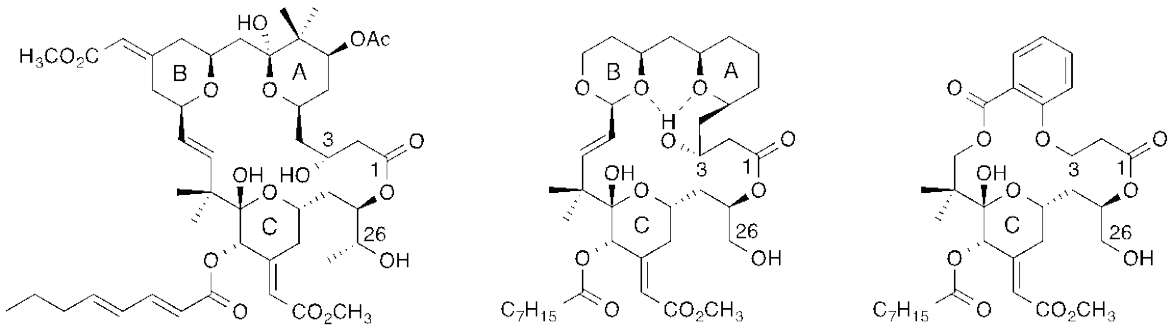
glucose uptake, diabetes, skeletal muscle

講演番号：2E21a11
講演日時、会場：3 月 27 日 11:10～ E 校舎 21 会場

16 員環ラクトン構造を有する bryostatin 単純化アナログの開発
Development of a simplified bryostatin analog with a 16-membered lactone system
○中川 優[1,2]、Katherine E. Near[1]、Daryl Staveness[1]、Paul A. Wender[1] ([1]スタンフォード大、[2]名大院生命農)
○Yu NAKAGAWA[1,2], Katherine E. NEAR[1], Daryl STAVENESS[1], Paul A. WENDER[1] ([1]Stanford Univ., [2]Nagoya Univ.)

【目的】 Bryostatin 1 (Bryo-1) は，*Bugula neritina* から単離された海洋天然物であり，がん，アルツハイマー病，AIDS などの難治性疾患に対する治療薬リードとして注目されている．しかしながら，本化合物の天然からの単離収率は極めて低く，かつ合成も困難であることから，供給面が大きな問題となっている．この問題を解決する一つの方法論として，Bryo-1 の活性を保持し，かつ合成が容易な単純化アナログの開発が進められており，AB 環を単純化した **1** が合成と活性の両面から優れた創薬リードになりうることが示されている．そこで本研究では，**1** の AB 環部分の更なる構造単純化を行い，効率的に誘導体化できる新規 Bryo-1 アナログを開発することを目的とした．

【方法および結果】 Bryo-1 および **1** のラクトン環コンホメーションは，AB 環と 3 位水酸基との間の分子内水素結合によって規定されている．そこで，この分子内水素結合によるコンホメーションの規定をサリチル酸ユニットで擬似的に再現できるよう設計したアナログ **2** を合成した．NMR に基づくコンホメーション解析の結果，**2** は Bryo-1 の活性発現に必要な C 環，1 位エステルカルボニル基，および 26 位水酸基の空間的配置をほぼ完全に再現していることが確認された．そこで，Bryo-1 の細胞内標的分子であるプロテインキナーゼ C (PKC) との結合試験を行なったところ，**2** は Bryo-1 や **1** と比べると若干弱いものの，顕著な PKC 結合能を示すことが明らかとなった．アナログ **2** は，23 段階で合成することができ，さらにサリチル酸部分に置換基を導入することによって容易に誘導体化することができることから，有望な創薬リードになることが期待される．



Bryostatin 1　　**1**　　**2**

Wender, P. A.; Nakagawa, Y.; Near, K. E.; Staveness, D. *Org. Lett*. **2014**, *16*, 5136-5139.

bryostatin, protein kinase C, structural simplification

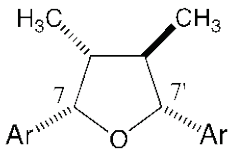
講演番号：2E21a12
講演日時、会場：3 月 27 日 11:21～ E 校舎 21 会場

Cytotoxic activity of ether type of lignin

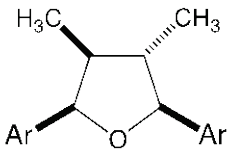
○Tuti Wukirsari, Hisashi Nishiwaki, Kosuke Nishi, Takuya Sugahara, Satoshi Yamauchi (Ehime Univ.)

Lignan is a dimer binding between 8 and 8' position of phenyl propanoid units. Many kinds of lignans, which have different oxidation positions and cyclization type, have been reported. Although the cytotoxic activities of lignans have been known, the relationship between structure containing stereochemistry and activity has not been clarified. In our previous study, structure-cytotoxic activity of butane type of lignan has been shown. In this study, the effect of structure of ether type of lignan on the cytotoxic activity was examined.

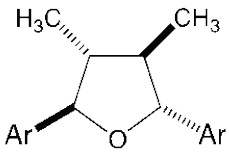
(+)- and (-)-Lariciresinol and (+)- and (-)-pinoresinol, which are dietary lignans, did not show the activity. On the other hand, all stereoisomers of 9-dehydroxylariciresinol, which is a tri-substituted tetrahydrofuran lignan, showed the cytotoxic activity against HL-60 and HeLa cells (IC_{50} = 19-95 μM). The activity of 9-dehydroxy (+)-lariciresinol was most effective. The activity of tetra-substituted tetrahydrofuran was also examined using synthesized **1**-**10**. The most potent stereoisomer was (-)-verrucosin (**1**), showing 6.6 μM of IC_{50} value against HeLa cells. The IC_{50} values of the other stereoisomers were 18-95 μM against HL-60 and HeLa cells. As a next step, the 7-derivatives of (-)-verrucosin (**1**) were synthesized by employing previously described synthetic method[1)] and the cytotoxic activity against HeLa cells was examined, suggesting that the activities of 7-(4-hydroxyphenyl) and 7-(4-methoxyphenyl) derivative were similar to that of **1**. Now, the preparation and cytotoxic examination of 7'-aryl derivatives bearing 7-(4-methoxyphenyl) group are trying.



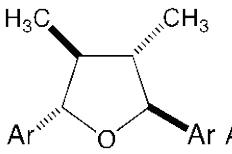
(-)-verrucosin (**1**)



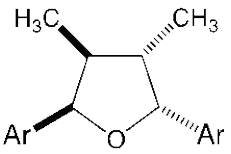
(+)-verrucosin (**2**)



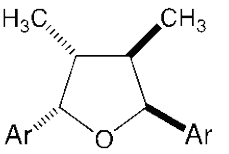
(+)-fragransin A2 (**3**)



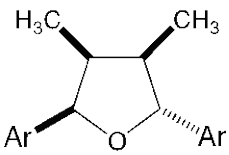
4



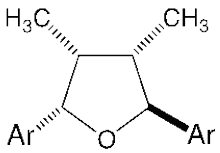
(+)-saucernetin diol (**5**)



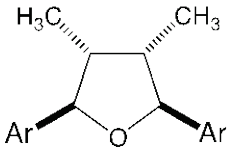
6



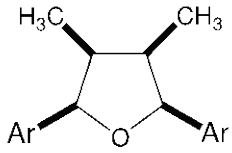
7



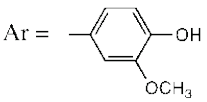
(-)-machilin-I (**8**)



nectandrin B (**9**)



tetrahydrofuroguaiacin B (**10**)



1) S. Yamauchi et. al., Org. Biomol. Chem., **3**, 1670-1675 (2005).

lignan, cytotoxic activity, stereoisomer

講演番号：2E21a13
講演日時、会場：3 月 27 日 11:32～ E 校舎 21 会場

ピラン環化合物の合成と構造活性相関
Synthesis of pyran rig compound and structure activity relationship
○田中 祐希[1]、牧田 裕史[1]、川井 悟[1]、常盤野 哲生[2]、吉澤 結子[2] ([1]東電大理工、[2]秋田県立生資科)
○Yuki Tanaka[1], Hirohumi Makita[1], Satoru Kawai[1], Tetuo Tokiwano[2], Yuko Yoshizawa[2] ([1]Tokyo Denki Univ, [2]Akita Prefectural Univ)

【目的】天然資源由来のフラボン、クマリン、カルコン類の中には、その基本骨格にピラン環やフラン環が縮合した化合物も数多く知られている。一般に、ピラン環が縮合した化合物は強い生物活性を持つことが知られている。*Lonchocarpus heterophyllus* や *Artocarpus rotunda* の抽出物される、ピラノフラボン類はそれぞれアフリカ睡眠病病原体の抑制活性や抗菌・抗腫瘍活性を有することが報告されており、*Plumbago zeylanica* 等に含まれるピラノクマリン類の seselin は、数種のがん細胞に対する増殖抑制、ヒト末梢血単核細胞増殖の抑制などの興味深い生物活性を持つことが報告されており、また、ピラノカルコン類の Millepachine は強力な抗腫瘍活性を有することが報告されている。天然資源中には多様なピラン環が縮合している化合物類が存在するが、いずれも微量にしか含有されていないため、構造活性相関に関する研究は十分には行われていない。本研究では、ピラン環が縮合されたフラボン、クマリン、カルコン、オーロン類の系統的合成を行うとともに、それらの前骨髄性白血病細 HL-60 に対する増殖抑制効果を調べることで、構造活性相関に関する知見を深めることを目的とした。
【方法】クマリン骨格ベンゼン環または δ-ラクトン環にピラン環を縮合するため、ベンゼン環または δ-ラクトン環にヒドロキシル基を有するクマリンを出発物質として、塩化インジウム、トリフルオロメタンスルホン酸銅(II)、またはフェニルボロン酸などの酸触媒存在下でブテナール類を Michael 付加することにより合成を試みた。この方法ではクマリン骨格 5-6 位にピラン環が縮合したピラノクマリン類の合成は困難と予想されたため、ジヒドロキシアセトフェノン類を出発物質とする合成法の検討も行った。具体的には、2,6-ジヒドロキシアセトフェノン類にピリジン触媒存在下でブテナール類を Michael 付加することによりエーテル中間体を調製し、次いで環化することでピラノヒドロキシアセトフェノン類とし、これを DCC と DMAP 存在下ジクロロメタン溶媒中でフェニル酢酸類と反応させてエステル中間体を調製し、さらに DBU 中で環化させて 3-フェニル-4-メチル-ピラノクマリン類とする方法の検討を行った。合成したピラノクマリン類の生物活性は、前骨髄性白血病細胞 HL-60 に対する増殖抑制活性により判定した。
【結果】これまでに数十種のピラノクマリン類を合成した。単純クマリン類に比較して、ピラン環を導入することで活性が増強される傾向が認められた。このことより、拡張したπ電子系が活性発現に重要な役割を果たしていることが示唆された。ピラン環の縮合位置、ピラン環に導入した官能基の生物活性への影響についても検討したので、合わせて報告する。

pyran ring, structure activity relationship, Michael addition

講演番号：2E21a14
講演日時、会場：3 月 27 日 11:43～ E 校舎 21 会場

スチルベン類の合成及び構造活性相関
Synthesis of stilbenes and their structure activity relationship
○中村 翼[1]、川井 悟[1]、常盤野 哲生[2]、吉澤 結子[2] ([1]東電大理工、[2]秋田県大生資料)
○Tsubasa Nakamura[1], Satoru Kawai[1], Tetsuo Tokiwano[2], Yuko Yoshizawa[2] ([1]Tokyo Denki Univ., [2]Akita Prefectural Univ.)

【目的】 スチルベン類はラン科植物等に含有される 1,2-diphenylethene 構造を有する化合物群であり、その中には抗がん作用や抗菌作用など興味深い生物活性を示すものがある。天然資源中にはシス体とトランス体の両方が存在し、シススチルベン類ではシクンシ科植物 *Combretum caffrum* に含まれるコンブレタスタチン A-4 の抗がん作用に、またトランススチルベン類ではブドウ果皮に含有されるレスベラトロールの抗酸化作用によるがん予防効果等の生物活性に注目が集まっている。しかし、天然資源中の含有量は微量であり構造的多様性も限られていることから、スチルベン類における構造活性相関研究の例は少ない。そこで構造活性相関に関する知見を深めるため、本研究ではスチルベン類の系統的合成と生物活性評価を試みることとした。
【方法】 本研究では Wittig 反応によりシス-トランス異性体混合物としてスチルベン類を合成し、クロマトグラフィーにより分離することで両異性体を調製した。具体的には、出発物質であるベンズアルデヒド類をメタノール中で $NaBH_4$ 還元することでフェニルメタノール類とし、これに DCM 中 PBr_3 処理により臭素化してブロモメチルベンゼン類を合成した。これを PPh_3 存在下トルエン溶媒中で反応させてホスホニウム塩類とした。これをベンズアルデヒド類と THF（または DMF） 中 *t*-BuOK 存在下で Wittig 反応によりカップリングし、スチルベン類のシス-トランス異性体混合物を合成した。シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより両異性体を分離した。スチルベン類の生物活性は前骨髄性白血病細胞 HL-60 に対する増殖抑制効果により評価した。
【結果】 本研究ではメトキシスチルベン類を中心に種々の官能基を導入したスチルベン類を合成した。合成収率はシス体とトランス体のクロマトグラフィー分離の容易さに強く依存しており、両異性体間の物理化学的性質差が大きいときほど高い収率が得られた。特にメトキシル基数増加にともない分離が容易になるため収率が向上した。一方、3',4',5'-トリメトキシフェニル基を持つスチルベン合成では、本基を Wittig 反応ホスホニウム塩側から導入すると副生成物が多く著しく収率低下した。これはトリメトキシフェニル基 2 位炭素原子の反応性が高くホスホニウム塩調製時の副反応が原因であり、本基導入はアルデヒド側から行う必要があることが示された。

合成した各化合物について HL-60 増殖抑制試験を行ったところ、3',4',5'-トリメトキシ体に顕著な活性が認められた。また、同じ置換様式であれば、シス体の方がトランス体より強い活性を示す等、いくつか興味深い知見が得られたので合わせて報告する。

Stilbene, Structure activity relationship, Wittig reaction

講演番号：2E21a15
講演日時、会場：3 月 27 日 11:54～ E 校舎 21 会場

アクリドン類の合成と前骨髄性白血病細胞 HL-60 に対する増殖抑制活性

Synthesis of acridones and their antiproliferative activity on HL-60

○岸本 真帆[1]、川井 悟[1]、常盤野 哲生[2]、吉澤 結子[2] ([1]東電大理工、[2]秋田県大生資科)
○maho kishimoto[1], satoru kawai[1], tetsuo tokiwano[2], yuko yoshizawa[2] ([1]Tokyo Denki Univ., [2]Akita Prefectural Univ.)

【目的】ミカン科植物を原料とするオウバク、キジツ、サンショウ、チンピなどの生薬が数多く知られている。このためミカン科植物が含有する二次代謝化合物について精力的な研究が行われ、健胃整腸作用、鎮咳作用、抗菌作用、抗酸化作用など人間に有用な効果を示す化合物としてポリフェノール類、フラボノイド類、カロテノイド類、クマリン類、アクリドン類などが明らかにされている。このうちアクリドン類はがん細胞増殖抑制効果を示すことから注目を集めている。アクリドンはアクリジンの 9 位オキソ体であり、1948 年 *Acronychia* 属植物の根皮から初めて acronycine が単離され、その後 1981 年に *Severinia*、*Glycosmis*、*Citrus* 属植物から種々のアクリドン類が単離されている。その多くはプレニル基やメトキシ基、ピラン環を持っており、このような置換基が活性発現どのように関与しているか興味が持たれている。しかし、アクリドン類は天然資源中には微量にしか存在しないため、構造活性相関に関する知見はほとんど得られておらず、またアクリドン類を足場化合物とした創薬研究の報告も少ない。そこで、本研究ではアクリドン類の系統的合成を試みるとともに、得られた化合物の前骨髄性白血病細胞 HL-60 増殖抑制効果を調べることで、アクリドン類の構造活性相関に関する知見を深めることを目的としている。
【方法】*o*-ヨード安息香酸とアニリン類を粉末銅存在下塩基性条件下加熱して *N*-フェニルアントラニル酸中間体を合成した。これをポリリン酸存在下で分子内 Friedel-Crafts アシル化により環化してアクリドン骨格を構築した。種々のアニリン類を出発物質とすることで、1、2、3 または 4 位に置換基を導入したアクリドン類を合成した。また、イミノ基の活性への影響を調べるためにアクリドン *N*-メチル体および *N*-ベンジル体の合成を行った。アクリドン類を脱水 DME 中、水素化ナトリウム触媒下、ヨウ化カリウム存在下でヨウ化メチルまたはベンジルクロリド類と反応させることによって *N*-メチルおよび *N*-ベンジルアクリドン類を合成した。
【結果】本研究では、種々のアニリン類を出発物質とすること、また *N*-メチル体および *N*-ベンジル体の合成により八十数種類のアクリドン類を合成した。各化合物について前骨髄性白血病細胞 HL-60 増殖抑制試験を行ったところ、*N*-ベンジルアクリドンやジヒドロキシアクリドン類に顕著な活性が認められた。また、*N*-メチル化により溶解性向上や活性増強が認められるなど興味深い結果が得られたので合わせて報告する。

acridone, structure activity relationship, Ullumann coupling

講演番号：2E21p01
講演日時、会場：3 月 27 日 14:00～ E 校舎 21 会場

ハスモンヨトウ幼虫の食害に対するダイズ毛茸の化学的応答
Chemical response of soybean trichomes to *Spodoptera litura* herbivory

○中田 隆[1]、網干 貴子[2]、吉永 直子[1]、石原 亨[3]、寺石 政義[1]、SCHMELZ Eric[4]、小野 肇[1]、西田 律夫[1]、奥本 裕[1]、森 直樹[1] ([1]京大院農、[2]山形大農、[3]鳥取大農、[4]カリフォルニア大学サンディエゴ校)
○Ryu NAKATA[1], Takako ABOSHI[2], Naoko YOSHINAGA[1], Atsushi ISHIHARA[3], Masayoshi TERAISHI[1], Eric SCHMELZ[4], Hajime ONO[1], Ritsuo NISHIDA[1], Yutaka OKUMOTO[1], Naoki MORI[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Yamagata Univ., [3]Tottori Univ., [4]UCSD)

[目的と背景]

植物は植食者や病原菌に対し様々な化学的応答を示す．これに関与する化学物質の多くは植物が生産する誘導性の二次代謝物である．本研究では，ハスモンヨトウ(*Spodoptera litura*) 幼虫に食害されたダイズ (*Glycine max*) の葉の化学的応答に注目した．昨年までの大会で，ハスモンヨトウ幼虫の食害によりダイズの葉で phenylalanine から flavonoids への生合成が活性化され，daidzein や formononetin 等が誘導されることを報告した．Daidzein はハスモンヨトウ幼虫の生育を阻害する [1)] ため，この化学的応答は直接的な抵抗応答であると考えられた．

[方法と結果]

ダイズ (品種:タマホマレ) の食害葉を MS イメージングにより観察したところ，これら flavonoids が毛茸 (trichome) にも多く分布していた．そこで食害葉の trichome のみを抽出し，LCMS に供試した．その結果，daidzein と formononetin に加えて数種の物質が検出された．今回新たに検出された物質は，ポジティブモードで *m/z* 271, 741, 757 のイオンとして検出された．

次に，これらの物質について，ハスモンヨトウ幼虫に食害された際の動態を調べた．Trichome が多い品種である IAC100 を用い，腸管内容物抽出液を用いた処理により食害をミミックした [2)]．処理葉の trichome を抽出して LCMS に供試したところ，*m/z* 271, 741, 757 のイオンが同様に検出され，いずれも腸管内容物抽出液による処理で増加した．また，茎の trichome で同様の実験を行ったところ，*m/z* 741, 757 のイオンは検出されず，*m/z* 271 のイオンは増加しなかった．

IAC100 はハスモンヨトウ幼虫に対し，強い抵抗性を示す．Trichome がハスモンヨトウ抵抗性に何らかの機能を果たすと考え，IAC100 の葉 (無処理区) と trichome を除去した葉 (処理区) をハスモンヨトウ幼虫に摂食させる実験を行った．その結果，いずれの場合も摂食量は同等であったが，無処理区でハスモンヨトウ幼虫の生育が阻害された．

1) Zhou et al. *J. Agric. Food Chem.* 2011, *59*, 6004-6010.
2) Murakami et al. *Metabolites*. 2014, *4*, 532-546.

Spodoptera litura, *Glycine max*, trichome

講演番号：2E21p02
講演日時、会場：3 月 27 日 14:11～ E 校舎 21 会場

Ficifolidione 類縁体の 4 位に関する構造活性相関
Structure-cytotoxicity relationship of 4-alkylated ficifolidione derivatives
○藤原 敏美、西脇 寿、碇 めぐみ、福島 菜央、菅原 卓也、山内 聡、首藤 義博 (愛媛大学)
○satomi fujiwara, Hisashi Nishiwaki, Megumi Ikari, Nao Fukushima, Takuya Sugahara, Satoshi Yamauchi, Yoshihiro Shuto (Ehime Univ.)

【目的】

Ficifolidione はユーカリから単離された天然化合物である．これまでの研究で ficifolidione とその 4 位を *n*-propyl 基に変換した化合物を合成し，ヨトウガの卵巣由来細胞 Sf9，マウスの大腸ガン細胞 Colon26，ヒトの白血病細胞 HL60 に対して毒性を示すことが明らかとなったが, 2 化合物間の毒性に差は認められなかった．しかし，4 位の置換基の構造が本当に細胞毒性に影響しないのかどうかは定かではない．そこで本研究では，ficifolidione4 位の alkyl 基の長さを変換した種々の類縁体を合成し, ficifolidione に対して特に感受性の高かった HL60 細胞に対する毒性を評価することで，4 位の alkyl 基の長さと活性との相関関係を解明することを目的とした．

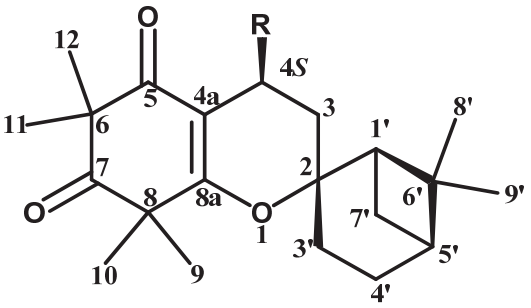


Fig. 1 Ficifolidione とその類縁体
R = Me, *n*-Pr, *iso*Bu (ficifolidione), *n*-Pen, *n*-Hex

【方法】

Phloroglucinol を出発原料とし，aluminum chloride と acetyl chloride を用いて Friedel-Crafts 反応によりアセチル化した．その後 sodium methoxide と iodomethane を用いてメチル化し，2N HCl aq.を用いた加熱還流により脱アセチル化することで syncarpic acid を得た．合成した syncarpic acid を(−)-β-pinene と acetaldehyde，butylaldehyde，hexylaldehyde，octylaldehyde といった種々のアルデヒドと縮合させ，ficifolidione 類縁体を合成した．そして，得られた化合物の HL60 に対する細胞毒性を WST-8 試験により評価し，50%細胞増殖阻害濃度 IC_{50} (μM)を求めた．

【結果】

4 位の alkyl 基の長さを変換した ficifolidione 類縁体の IC_{50} 値はいずれも 10 μM 程度であり，全ての化合物に細胞毒性が認められたが，各化合物間の毒性に大きな差は認められなかった．このことから，ficifolidione4 位の alkyl 基の長さは，HL60 細胞に対する毒性に大きな影響を与えないことが明らかとなった．

Ficifolidione, cytotoxicity, HL60

講演番号：2E21p03
講演日時、会場：3 月 27 日 14:22～ E 校舎 21 会場

非天然型アミノ酸誘導体イソニトリルの合成と付着阻害活性に関する構造 - 活性相関の考察
Synthesis of Unnatural Amino Acid-isonitrile Derivatives and Structure-activity Relationship Studies toward Antifouling Activity
○高嶋 脩平[1]、野方 靖行[2]、吉村 えり奈[3]、千葉 一裕[1]、北野 克和[1] ([1]東京農工大、[2]電中研、[3]セレス)
○ Shuhei TAKASHIMA[1], Yasuyuki NOGATA[2], Erina YOSHIMURA[3], Kazuhiro CHIBA[1], Yoshikazu KITANO[1] ([1]Tokyo Univ. of Agric. and Technol., [2]CRIEPI, [3]CERES inc.)

【目的】
フジツボやイガイを始めとする付着汚損生物は、船底や漁網、発電所の冷却システムに付着し多大な被害を与えている。特に船底に付着したフジツボは船の燃費を最大３０％低下させるという報告がある。現在において、フジツボの付着を未然に防止するために、防汚剤として亜酸化銅やバイオサイドが広く用いられている。しかしながら、これらの防汚剤は付着汚損生物の殺生により付着を阻害していることから、その毒性や残留性の観点から環境汚染が懸念されている。そのため、環境への影響が少ない新たなコンセプトの付着防汚剤の開発が必要とされている。
これまでに我々は、ウミウシやカイメンから単離されるイソシアノ基を有する付着阻害物質をリード化合物として、タテジマフジツボキプリス幼生を用いた構造－活性相関試験の考察を行った結果、イソシアノ基が付着阻害活性発現に重要であることを明らかにした。そして、天然物に比べて合成が容易で、高い付着阻害活性を発現するイソニトリル付着阻害物質を創製してきた。さらに近年、生分解後にアミノ酸への変換が期待される、タンパク質構成アミノ酸を中心としたアミノ酸誘導体イソニトリル付着阻害物質の創製に取り組んできた。しかしながら、これまで非天然型のアミノ酸誘導体イソニトリルについては十分な議論が行われていなかった。そこで本研究では、グリシンのα位にエステル側鎖を有する非天然のアミノ酸誘導体イソニトリルを合成し、付着阻害活性に関する構造－活性相関を調べることとした。
【方法と結果】
グリシンを原料としてアミノ基をイソシアノ基に、カルボキシ基をベンジルエステルに変換したイソシアノ酢酸ベンジルエステル（**1**）を合成した後、化合物 **1** に鎖状や環状の様々なアルキル基を有するアクリル酸エステルをマイケル付加反応で導入し、非天然型のアミノ酸誘導体イソニトリルを合成した。そして、合成した化合物に対してタテジマフジツボキプリス幼生を用いた付着試験を行い、付着率と死亡率を観察した。その結果、合成した非天然型のアミノ酸誘導体イソニトリルは有効な付着阻害活性を示し、特に長鎖アルキルエステルよりも短鎖アルキルエステルの方がより高い付着阻害活性を示した。また、有効な付着阻害活性を示した化合物については高濃度でも死亡率が低いことが確認された。以上より、非天然のアミノ酸誘導体イソニトリルは、新たな付着阻害物質として有望であることが示唆された。

antifouling activity, isonitrile, barnacle

講演番号：2E21p04
講演日時、会場：3 月 27 日 14:33～ E 校舎 21 会場

連続 LC-MS 分析を指向したリン酸塩吸着のためのチタニアによる磁性マイクロ粒子の表面修飾

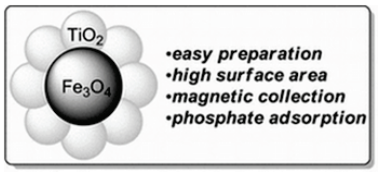
Toward continuous LC-MS analysis: surface modification of magnetic microparticles with TiO2 for phosphate adsorption

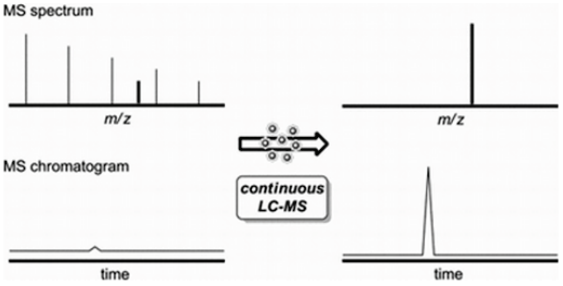
○若松 弘起[1]、芥川 一成[1]、秋山 佳丈[2]、高橋 豊[3]、飯島 志行[4]、岡田 洋平[5]、神谷 秀博[5]、千葉 一裕[1] ([1]東農工大院農、[2]信州大繊維、[3]エムエス・ソリューションズ（株)、[4]横国大環情院、[5]東農工大院 BASE)

○Hiroki WAKAMATSU[1], Issei AKUTAGAWA[1], Yoshitake AKIYAMA[2], Yutaka TAKAHASHI[3], Motoyuki IIJIMA[4], Yohei OKADA[5], Hidehiro KAMIYA[5], Kazuhiro CHIBA[1] ([1]Dept. Appl. Bio. Sci., Tokyo Univ. of Agric. and Tech., [2]Fac. of Tex. Sci. and Tech., Shinshu Univ., [3]MS-Solutions Co.,Ltd, [4]Grad. Sch. of Env. Info. Sci., Yokohama Natl. Univ., [5]Tokyo Univ. of Agric. and Tech.)

【緒言】化合物の分離と定性定量を同時に行うことができる液体クロマトグラフィー質量分析（LC/MS）は，有機化学，生化学をはじめとした幅広い分野において用いられている．リン酸塩などの不揮発性塩を含む緩衝液は，その分離挙動の優位性から，LC の移動相として多用されている．しかしながら，LC/MS においては，不揮発性塩による試料成分のイオン化阻害や塩の析出などによって，不揮発性緩衝液を移動相として用いることが困難である．我々はこれまでに，磁性チタニア粒子を用い，移動相からリン酸塩を連続除去するためのインターフェースの開発を行ってきた．本手法では，リン酸塩を含む LC 移動相と磁性チタニア粒子分散液を混合，磁性チタニア粒子にリン酸塩を吸着させる．その後，内部にマイクロ流路を施したデバイスに前記の混合液を導入，磁力によって磁性チタニア粒子を引き寄せて連続的に除去することで，移動相中からのオンライン・リアルタイムでの脱塩が可能となる．本研究では，効率的なリン酸塩の吸着を目的とし，より広い表面積を持った粒子を調整し，上記デバイスへの応用を試みた．

【方法および結果】硫酸鉄(Ⅲ)七水和物と塩化鉄(Ⅲ)六水和物を脱イオン水により混合し，アンモニウム水溶液を加え，四酸化三鉄のマイクロ粒子を得た．洗浄後，四酸化三鉄マイクロ粒子をエタノール中に分散させ，オルトチタン酸テトラエチルを加えることで，くぼみを有するために広い表面積をもつ磁性チタニアのマイクロ粒子の調製に成功した．発表では，これら磁性チタニア粒子の調整の詳細や粒子構造，吸着特性，さらに上記デバイスと粒子を用いた生体分子の分離定性への応用結果について報告する．





【参考文献】

Akiyama, Y. ; Takahashi, Y. ; Akutagawa, I. ; Ono, A. ; Morishima, K. ; Chiba, K. ; *Int. J. Mass Spectrom.* **2011**, *306*, 37-43.

continuous LC-MS analysis, magnetic TiO2/FeO4 microparticles, desalination interface

講演番号：2E21p05
講演日時、会場：3 月 27 日 14:44～ E 校舎 21 会場

ツバキ科植物由来のジヒドロレスベラトロールグルコシドを基盤とするメラニン生成調節剤の分子設計

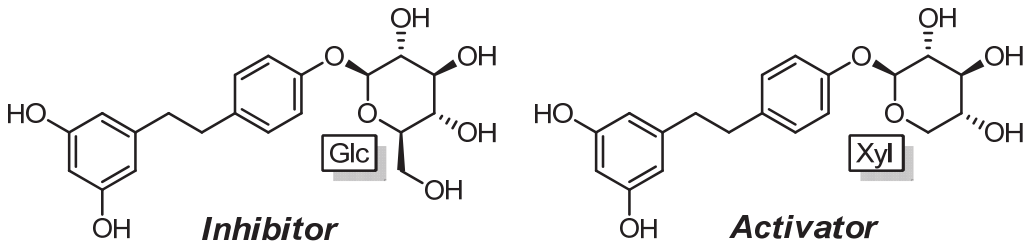
Molecular design of melanogenesis-controlled agents based on the dihydroresveratrol glucoside from theaceous plant

○大出 知里[1]、島田 亙[2,3]、横田 真理子[3]、二瓶 賢一[1,2] ([1]宇都宮大農、[2]農工大院連農、[3]コスモステクニカルセンター)
○Chisato ODE[1], Wataru SHIMADA[2,3], Mariko YOKOTA[3], Ken-ichi NIHEI[1,2] ([1]Utsunomiya Univ., [2]Tokyo Univ. Agric. and Technol., [3]Nikkol group Cosmos technical center Co., Ltd.)

【目的】

ジヒドロレスベラトロールグルコシドは，ツバキ科植物の *Camellia oleifera* から単離された天然配糖体である．その構造中には，既存の強力なメラニン形成阻害剤の構造中に見出されるレゾルシノール骨格が含まれている．そこで，新しいメラニン形成阻害剤の開発を目指し，天然物およびその構造をさらに単純化したキシロシド誘導体の化学合成を行い，マウスメラノーマ細胞を用いて，それらの生理活性を評価した．その結果，天然グルコシドはメラニン形成を阻害するのに対し，合成キシロシドはメラニン形成を促進することが明らかとなった[1]．

このような正反対の生理活性は，糖構造の差異に起因すると判断される．しかしながら，現在までジヒドロレスベラトロール配糖体は，グルコシドとキシロシドの二種類しか化学合成されておらず，詳細な構造-活性相関の解析には至っていない．従って本研究では他の誘導体，特に二糖構造を有するセロビオシドとキシロビオシドの化学合成を行い，それらのメラニン形成に対する活性を評価することを目的とした．



【結果および考察】

市販のセロビオースをアセチル化して，アノメリック位の選択的な脱保護とトリクロロアセトイミデート化を行い，糖供与体を合成した．Wittig 反応を鍵反応として調製した保護ジヒドロレスベラトロール誘導体を，得られた糖供与体により，配糖体化し，さらに脱保護することでジヒドロレスベラトロールセロビオシドを合成した．また，キシロオリゴ糖からアセチル化を経由して，アセチルキシロビオシドを精製し，同様の手法により，ジヒドロレスベラトロールキシロビオシドを合成した．現在，それらの配糖体の生理活性の評価を行っている．

1. Oode, C. et al. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *87*, 862-867.

resveratrol, Wittig reaction, glycosylation

講演番号：2E21p06
講演日時、会場：3 月 27 日 15:05～ E 校舎 21 会場

ジヒドロレスベラトロールの化学的配糖体化と生理活性評価

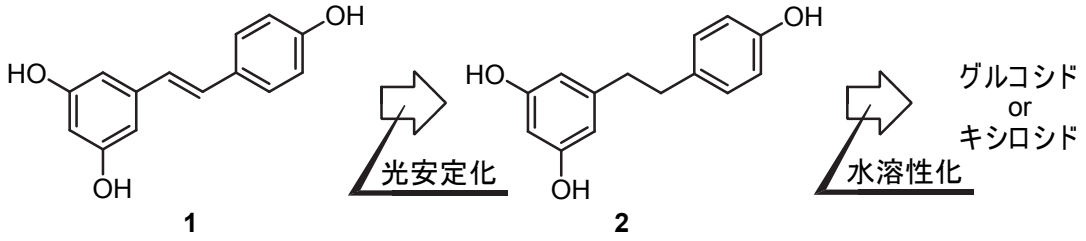
Chemical glycosylation of dihydroresveratrol and biological evaluation of their glycosides

○島田 亙[1,2]、横田 真理子[2]、二瓶 賢一[3]([1]農工大院連農、[2]コスモステクニカルセンター、[3]宇都宮大農)
○Wataru SHIMADA[1,2], Mariko YOKOTA[2], Ken-ichi NIHEI[3] ([1]Tokyo Univ.of Agric.and Technol., [2]NIKKOL GROUP COSMOS TECHNICAL CENTER.,LTD., [3]Utsunomiya Univ.)

【目的】

スチルベン骨格を有するレスベラトロール(**1**)は，ブドウ果皮などに含まれる抗酸化性ポリフェノールである．フレンチパラドックスおよび寿命延長効果との関連性のため，このポリフェノールは，近年，有用な生理活性天然物として注目を集めている．しかしながら，水に溶けにくく，かつ光によって容易に分解するため，その用途が著しく制限されている．例えば，**1** は健康補助食品の開発研究に盛んに使用されているが，皮膚に塗布し，長時間日光に曝すような条件で用いる化粧品の素材としては，ほとんど利用されていない．このように，**1** の水に対する溶解度の低さと不安定性は，解決すべき重要な課題である．

そこで本研究では，**1** の水溶性と光安定性の向上を図り，新しい化粧品の機能性成分をつくり出すことを目的に，誘導体の化学合成とメラニン形成阻害活性の評価を行った．



1 **2**

【結果および考察】

市販の **1** から，加圧下での水素添加反応によりジヒドロレスベラトロール(**2**)を得た(収率 92%)．得られた **2** は，日光照射下の条件において，**1** よりも高い光安定性を示した．次に，**2** の水溶性を高めるため，相間移動触媒を使用した二相系での配糖体化を検討した．ジエチルエーテルと NaOH 水溶液を用いて，**2** と糖供与体である 2,3,4,6-テトラ-O-アセチル-α-D-グルコピラノシルブロミドとの反応を行ったところ，配糖体化の後，脱アセチル化が速やかに進行し，ジヒドロレスベラトロールモノグルコシドが得られた．また，同様の条件下，キシロース供与体を用いた反応により，モノキシロシドが得られた．逆相 HPLC を用いた分析によって，それらの誘導体は **1** よりも早く溶出し，配糖体化による水溶性の向上が確認された．

現在，B16F0 メラノーマ細胞を用いて，それらの配糖体の生理活性評価を行っている．

dihydroresveratrol, glycosylation, B16F0 melanoma cells

講演番号：2E21p07
講演日時、会場：3 月 27 日 15:16～ E 校舎 21 会場

5-レゾルシノール型ロドデンドロール誘導体の化学合成と生理活性評価

Chemical synthesis and biological evaluation of rhododendrol derivatives having the 5-resorcinol motif

○岩舘 丈央[1]、島田 亙[1,2]、横田 真理子[2]、二瓶 賢一[1,3]([1]農工大院連農、[2]コスモステクニカルセンター、[3]宇都宮大農)

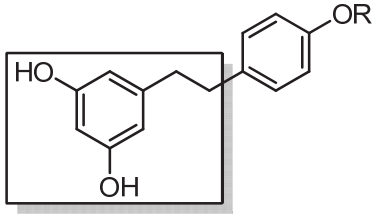
○Takehiro IWADATE[1], Wataru SHIMADA[1,2], Mariko YOKOTA[2], Ken-ichi Nihei[1,3] ([1]Tokyo Univ. Agric. and Technol., [2]Nikkol group Cosmos technical center Co., Ltd, [3]Utsunomiya Univ.)

【目的】

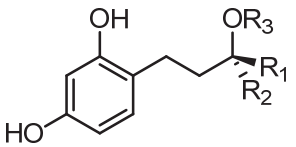
メラニンは外的傷害や紫外線から生体を保護するための高分子化合物である．一方で，皮膚における過剰なメラニン形成は色素沈着の原因となる．そのため，生体内においてはメラニン量を適切に調節することが望まれる．

当研究室では，このような色素沈着などを抑制する目的でビベンジル配糖体の化学合成と生理活性評価を行ってきた．その中で， 5-レゾルシノール構造を有する配糖体 **1** および **2** は，糖構造に依存して，メラニン形成を促進または抑制することが明らかになった[1]．しかしながら，その作用機序は未だ不明である．そこで以前，化学合成とチロシナーゼ阻害活性について報告したロドデンドロール誘導体 **3**-**6** に着目した[2]．

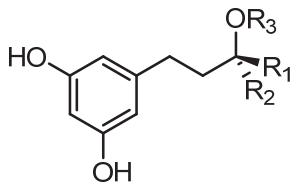
これらの誘導体は，アグリコン部分の立体化学によりチロシナーゼ阻害活性が2-3倍程度異なる．このように構造の僅かな違いにより，異なる生理活性を示す化合物群は，標的タンパク質や作用機序の解明に重要な情報をもたらす可能性が高い．本研究では，**3**-**6** の芳香環を 5-レゾルシノール構造へと進化させた **7**-**10** を化学合成し，メラニン形成に与える影響を評価することを目的とした．



1: R = Glc
2: R = Xyl



3: R_1 = Me, R_2 = H, R_3 = Glc
4: R_1 = H, R_2 = Me, R_3 = Glc
5: R_1 = Me, R_2 = H, R_3 = Xyl
6: R_1 = H, R_2 = Me, R_3 = Xyl



7: R_1 = Me, R_2 = H, R_3 = Glc
8: R_1 = H, R_2 = Me, R_3 = Glc
9: R_1 = Me, R_2 = H, R_3 = Xyl
10: R_1 = H, R_2 = Me, R_3 = Xyl

【結果】

グリコシド **7** および **8** は，アグリコンをラセミ体で合成し，配糖体化後エピマーを分割することで得られた．現在，キシロシド **9**, **10** の合成および生理活性評価を行っている．

1. Oode, C. et al. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *87*, 862-867.
2. Iwadate, T. et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24*, 122-125.

rhododendrol glycoside, resorcinol, melanin

講演番号：2E21p08
講演日時、会場：3 月 27 日 15:27～ E 校舎 21 会場

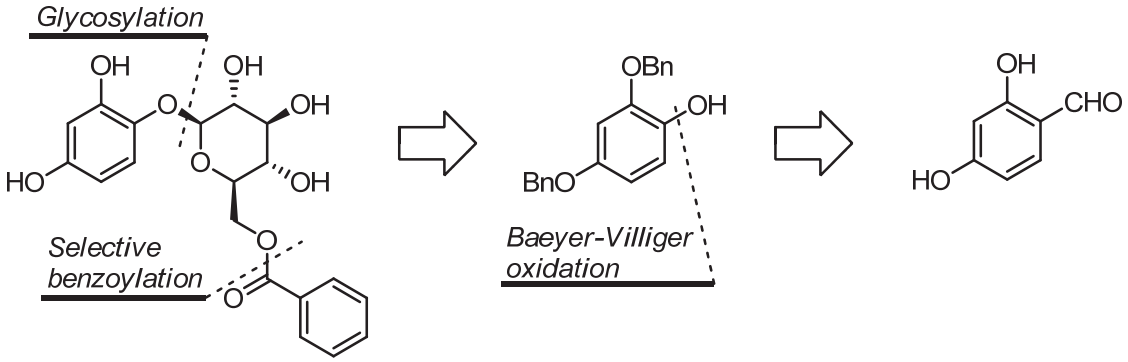
ヤマモガシ科植物由来のレゾルシノール配糖体およびその誘導体の有機合成と生理活性評価

Organic synthesis and biological evaluation of a proteaceous resorcinol glycoside and its derivatives

○松本 大志、中島 拓弥、二瓶 賢一（宇都宮大農）
○Takashi MATUMOTO, Takuya NAKAJIMA, Ken-ichi NIHEI (Utsunomiya Univ.)

【目的】

1999 年，アフリカのヤマモガシ科植物の *Protea neriifolia* から，レゾルシノール配糖体 **1** が単離・構造決定された．その生理活性に関する研究は，現在まで報告されていないが，その構造は代表的なチロシナーゼ阻害剤であるアルブチンと類似する．従って，**1** も同様の阻害活性を示すのではないかと予測される．そこで，Baeyer-Villiger 酸化とトリクロロアセトイミデート法を鍵反応として，**1** およびその誘導体を化学合成し，それらのチロシナーゼ阻害活性の評価を行うことを目的に，本研究を行った．



1

【結果および考察】

出発物質である 2,4-ジヒドロキシベンズアルデヒドの水酸基を保護し，得られたアルデヒドを用いて Baeyer-Villiger 酸化を行い，ベンゼントリオール誘導体を得た．市販の糖から誘導した糖ドナーを使用し，トリクロロアセトイミデート法により，得られたトリオールの配糖体化を行い，保護配糖体を合成した．この配糖体上のアセチル基を全て除去し，糖部分の 6 位に選択的に，ベンゾイル基を導入した．最後に，加水素分解によるベンジル基の除去を行い，天然物 **1** の化学合成を達成した．

また，本合成経路の中間体として比較的大量に得られた保護配糖体を脱保護し，得られたレゾルシノールグルコシドのチロシナーゼ阻害活性を評価した．その結果，アルブチンよりも強力な阻害活性を示すことが明らかになった．

Arbutin, Resorcinol, Glycosylation

講演番号：2E21p09
講演日時、会場：3 月 27 日 15:38～ E 校舎 21 会場

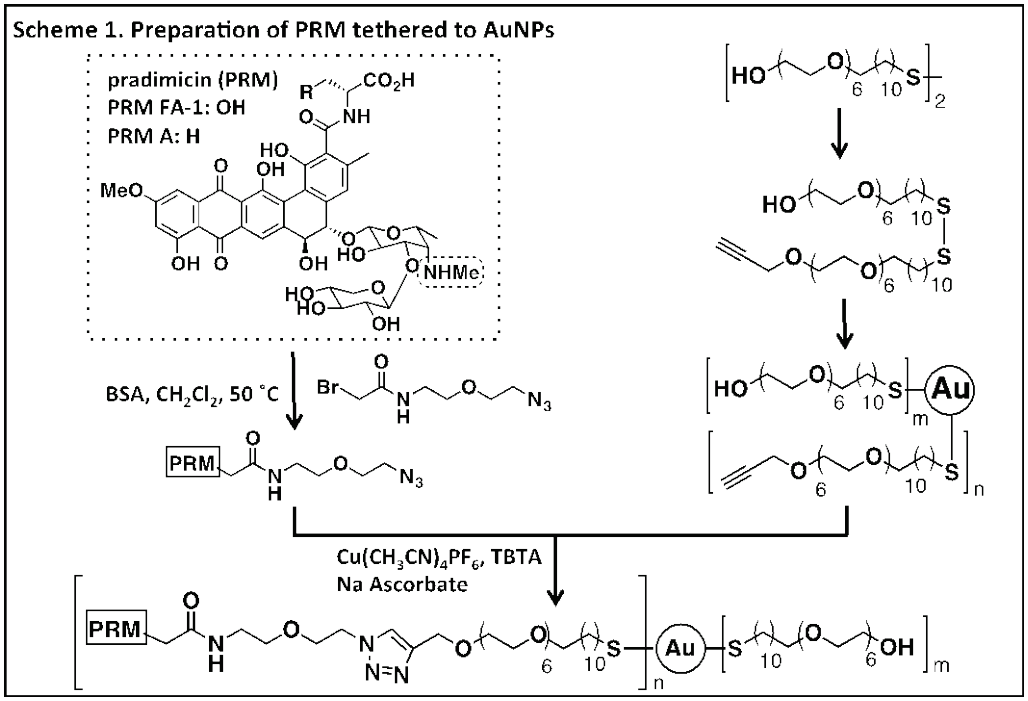
天然有機化合物 pradimicin を用いたマンノース認識金ナノ粒子の創成

Mannose recognition with pradimicin functionalized gold nanoparticles

○榎本 賢[1]、五十嵐 康弘[2]、佐々木 正秀[1]、清水 弘樹[1] ([1]産総研・生物プロセス研究部門、[2]富山県立大学)
○Masaru ENOMOTO[1], Yasuhiro IGARASHI[2], Masahide SASAKI[1], Hiroki SHIMIZU[1] ([1]AIST, [2]Toyama Prefectural Univ.)

研究背景）糖鎖は細胞間の識別に用いられる生体高分子であるが、その他の生体高分子と比較するとその解析技術が発達していない。本研究ではマンノース残基を認識する天然物 pradimicin (PRM) とナノテクノロジーの利用による簡便かつ高感度な解析法開発を目指して研究を行った。

方法・結果）PRM は二分子が Ca^{2+}を介してマンノースと結合すると考えられている。従って PRM を担持した金ナノ粒子を調製すれば、マンノース存在下で粒子が近接することになり分光学的にマンノースの検出や濃度決定が可能になると考えた。まず活性への影響が少ない PRM の二級アミノ基にリンカーを介してアジドを導入し、一方で金ナノ粒子リンカーの末端をアルキンへと変換した。これらを Huisgen 反応により結合させて PRM 担持金ナノ粒子の合成に成功した（Scheme 1）。これを緩衝液に溶解し、マンノースと塩化カルシウム溶液を滴下して紫外可視吸収スペクトルを測定すると、マンノース濃度の増加に応じて表面プラズモン共鳴ピークが赤方シフトし、粒子の近接が確認された。マンノースの滴下量から算出すると現在までのところマンノースの有無をμM オーダーで検出可能である。種々の糖を用いた添加実験を行った結果、本化合物は PRM そのものと同様にマンノースを特異的に認識可能であった。またマンノース残基を含む多糖を用いた添加実験の結果についても合わせて報告する。



gold nanoparticles, pradimicin, chemosensor

講演番号：2E21p10
講演日時、会場：3 月 27 日 15:49～ E 校舎 21 会場

下部ユニットをアセチル化したフラバン-3-オール 2 量体の合成と生物活性評価

Synthesis of lower-unit-acetylated dimeric flavan-3-ols and their biological activities.

○法島 太一[1]、濱田 義知[2]、中島 範行[3]、齊藤 安貴子[1,2] ([1]大阪電通大工・環境、[2]大阪電通大院工・先端、[3]富山県立大・工)
○Taichi HOJIMA[1], Yoshitomo HAMADA[2], Noriyuki NAKAJIMA[3], Akiko SAITO[1,2] ([1]Faculty of Engineering,OECU, [2]Graduate School of Engineering, , OECU, [3]Faculty of Engineering, TPU)

【目的】

高機能性化合物として知られ、様々な植物中に含まれるプロアントシアニジンは、Figure 1 に示したようなフラバン-3-オール類が重合した構造を持ち、植物中に多くの類縁体と共に存在している。近年、その高機能性から多くの活性発現機構に関する研究が進められているが、それぞれの化合物を純粋、かつ、大量に得ることが非常に難しく、その詳細は現在でも不明な部分が多い。我々は、(–)-エピカテキン (**1**) と (+)-カテキン (**2**) の 2 量体であるプロシアニジン B1 について詳細な構造-活性相関研究を行ったところ、下部ユニットの選択的アセチル化により、子宮頸ガン細胞 HeLa S3 に対する増殖抑制活性が大きく増強されることを見出した[1]。本大会では、(–)-エピガロカテキン (**3**)を構成単位に持つ 2 量体について検討を行ったので報告する。

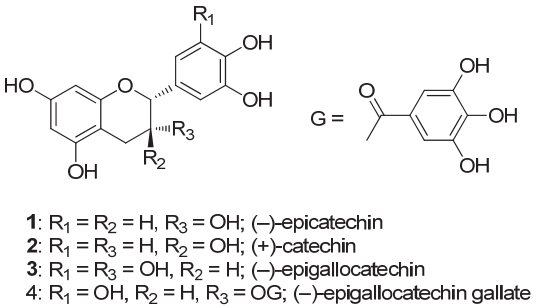
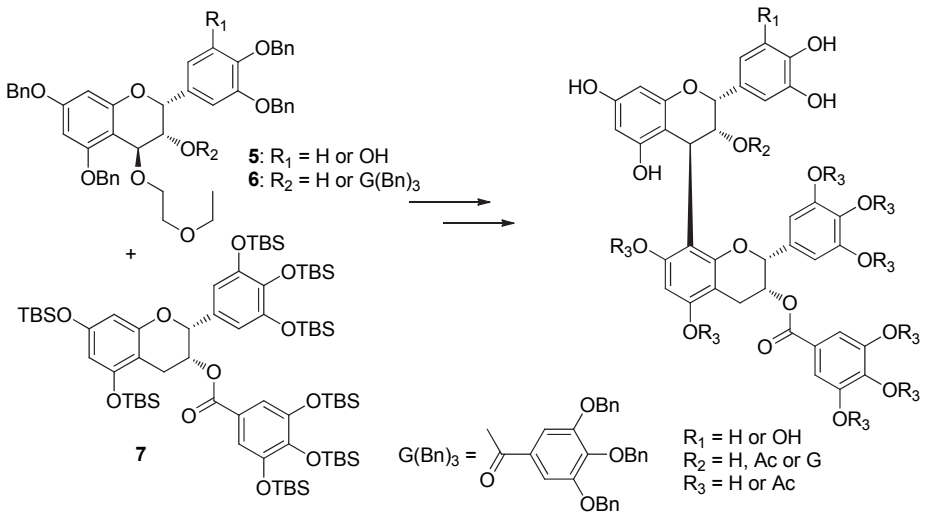


Figure 1. フラバン-3-オールの構造

【方法と目的】

1 及び **4** を出発原料とし、(–)-エピガロカテキン (**3**) を構成単位に持つ 2 量体、及び、そのアセチル化誘導体を合成した。現在、HeLa S3 細胞を用いた構造-活性相関研究を行っており、本大会ではその合成と活性の詳細を共に報告する。



Scheme 1. (–)-エピガロカテキンを構成単位に持つ 2 量体の合成

1. S. Okamoto, S. Ishihara, T. Okamoto, S. Doi, K. Harui, Y. Higashino, T. Kawasaki, N. Nakajima, A. Saito, *Molecules,***19**, 1775-1785, 2014.

Proanthocyanidins, inhibitory activity against cancer cell proliferation, structure-activity relationships synthesis

講演番号：2E21p11
講演日時、会場：3 月 27 日 16:10～ E 校舎 21 会場

プロアントシアニジンの構造-活性相関研究：上部ユニット B 環の水酸基の重要性
Structure-Activity Relationship study of proanthocyanidins: Importance of the hydroxyl groups on B-ring of the upper unit.

○濱田 義知[1]、綾野 義博[1]、小芦 貴弘[1]、伊藤 孝太郎[2]、徳永 将大[2]、高野 将太[2]、中島 範行[3]、齊藤 安貴子[1,2] ([1]大阪電通大院工、[2]大阪電通大工、[3]富山県立大工)
○ Yoshitomo HAMADA[1], Yoshihiro AYANO[1], Takahiro KOASHI[1], Kotaro ITO[2], Masahiro TOKUNAGA[2], Shota TAKANO[2], Noriyuki NAKAJIMA[3], Akiko SAITO[1,2] ([1]GSE・OECU, [2]OECU, [3]TPU)

【目的】

プロアントシアニジンは、フラバン-3-オールのオリゴマーであり、お茶やカカオといった嗜好品やブドウ等の果物類など、多くの植物に含まれる高機能性ポリフェノール化合物である。これらは極めて強い抗酸化活性・抗腫瘍活性など様々な生物活性を示す。しかし、天然からは複雑な類縁体化合物として得られ純粋に単離することが難しく、詳細な構造-活性相関研究や活性発現機構についてはほとんど解明されていない。昨年度の本大会では、2 量体 2～4 の化合物に強い子宮頸ガン細胞 HeLa S3 増殖阻害活性があり、その中でもフェノール性水酸基の数が少ない 2 の活性が一番強かったことを報告した。この結果により、活性発現には、フェノール性水酸基の数だけではなく他の要因があることが示唆された。本発表では、さらに様々な構造を持つ 2 量体を合成し構造-活性相関研究を行ったので報告する。

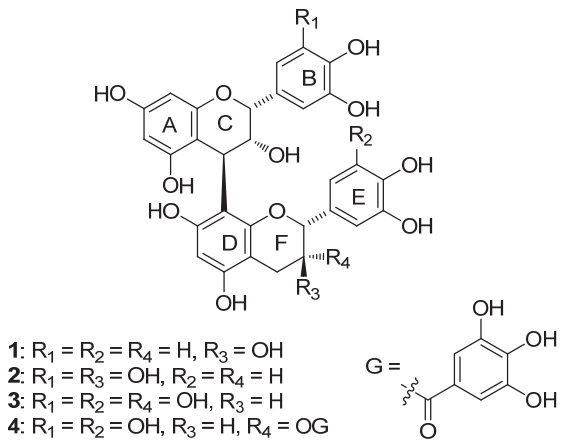


Figure 1. Structure of synthesized proanthocyanidins.

【方法と結果】

(+)-catechin (5)、(-)-epicatechin (6)、(-)-epigallocatechin (7)、(-)-epigallocatechin gallate (EGCG) (8)で構成される様々な 2 量体を合成し、活性評価を行った。DPPH ラジカル消去活性において、単量体である EGCG (8)と合成した 2 量体を比較したところ大きな差はなかった。一方で、HeLa S3 細胞増殖抑制活性、酵母に対する抗菌活性は、2 量体が EGCG (8)よりもはるか高く、DPPH ラジカル消去活性とは相関がみられないことが確認された。また、細胞増殖抑制活性や抗菌活性において、上部ユニットの B 環に水酸基を 3 つ有する場合は高い活性を示し、水酸基が 2 つの場合は著しい活性の低下がみられた。一方で、下部ユニットの E 環の水酸基の数は 2 つと 3 つでは活性に変化はなく、さらに F 環へのガロイル基(G)を導入も活性に影響を与えなかった。これらのことから、プロアントシアニジンの活性は、上部ユニットの水酸基の数によって影響を受ける可能性が示唆された。

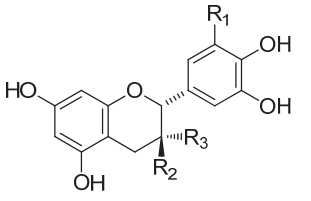


Figure 2. Structure of flavan-3-ols

Proanthocyanidin, structure-activity relationship, inhibition of cancer cells proliferation

講演番号：2E21p12
講演日時、会場：3 月 27 日 16:21～ E 校舎 21 会場

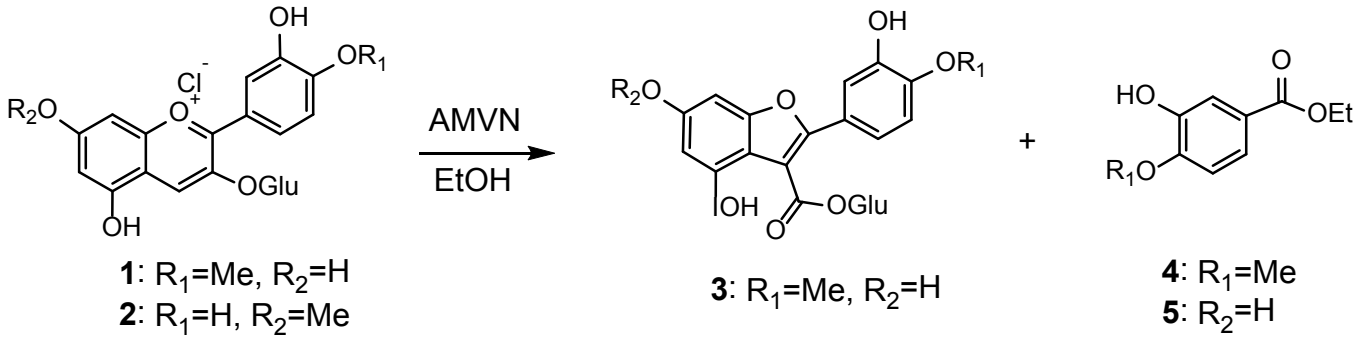
アントシアニン誘導体のラジカル酸化反応

radical reaction of anthocyanin derivative

○森 拓哉、神谷 春菜、柳瀬 笑子 (岐阜大学)
○Takuya MORI, Haruna KAMIYA, Emiko YANASE (Gifu Univ.)

【背景・目的】Anthocyanin 類はポリフェノールの一種であり、赤色から紫色を呈する色素成分として果物や花など自然界に多く分布し、食品中にも多く含まれる。また、強い抗酸化作用、抗ガン作用、抗炎症作用など様々な生理活性物質を有する事が注目されている。しかし、化学的に不安定であり、その反応性や反応機構に関する報告は少ない。我々はこれまでに Cyanidin 配糖体及び Delphinidin 配糖体を用いたラジカル酸化反応について詳細に検討し、その生成物の構造から反応機構を推定している [1,2]。本研究では推定反応機構の証明を目的として、各種誘導体を用いたラジカル反応を行った。

【方法・結果】推測した反応機構から Cyanidin の A 環の 7 位と B 環の 4'位の水酸基が反応に重要である事が推測された。そこで、Rutin の 7 位と 4'位の水酸基に Me 基を導入後、Zn による還元と空気酸化による 2 段階の反応 [3]を経て Cyanidin の 4'位 Me 体(**1**)と 7 位 Me 体(**2**)を合成した。これらを用いて EtOH 中において AMVN を用いたラジカル酸化反応を行ったところ、**1** からは **3**, **4** が得られたのに対して、**2** からはベンゾフラン骨格を持つ生成物は得られず **5** のみが得られる事が明らかとなった。以上の結果からベンゾフラン骨格を有するラジカル分解物の生成には A 環 7 位の水酸基の存在が必要不可欠である事が分かった。現在 Delpinidin 誘導体についても同様に行っており、合わせて報告する。



1: R_1=Me, R_2=H
2: R_1=H, R_2=Me

3: R_1=Me, R_2=H

4: R_1=Me
5: R_2=H

1)H. Kamiya, E. Yanase, S. Nakatsuka. *Food Chemistry*, 155, 221-226(2014).
2)長谷川他, 日本農芸化学会 2013 年度大会 4C25 a 04.
3)K. Oyama, S. Kawaguchi, K. Yoshida, T. Kondo. *Tetrahedoron Lett.*, 48, 6005-6009(2007).

Anthocyanin, radical reaction, AMVN

講演番号：2E21p13
講演日時、会場：3 月 27 日 16:32～ E 校舎 21 会場

ウーロンテアニン類の化学的合成

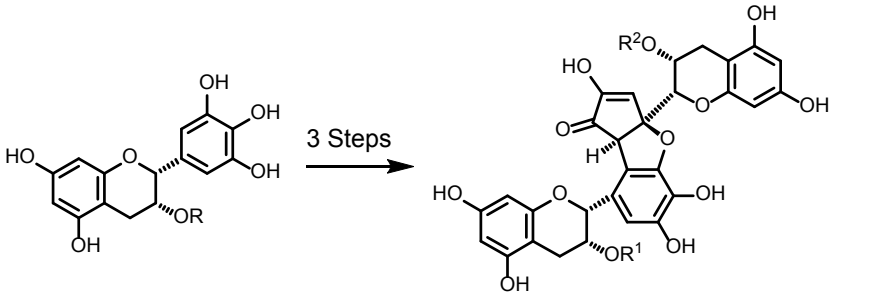
Chemical synthesis of oolongtheanins

○小川 和樹、廣瀬 紗弓、柳瀬 笑子 (岐阜大応用生物科学)
○Kazuki OGAWA, Sayumi HIROSE, Emiko YANASE (Gifu Univ.)

【目的】 カテキン類は茶葉に含まれる成分であり、抗酸化作用、抗ガン作用など様々な生理的機能を有している。茶葉中のカテキン類は紅茶やウーロン茶の製造過程における酸化・重合により特徴的な二量体やポリマー体を形成する。Oolongtheanin 類はウーロン茶に含まれる二量体であり、様々な生理的機能が期待されている。しかしながら、微量成分であるため詳細な研究は難しく、有機化学的合成法も確立されていない。当研究室ではこれまでに Oolongtheanin 類の生成機構について証明を行っている [1)]。そこで本研究では生成機構に基づいて、EGC(**1**)又は EGCg(**2**)から成るホモ二量体である **3,4** 及び **1** と **2** から成るヘテロ二量体である **5,6** の効率的合成を行った。

【方法・結果】 はじめにホモ二量体である **3,4** の合成を行った。**1** 又は **2** を原料として、$CuCl_2$ を用いた酸化、加熱、加水分解の 3 段階の反応より **3** を収率 40%、**4** を収率 39％で得た。

続いてヘテロ二量体である **5,6** の合成を行った。同量の **1** と **2** の混合物を上記と同様の条件で反応させたところ、**3～6** がおよそ同程度の比で得られた。一方、$CuCl_2$ 存在下における 1,2 の反応速度を比較すると、**1** の方が **2** よりもわずかに速い傾向がみられ、この結果から片方のヘテロ二量体が優先的に合成できる可能性が示唆された。条件検討の結果、dioxane と H_2O の混合溶媒で酸化反応を行った時、**3～6** がほぼ当量で生成された。他方、H_2O のみで酸化反応を行った時、**4,6** の生成は抑制され、**3,5** が優先的に生成されることが明らかになった。得られた各種 Oolongtheanin 類は分取 HPLC でそれぞれ単離し、NMR より構造決定を行った。



1 : R = H
2 : R = G

Oolongtheanins
3 : R^1=R^2=H, 4 : R^1=R^2=G
5 : R^1=G, R^2=H, 6 : R^1=H, R^2=G

1) Hirose, S.; Tomatsu, K.; Yanase, E. *Tetrahedron lett.* 2013, 54, 7040.

oolongtheanin, oolong tea, catechin

講演番号：2E21p14
講演日時、会場：3 月 27 日 16:43～ E 校舎 21 会場

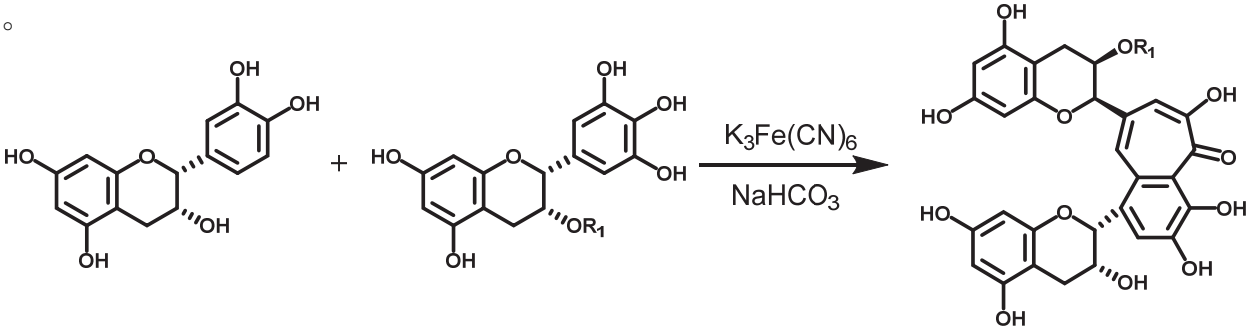
テアフラビン類の合成収率の改善

Chemical synthesis of Theaflavins

○内田 和宏、小川 和樹、柳瀬 笑子 (岐阜大応生)
○Kazuhiro UCHIDA, Kazuki OGAWA, Emiko YANASE (Gifu Univ.)

【目的】紅茶特有の紅色色素であるテアフラビン類は、紅茶を製造する際に茶の生葉中に含まれるカテキン類が酵素の働きで酸化的に縮重合することによって生成する。その構造はカテキン類の 2 量体で、カテキン類の B 環部が酸化的に縮合した 6 員環―7 員環からなるベンゾトロポロン骨格を持ち、出発物質であるカテキン類の組み合わせにより 4 種が知られている。これらの有機化学的合成法はいくつか報告されているが [1-3]、いずれも収率が低く効率的な合成法とはいえない。我々は、ベンゾトロポロン骨格の生成機構を明らかにしている [4]。本研究では、生成機構に基づいた反応条件の詳細な検討及び合成法の改良を行ったので報告する。

【方法・結果】ベンゾトロポロン環生成の開始段階は、酸化されたカテコールに対するピロガロールの求核付加反応である。そこで、EC (**1**)と EGC (**2**)のフェリシアン化カリウムによる酸化縮合反応において、添加する順番・その間隔について検討した結果、**1** を添加した一定時間後に **2** を添加することで Theaflavin (**4**) の収率が最大となった。また **1**, **2** の当量比を検討した結果、**1** を過剰に用いることにより、収率 78%で **4** を得ることに成功した。同様にして **1** と EGCg (**3**) を反応させたところ、目的の **5** 以外に複数の副生成物が得られた。そのうちの 1 つを分離し構造決定したところ、2 分子の **1** と **3** からなる 3 量体であることが明らかになった。そのほかの副生成物については、現在構造決定を行っている。



EC (**1**)　　EGC (**2**): R_1=H
EGCg (**3**): R_1=gallate　　**4**: R_1=H
5: R_1=gallate

1) Takino Y *et. al.*, *Agr. Biol. Chem.*, **28(1)**, 64-71 (1964)
2) Collier PD *et. al.*,, *Tetrahedron,* **29**, 125-142 (1973).
3) Kawabe Y *et. al.*, *Synlett*, **24(4)**, 479-482 (2013).
4) 柳瀬　等, 第48回天然有機化合物討論会講演要旨集, 607-61 (2006).

Theaflavins, Black tea, Catechin

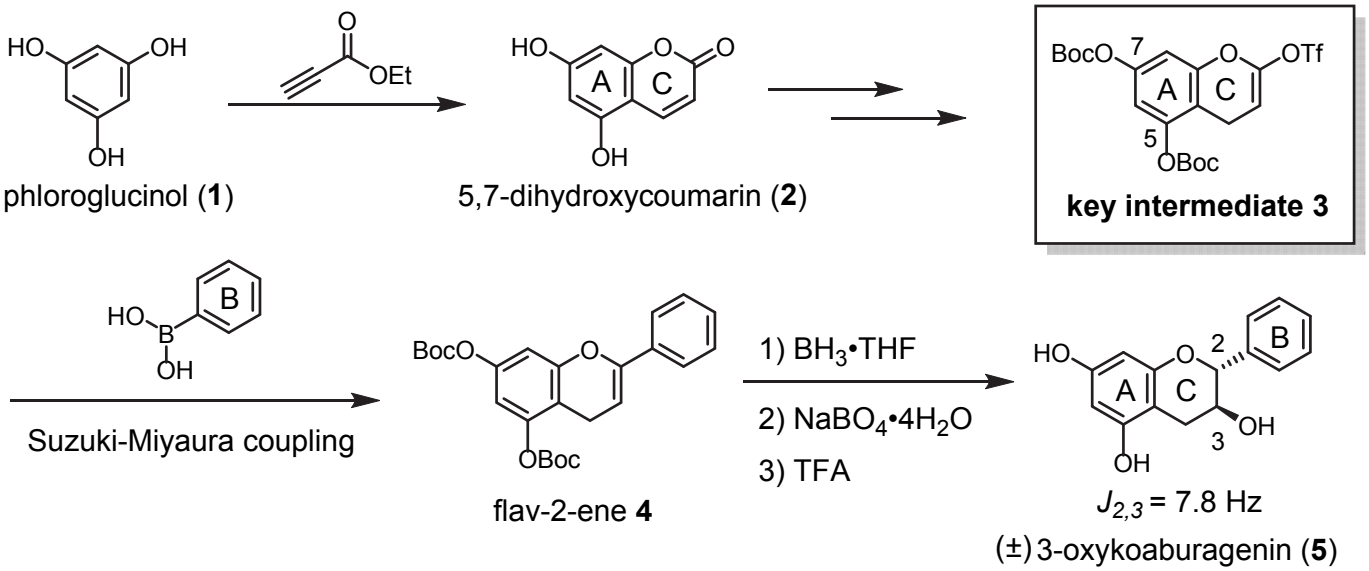
講演番号：2E21p15
講演日時、会場：3 月 27 日 16:54～ E 校舎 21 会場

クマリンを合成素子とした 3-oxykoaburagenin の全合成

Tatal Synthesis of 3-oxykoaburagenin Using Coumarin Derivative as a Building Block

○今井 祥平[1]、尾山 公一[2]、渡邊 紀之[1]、吉田 久美[1] ([1]名大院・情科、[2]名大・物国セ)
○Shohei IMAI[1], Kin-ichi OYAMA[2], Noriyuki WATANABE[1], Kumi YOSHIDA[1] ([1]Nagoya Univ., [2]RCMS. Nagoya Univ.)

【緒言・目的】カテキン類は、血糖値調節作用、抗酸化作用、抗がん、抗菌など様々な生理活性があり、機能性食品や製薬の分野で注目されている。しかし、天然からの入手は困難で、しかも構造が限られる。一方、従来の合成は、A 環と B 環の構築時にあらかじめ導入しておいた不斉点を足がかりに C 環を環化し合成する方法しか報告は無く、B 環の置換基を自在に変化させることが難しい上、C 環の立体制御の柔軟性も低い。本研究では、A、C 環を持つクマリン誘導体にカップリング反応を行ってB環を導入した後､最終段階でC環の立体選択的な置換基を導入する経路でカテキン類を合成した。
【方法・結果】フロログロシノール(**1**)から 5,7-ジヒドロキシクマリン(**2**)を合成した後、数段階を経て鍵中間体のトリフラート体 **3** を得た。5 位と 7 位の保護基は種々検討した結果、Boc 基が最もトリフラート体への変換効率が良かった。トリフラート体 **3** にフェニルボロン酸を用いて鈴木-宮浦カップリングを行ったところ、高収率でフラブ-2-エン **4** が得られた。**5** にハイドロボレーションと $NaBO_4$ による酸化反応を行ったところ、3 位への位置選択的ヒドロキシル化が進行し、2,3-トランス体が主生成物として得られた。さらに、TFA により Boc 基を脱保護して 3-oxykoaburagenin (**5**)の合成に成功した。現在、トリフラート体 **3** への様々なボロン酸を用いたカップリング反応と引き続くヒドロキシル化反応の一般性の向上を目指して検討を行っている。



3-oxykoaburagenin, flav-2-ene, flavan-3-ol

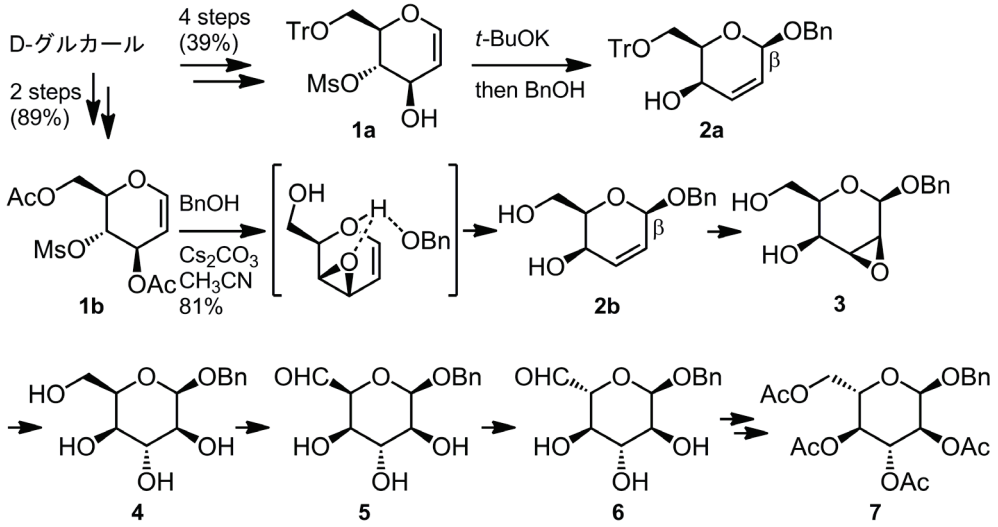
講演番号：2E21p16
講演日時、会場：3 月 27 日 17:15～ E 校舎 21 会場

グリカールに対するβ選択的 Ferrier 反応の開発とその応用

Development of beta-selective Ferrier reaction on glycal and its application

岡崎 隼人、植田 裕二、花屋 賢悟、庄司 満、○須貝 威（慶應大薬）
Hayato OKAZAKI, Yuji UEDA, Kengo HANAYA, Mitsuru SHOJI, ○Takeshi SUGAI (Keio Univ.)

酸性条件下グリカールにアルコールを作用させ 2,3-不飽和糖を与える Ferrier 反応は、杉山らにより広汎に条件・求核種等が検討された [1]。反応の立体化学はアノマー効果に支配され、α-体が優先的に生成する。ところが Crotti らは D-グルカールから 4 段階で調製した基質 **1a** に *t*-ブトキシカリウムを作用させた後、同一容器内でベンジルアルコールを加えるとβ-体 **2a** が生成するという珍しい例を報告した [2]。我々は独立に、基質 **1b** に、ベンジルオキシリチウムを作用させたところ、低収率ながら同様の反応が進行することを見出した。生成物 (**2b**) の立体化学は、X 線結晶構造解析により確定した [2]。基質 **1b** は、D-グルカールから酵素反応を含む 2 段階(89%)で調製でき、しかも生成物は 3,6-位とも遊離の形で得られるので、さまざまな保護基が導入できる点で有用である。対カチオンおよび溶媒等を中心に詳細に比較したところ、アセトニトリル中、炭酸セシウムを用いる条件が最適であった（81%、β-体のみ）。



このβ-選択的 Ferrier 反応を鍵段階とし、希少糖質である L-グルコースの合成を検討している。得られた **2b** を、遊離 4-位ヒドロキシ基を利用した立体選択的エポキシ化 (**3**)、位置選択的開環反応により、イドシド **4** へ変換した。得られた **4** の第一級アルコールを位置選択的に酸化、アルデヒド **5** とした後、シクロヘキシルアミンを作用させ、5-位をエピメリ化、L-糖 **6** へ誘導した。還元、アセチル化し、L-グルコースの 1-位ベンジル、2,3,4,6-位アセチル保護体 **7** の合成に成功した。我々の方法は、D-グルコースを出発原料として完全に炭素骨格を維持したまま、2,3,4,5-位の立体化学を全て反転させるという特徴を有している。1) T. Sugiyama, *et al*., *Biosci. Biotech. Biochem.* **1995**, *59*, 1921; 2) P. Crotti, *et al*., *Org. Lett*. **2002**, *4*, 3695; 3) S. Ohba, *et al*., *Acta Cryst*. **2013**, *E69*, o1811.

glycal, rearrangement, rare sugar

講演番号：2E21p17
講演日時、会場：3 月 27 日 17:26～ E 校舎 21 会場

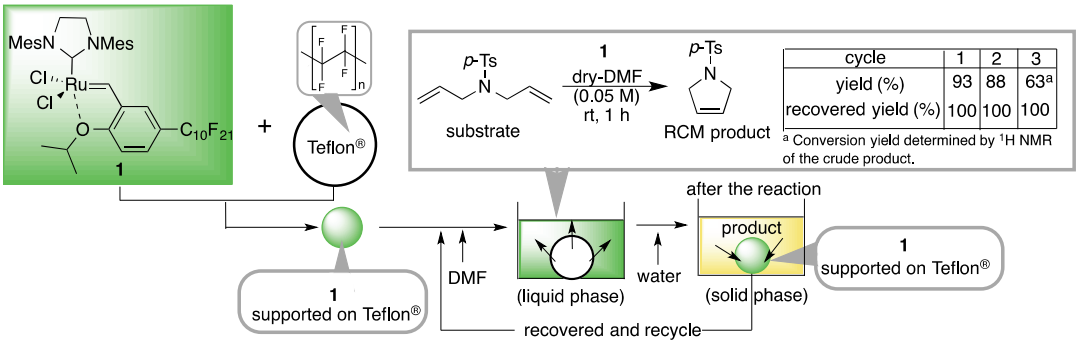
固相-液相間を移動するテフロン担持型ミディアムフルオラスメタセシス触媒の開発

Development of solid phase-liquid phase transfer catalyst using medium fluorous metathesis catalyst supported on Teflon® powder

○杉山 祐也、小林 佑基、犬飼 紗絵、濱本 博三、塩入 孝之、松儀 真人（名城大農）
○Yuya SUGIYAMA, Yuki KOBAYASHI, Sae INUKAI, Hiromi HAMAMOTO, Takayuki SHIOIRI, Masato MATSUGI (Meijo Univ.)

[目的]これまでに当研究室では、Grubbs-Hoveyda 2nd generation のリガンド部位に C_8F_{17} タグを組み込むことにより、高活性で回収可能なライトフルオラス Grubbs-Hoveyda 触媒の開発に成功している。[1)] 今回我々は、Grubbs-Hoveyda 2nd generation にミディアムフルオラスタグ ($C_{10}F_{21}$ タグ) を組み込んだ新規フルオラスメタセシス触媒を合成し、固相-液相間を移動する触媒反応系の構築を目的とし研究を展開した。分子中にミディアムフルオラスタグを導入すれば、溶媒の疎水性変化により当該分子の溶解度制御が可能になることを我々は既に報告している。[2)] ミディアムフルオラス分子の本特性を触媒の物性制御に利用することで、反応時には触媒が液相に存在するが、精製時には固相となり、ろ過操作のみで触媒を回収できる反応系が可能になると考えた。そこで、$C_{10}F_{21}$ タグを有するミディアムフルオラス触媒を合成するとともに、本触媒を用いる簡易触媒反応系の検討を試みた。

[実験と結果]$C_{10}F_{21}$ タグを有するミディアムフルオラス触媒 **1** は、当研究室で開発した芳香環炭素上へのラジカル的パーフルオロアルキル化反応を鍵反応とした 4 段階合成ルートにて合成した。[1)]触媒 **1** が、反応媒体の疎水性の調節により固相（テフロン）-液相間の移動が可能か精査した結果、反応媒体として DMF を用いれば、テフロン®に担持させた固相触媒 **1** は、系内への水の添加により液相-固相（テフロン） 間を自由に移動する相間移動能を獲得することがわかった。そこで実際に、ジアリルトシルアミンの閉環メタセシス (RCM) 反応を試みた (下図) 。DMF 中、触媒 **1** は速やかに溶解し、本 RCM 反応は均一反応系として首尾良く進行した。一方、反応終了後には反応系への水の添加により触媒 **1** は速やかにテフロンに吸着し、固相触媒として、ろ過操作で簡便に回収できた。回収した触媒 **1** は、続けて 3 回まで当該反応に利用可能であった。



References 1) Matsugi, M. *et al*. *J. Org. Chem*. **2010**, *75*, 7905; 2) Matsugi, M. *et al*. *Tetrahedron* **2012**, *68*, 3885.

medium fluorous strategy, phase transfer catalyst, Teflon[M.R.]

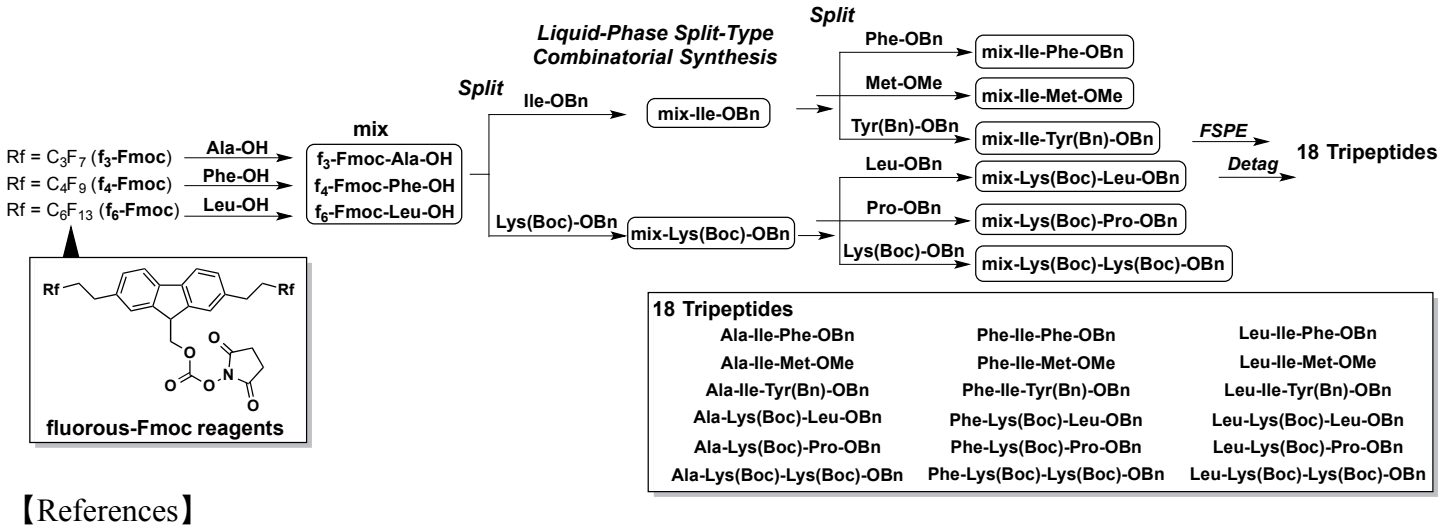
講演番号：2E21p18
講演日時、会場：3 月 27 日 17:37～ E 校舎 21 会場

フルオラス Fmoc 保護を基点とするトリペプチドのミクスチャー合成とそれらの ACE 阻害活性
Mixture synthesis of tripeptides based on fluorous-Fmoc protection and their ACE inhibitory activity

○遠藤 菜月、杉山 祐也、渡辺 量子、濱本 博三、塩入 孝之、松儀 真人 (名城大農)
○Natsuki ENDO, Yuya SUGIYAMA, Tomoko WATANABE, Hiromi HAMAMOTO, Takayuki SHIOIRI, Masato MATSUGI (Meijo Univ.)

含フッ素化合物はフッ素含有量の違いに基づき、Fluorous Solid Phase Extraction (FSPE) [1] により簡便に分離できる。本特性を利用して、当研究室では、様々なフッ素含有量を有するフルオラス Fmoc 試薬 (f-Fmoc 試薬) [2] にてアミノ酸を保護した後、スプリット合成を経て、ペプチド類の液相コンビナトリアル合成が可能になることを既に見出しており、昨年度までに 18 種類のトリペプチドのミクスチャー合成を報告した [3]。今回、演者は、新たに 18 種類のトリペプチドをモデル基質とした液相ミクスチャー合成をおこなった。

まず、C_3F_7, C_4F_9, C_6F_{13} タグを有する f-Fmoc 試薬を用いてそれぞれ異なるアミノ酸を保護し、これら保護体を混合した後、2 つのグループに分け、各種アミノ酸と縮合することでジペプチド体の化合物ライブラリを得た。続くベンジル基の脱保護を経て、得られた脱保護体をそれぞれ 3 つに分け、様々なアミノ酸と縮合をおこない、トリペプチドの化合物ライブラリを 6 種類合成した。合成したライブラリを、FSPE により分離し、各トリペプチド体を単一で得た。最後に、f-Fmoc 基を脱保護し、18 種類のトリペプチドを構造決定を伴って一挙に合成することができた。今回の発表では、これまでに合成したトリペプチドの ACE 阻害活性試験の結果も併せて報告する。



【References】
1) Matsugi, M. In *Fluorous Chemistry*; Otera, J., Eds.; CMC Publishing, 2005; p 43.
2) Matsugi, M. et al. *QSAR Comb. Sci.* **2006**, *25*, 713. 3) Matsugi, M. et al. *Synlett*. **2013**, *24*, 2701.

fluorous Fmoc reagents, ACE inhibitor peptides, Mixture synthesis

講演番号：2E21p19
講演日時、会場：3 月 27 日 17:48～ E 校舎 21 会場

昆虫麻痺活性を示す環状ペプチド PF1171 類の全合成と三次元構造解析

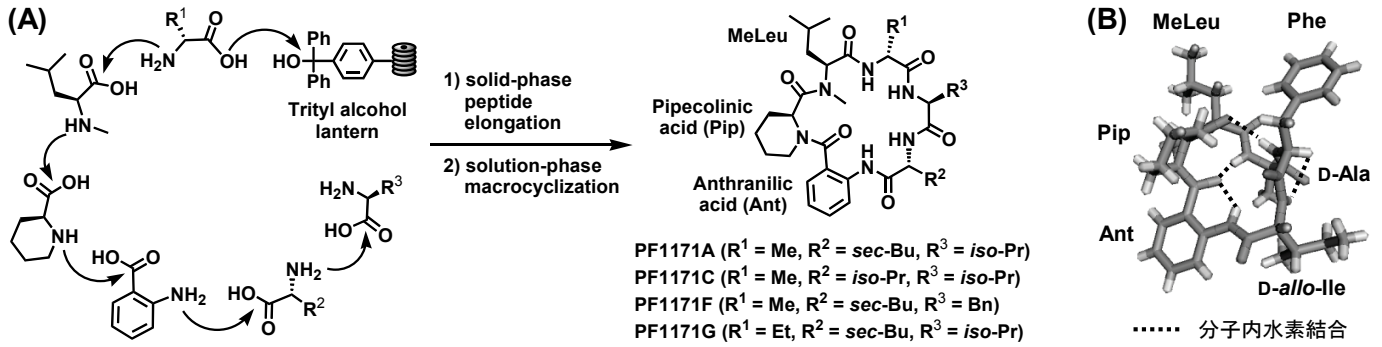
Total synthesis and 3D structural analysis of PF1171A, C, F, and G, cyclic hexapeptides with insecticidal activity

○増田 裕一[1]、田中 錬[1]、甲斐 健次[2]、Ganesan A.[3]、土井 隆行[1] ([1]東北大薬、[2]大阪府大生命、[3]イースト・アングリア大学)

○Yuichi MASUDA[1], Ren TANAKA[1], Kenji KAI[2], A. GANESAN[3], Takayuki DOI[1] ([1]Tohoku Univ., [2]Osaka Prefecture Univ., [3]University of East Anglia)

【背景と目的】PF1171 類（図 A）は，子嚢菌 OK-128 株がオカラ培地で生産する環状ペプチドであり，アントラニル酸やピペコリン酸などの特殊なアミノ酸を含有している．PF1171 類はカイコに対して経口投与で麻痺を引き起こし[1,2]，ヒト培養細胞では悪玉コレステロールの核となるアポリポタンパク質 B の産生を抑制する[3]ことから，その活性発現機構に興味が持たれる．本研究では，誘導体合成を指向して，PF1171 類の固相法を用いた全合成を行った．

【方法と結果】スプリット＆ミックス合成が容易なブロック状固相担体の Lantern を用い，ペプチド鎖の伸長を Fmoc 法により行った（図 A）．固相から切り出した後，鎖状ペプチドを液相で環化することで，PF1171A, C, F, G の初の全合成を達成した．合成した PF1171 類をカイコの 4 令幼虫に投与したところ，顕著な麻痺活性を示し，その活性の強さは天然物と同程度であることを確認した．さらに，PF1171F の単結晶の X 線結晶構造解析を行った結果，4 つの分子内水素結合の存在が確認され（図 B），これらがコンホメーションの維持に重要な役割を果たしていることが示唆された[4]．



図．(A) PF1171 類の固相法を用いた全合成．(B) PF1171F の結晶構造．

【引用文献】

1. Umagome, K.; Nagase, K.; Harimaya, K.; Nakayama, F.; Yaguchi, T.; Sato, E.; Hoshiko, S.; Kamito, N.; Soneda, T.; Hachisu, M. Japan patent 11021297, **1999**.
2. Kai, K.; Yoshikawa, H.; Kuo, Y, H.; Akiyama, K.; Hayashi, H. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2010**, *74*, 1309.
3. Kuo, Y, H.; Kai, K.; Akiyama, K.; Hayashi, H. *Tetrahedron Lett.* **2012**, *53*, 429.
4. Masuda, Y.; Tanaka, R.; Kai, K.; Ganesan, A. Doi, T. *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 7844.

cyclic peptide, solid-phase synthesis, conformation

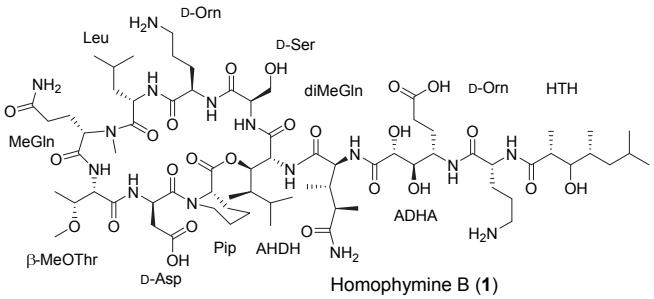
講演番号：2E21p20
講演日時、会場：3 月 27 日 17:59～ E 校舎 21 会場

海洋ペプチド homophymine B の合成研究：直鎖部に含まれる異常アミノ酸の合成

Synthetic study on homophymine B：Synthesis of ADHA, diMeGln and HTH derivatives

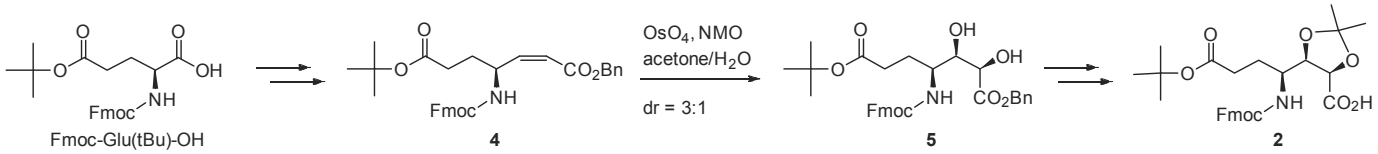
○東海林 由憲、吉野 諒、今野 博行（山形大院理工）
○Yoshinori TOKAIRIN, Ryo YOSHINO, Hiroyuki KONNO (Yamagata Univ.)

〈目的〉 海洋天然物として得られる環状デプシペプチド類は、幅広い生物活性と興味深い骨格構造を有している。2009 年に単離された homophymine B (**1**)はヒト免疫細胞上のケモカインレセプター CCR5 と相互作用することで、HIV ウイルスの侵入を防ぐと考えられている。本天然物は多くの異常アミノ酸を含み、その構造はデプシ結合を有した環状部と *N* 末端にアシルユニットが縮合した直鎖部分から構成されている。また、その全合成は達成されていない。我々は構造活性相関研究へ向けた homophymine B の全合成を目指している。

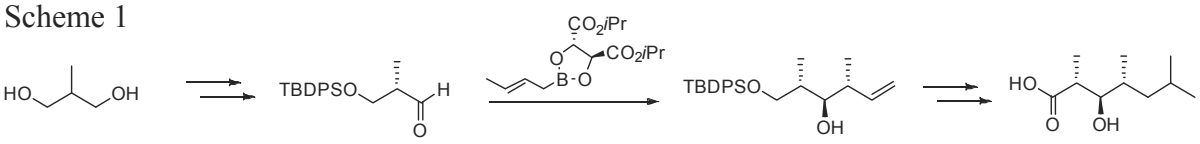


Homophymine B (**1**)

〈方法と結果〉 今回、直鎖部分を構成する異常アミノ酸である (2*R*,3*R*,4*S*)-4-amino-2,3-dihydroxyheptan-1,7-dioic acid (ADHA)の固相合成を見据えた誘導体 Fmoc-ADHA(acetonide, *t*Bu)-OH (**2**)、およびアシルユニット(2*R*,3*R*,4*R*)-3-hydroxy-2,4,6-trimethylheptanoic acid (HTH, **3**) の合成について報告する。まず、**2** は Fmoc-Glu(*t*Bu)-OH を出発原料に合成を検討した(Scheme 1)。福山還元を用いてアミノアルデヒドを調製し、*Z* 選択的ホーナーエモンズ反応により *Z* オレフィン(**4**)を合成した。次の OsO_4 を触媒としたジヒドロキシル化は 3:1 のジアステレオマー比で望む化合物(**5**)を与えた。さらに保護基の着脱により **2** の合成に成功した。HTH(**3**)はメソジオール体(**6**)を出発原料に合成を行った(Scheme 2)。まず、酵素による非対称化と Roush クロチル化を行い 3 つの立体中心を制御した **8** を構築した。その後、オゾン酸化や Wittig 反応を含む数工程の変換により目的の **3** を得ることができた。(2*S*,3*S*,4*R*)-3,4-dimethyl glutamine (diMeGln)の合成も合わせて報告する。



Scheme 1



Scheme 2

CCR5 inhibitor, cyclic depsi peptide, unusual amino acid

講演番号：2E23a03
講演日時、会場：3 月 27 日 09:22～ E 校舎 23 会場

フジヤスデ *Anaulaciulus* sp に存在する 2-alkanone 類の同定
Identification of 2-alkanones from Jurid millipedes *Anaulaciulus* sp.
○桑原 保正[1,2]、田辺 力[3]、浅野 泰久[1,2] ([1]富山県大工・生工研セ、[2]JST, ERATO、[3]熊本大・教育)
○Yasumasa Kuwahara[1,2], Tsutomu Tanabe[3], Yasuhisa Asano[1,2] ([1]Toyama Pref. Univ., Biotech. Res. Center & Dept. Biotech., [2]JST, ERATO, [3]Kumamoto Univ., Educ.)

〔目的〕フジヤスデ*Anaulaciulus* sp.(Julida: Julidae)の溶媒抽出物には防御物質として一般的な2-methyl-1,4-benzoquinoneと2-methoxy-3-methyl-1,4-benzoquinoneを主要成分とするキノン類以外に、n-hexyl laurate及びその他14種の脂肪酸エステルで構成されるワックス成分が存在した(Shimizu N et al, 2012, J. Chem. Ecol.)。このワックスの由来を調べるため、虫体を二分し、防御分泌腺の存在しない頭部と残りの部分から、それぞれ抽出物を調製した。成分を精査し、頭部にさらに2-アルカノン類の存在を見つけた。これらのプロフィールをフジヤスデ３種（A, B, C）で精査する。
〔材料及び方法〕(A) 県大構内及び公園、(B)近隣の別の公園及び(C)白馬高原で採集した同種あるいは近縁種を、腐植を飼料に飼育した。ヤスデには特定の体節毎に左右一対の防御分泌腺があり、実体顕微鏡で観察できる。頭部及び、頭部から切断する体節を変えて、ヘキサン抽出物（３分間浸漬）を調製し、GC/MS｛(5975 Inert XL; Agilent, at 70 eV), HP-5MS capillary column (0.25 mm x 30 m, 膜厚0.25 μm),He；1.00 ml/min, 温度 60-290° C, 10° C/min｝で分析した。
〔結果及び考察〕 防御物質のキノン類はA, B, C 共に存在し、同一組成であったが、A からは既報の n-hexyl laurate を主成分とするワックス成分を再確認した。一方 B のワックス成分は n-octanol のエステルで構成され、C にワックスは存在しないという結果を得た。またワックスは防御分泌腺のない頭部にも存在することから、体表全体に分布する成分と結論した。一方切断した頭部由来の抽出物は、A, B, C それぞれでプロフィールはことなるものの、奇数鎖を含む特異な高級直鎖メチルケトン類（2-alkanones, C_{17}- C_{21}）を特徴的に検出した。その他奇数鎖を含む高級直鎖脂肪族アルデヒド類（C_{15}- C_{18}）や高級直鎖脂肪酸メチル（C_{15}- C_{18}）が含まれ、その構造は標品あるいは合成表品との比較により同定した。
A は,京都市、亀岡市の種と同種と判断されたが、 B は A と地理的に隣接して分布し、生物学的な検討が待たれる。また頭部の 2-alkanone 類は、ヤスデ全体の抽出物中にも微量存在し、検出できるが、ヤスデの成分としての報告はない。消化器官中で何かの機能を有する唾液腺成分で、Julida 以外のヤスデにもその存在を推定している。2-alkanone 類はヤスデ以外では、ほ乳動物齧歯類の腹部腺(Burger BV et al, 2001, J. Chem. Ecol.)及び昆虫の表皮リピッド(Espelie and Payne, 1991, Biochem. Syst. Ecol.）の微量成分として、知られている。

2-methylketones from Jurid millipede *Anaulaciulus* sp., 2-alkanones from Jurid millipedes, alkyl alkanoates from millipedes

講演番号：2E23a04
講演日時、会場：3 月 27 日 09:33～ E 校舎 23 会場

クサギカメムシ採餌行動解発因子の同定と触角内におけるその分解

Identification of the foraging stimulant of *Halyomorpha halys*, and its degradation in the antenna

○野下 浩二、田母神 繁（秋田県大・生資科）
○Koji NOGE, Shigeru TAMOGAMI (Akita Pref. Univ.)

【目的】昆虫は匂いや味など様々な物質を手掛かりに好適な餌を探索し，摂食する．このような昆虫の行動を規定する化学因子を特定することは，昆虫の生理生態をよく知るばかりか，昆虫の採餌行動を逆手に取った害虫防除の開発にも繋がると期待できる．クサギカメムシ *Halyomorpha halys* は，豆類や果樹などの農業害虫，また家屋へ侵入する衛生害虫として知られる．本カメムシに，飼育条件下で餌として生ピーナッツを与えると，ほどなくその新鮮なピーナッツに近寄り，吸汁し始めることがしばしば観察される．薄皮のついたピーナッツは，吸汁前後で外見に大きな差異が生じないものの，カメムシが既に吸汁されたピーナッツに執着することは少なく，視覚刺激以外の要因によりカメムシは採餌行動を開始すると予想できる．そこで，新鮮な餌の匂いに着目し，匂いに対するカメムシの反応を指標に，クサギカメムシの採餌行動解発因子の同定を試みた．カメムシに受容された匂いの情報は, 採餌行動を引き起こす一方で, ひとたび餌を得た後, 何らかの形で不活性化されると考えられる．そこで，クサギカメムシ触覚内において匂い分解に関わる酵素の探索も試みた．

【方法と結果・考察】T 字型のアッセイチューブを用いた選好試験の結果，クサギカメムシが新鮮なピーナッツに誘引されることが明らかとなった．次に，新鮮なピーナッツと既に吸汁されたピーナッツの匂い成分を GC–MS で分析・比較したところ，新鮮なピーナッツに特異的な成分として hexanal が検出された．同様の選好試験で，hexanal に誘引活性が確認され，同時に頻繁に口吻を伸ばす行動が新たに観察された．口吻伸展は，餌に接近したカメムシが餌を食べようとする行動であり，採餌行動の重要なプロセスと位置付けられる．カメムシが口吻を伸ばす回数と時間から口吻伸展活性を評価した結果，hexanal に顕著な活性が認められた．以上のことから，新鮮なピーナッツから見出した hexanal を，餌への接近と摂食開始を誘起する採餌行動解発因子と結論した．Hexanal はピーナッツの他，リンゴの香気など多くの植物の匂いとして知られ，広範な植物を加害するクサギカメムシの食性を説明する一因と言える．また，今後，hexanal を利用してベイト剤の開発も期待できるだろう．一方，カメムシ触角内において hexanal を代謝する酵素活性を調べた結果，NAD^+ ないしは $NADP^+$ を補酵素として，hexanal を酸化するアルデヒドデヒドロゲナーゼ (ALDH) が 1 種存在することを活性染色により見出した．触角内で hexanal の還元に相当する反応は認められず，本 ALDH による酸化反応が hexanal の不活化の主要因と考えられる．この ALDH は，(*E*)-2-decenal も酸化できることから，比較的基質特異性の低い匂い分解酵素であることが示唆される．

plant volatile, hexanal, aldehyde dehydrogenase

講演番号：2E23a05
講演日時、会場：3 月 27 日 09:44～ E 校舎 23 会場

アワダチソウグンバイの性フェロモンの由来とセイタカアワダチソウ揮発成分の若虫に対する誘引活性

Origin of the sex pheromone in chrysanthemum lace bug, *Corythucha marmorata* and the attraction activity of the volatile component of *Solidago altissima* for nymph

○渡邊 綺咲、清水 伸泰（京都学園大バイオ環境）
○kisaki watanabe, nobuhiro shimizu (Kyoto Gakuen Univ.)

【背景と目的】アワダチソウグンバイ *Corythucha marmorata* は、キク科植物のセイタカアワダチソウ，ヒマワリ，キク等を食害することで知られている北米原産の侵入害虫である．若虫は特徴的に集団を形成して吸汁する行動が観察できる．昨年度本大会では，成虫の雌雄が共に分泌する borneol に対して，雄の交尾行動を活発化させる性フェロモン活性を認めたことを報告した [1)]．そこで食草であるセイタカアワダチソウの葉に含まれる揮発成分を分析したところ bornyl acetate を認めたことから，性フェロモンが食草由来かどうか立体構造を指標に検討を行った．また予備試験により，グンバイ若虫が食草の揮発成分に誘引される現象を認めたことから，活性物質を特定することに加え，集団を形成する化学的要因を推察した．

【方法と結果】セイタカアワダチソウの葉を水蒸気蒸留して得られた精油成分をガスクロマトグラフ質量分析計（GC-MS）で分析したところ，主要成分として bornyl acetate，limonene，germacrene D を検出した. 酢酸エチルとヘキサンを溶媒としてカラムクロマトグラフィーで精製を行い, bornyl acetate は 10%酢酸エチル画分に溶出された．標品のラセミ体は GC のキラルカラムで分離しなかったため，borneol に加水分解して分析を行った．その結果，グンバイ由来のものと植物由来のものとで絶対立体配置が異なっていることが判明した．すなわちグンバイは，植物由来の bornyl acetate を加水分解して性フェロモンとして利用しているのではなく，植物とは立体配置の異なる borneol を生合成していることが示唆された．一方，グンバイ若虫の集合を誘起する化学因子を探索する上で，ビデオカメラを利用して集合行動を詳細に観察した．セイタカアワダチソウの葉の揮発成分が若虫の誘引に重要な役割を果たしていると推察し，定量的な誘引活性の評価を行った．その結果，葉の揮発成分は顕著な活性を示したが，集団を形成するためには他の何らかの要因，例えば若虫の体表成分なども考慮して検証する必要がある．

1）渡邊ら，日本農芸化学会 2014 年度大会，3A06p05

sex pheromone, *Corythucha marmorata*, aggregation behavior

講演番号：2E23a06
講演日時、会場：3 月 27 日 10:05～ E 校舎 23 会場

ヒロヘリアオイラガ幼虫分泌液由来の TRPV1 活性物質の探索

Search for TRPV1 activated substance from slugcaterpillar (*Parasa lepida*) venoms

○平川 祥成、水谷 祐輔、野呂 真奈美、今井 邦雄、勝崎 裕隆 (三重大院生資)
○ yoshinari HIRAKAWA, yusuke MIZUTANI, manami NORO, kunio IMAI, hirotaka KATSUZAKI (Mie Univ.)

【目的】

ヒロヘリアオイラガ（*Parasa lepida*）はチョウ目イラガ科の昆虫であり、幼虫には多数の棘が存在する。この棘に刺されると激しい痛みが生じる。動物由来の毒によって引き起こされる痛みの症状には、細胞に存在するイオンチャネルの活性化が関連している。それらチャネルにおいて近年痛みとの密な関係を示唆されているのが transient receptor potential vanilloid receptor (TRPV1) である。そこで TRPV1 を発現させた HEK-293 細胞を用いて細胞内 Ca^{2+} イメージングを行うことでヒロヘリアオイラガ分泌液に含まれる活性物質の探索を試みた。

【方法】

100μl の超純水を入れたスピッツ管に 1 本あたり 20 匹分のヒロヘリアオイラガの分泌液を採取した。こちらをヒロヘリアオイラガ試料溶液とした。

TRPV1 を発現した HEK-293 細胞を 96 マルチウェルプレートにて培養し、細胞内に蛍光試薬 Fluo4-AM を導入した。そこに、コントロールとして超純水、ポジティブコントロールとして 0.1 mg/mL 乳化カプサイシン溶液、各種試料として、ヒロヘリアオイラガ試料溶液 10 倍希釈、100 倍希釈、1000 倍希釈を添加し、蛍光顕微鏡にて細胞内 Ca^{2+}イメージングを行った。

次に、ヒロヘリアオイラガ試料溶液を RP-HPLC のグラジエント溶出でピークごとに分取を行った。保持時間 80min～140min の主要ピークを先ほどの細胞内 Ca^{2+}イメージングに供した。活性画分は Tricine-SDS-PAGE 分析を行った。

【結果】

ポジティブコントロールである 0.1 mg/mL 乳化カプサイシン溶液とヒロヘリアオイラガ試料溶液 10 倍希釈、100 倍希釈に蛍光強度の上昇が観察された。

ヒロヘリアオイラガ試料溶液を RP-HPLC のグラジエント溶出でピークごとに分取を行い、計 84 画分に分けた。保持時間 80 min～140 min の主要ピークを細胞内 Ca^{2+}イメージングに供したところ、画分 47、48、49、50、61、63 に蛍光強度の上昇が観察された。また、活性画分の Tricine-SDS-PAGE 分析の結果、画分 47、48、49、50、61、63 は分子量 3000 程度のペプチドであると示唆された。

TRPV1, Ca2+, venom

講演番号：2E23a07
講演日時、会場：3 月 27 日 10:16～ E 校舎 23 会場

ヒロヘリアオイラガ幼虫由来 Iratin Pll-2 のジスルフィド結合解析

Disulfide mapping of Iratin Pll-2 from *Parasa lepida* venom

○野呂 真奈美、平川 祥成、西尾 昌洋、今井 邦雄、勝崎 裕隆（三重大院生資）
○ Manami NORO, Yoshinari HIRAKAWA, Masahiro NISHIO, Kunio IMAI, Hirotaka KATSUZAKI (Mie Univ.)

＜背景・目的＞

ヒロヘリアオイラガ(*Parasa lepida*)はチョウ目イラガ科の昆虫であり、幼虫の体表には多数の棘が存在する。イラガの幼虫に刺されると痛みや痒みを伴う発疹を生じるが、この原因として考えられているのが棘の先端から出す分泌液である。前回大会では、分泌液に含まれるペプチドの一種である Iratin Pll-1 の化学合成について、また Iratin Pll-1 が発疹活性を有していることについて報告した。今回、分泌液に含まれる別のペプチドである Iratin Pll-2 の化学合成を行い、ジスルフィド結合位置の解析、発疹および受容体 TRPV1 への活性測定を行った。

＜方法・結果＞

鎖状 Iratin Pll-2 を自動合成機上で固相法により合成した。鎖状ペプチドを還元型、酸化型グルタチオンによってジスルフィド結合を形成させた後、逆相 HPLC で精製した。この合成 Iratin Pll-2 とヒロヘリアオイラガの分泌液から得られた天然 Iratin Pll-2 を、逆相 HPLC による分析、LC-MS(ESI)による質量分析で比較したところ、保持時間、分子量が一致した。さらに合成物と天然物が同一のものであるか確認するために、酵素によるペプチドの断片化をして HPLC、LC-MS で分析したところ、天然物と合成物は同じような挙動を示した。これらの結果から天然物と合成物は同一であると判断した。

Iratin Pll-2 には分子内に 3 つのジスルフィド結合が存在する。合成 Iratin Pll-2 を使用し、分子内ジスルフィド結合の結合位置を解析した。ジスルフィド結合の部分還元、SH 基のシアノ化、塩基処理によるペプチド鎖の切断を行い解析した。その結果、Cys2-Cys15、Cys9-Cys19、Cys14-Cys24 で形成されていることが示唆された。この結合様式は Iratin Pll-1 と共通する。

次に Iratin Pll-2 の活性測定を行った。まずウサギを用いた発疹活性測定を行ったところ、Iratin Pll-2 は発疹を誘起しなかった。次に痛みに関する受容体である TRPV1 を強制発現させた HEK293 細胞を用いたカルシウムイオン流入試験を行ったところ、活性は確認されなかった。以上の結果から、Iratin Pll-2 は発疹、および TRPV1 へのカルシウムイオン流入を誘起する物質ではないことが分かった。

slug caterpillar, venom, disulfide

講演番号：2E23a08
講演日時、会場：3 月 27 日 10:27～ E 校舎 23 会場

シオカラトンボの翅・体表の微細構造の形状とその成分
Microsculpture and its components of wing and body surfaces in Dragonfly *Orthetrum albistylum speciosum*

○横尾 敬行[1]、森田 沙代[1]、吉永 直子[1]、野村 周平[2]、平井 悠司[3]、吉岡 伸也[4]、森 直樹[1]([1]京大院農・応用生命、[2]国立科学博物館、[3]千歳科学技術大学・バイオマテリアル、[4]阪大・生命機能)
○Takayuki YOKOO[1], Sayo MORITA[1], Naoko YOSHINAGA[1], Shuhei NOMURA[2], Yuji HIRAI[3], Shinya YOSHIOKA[4], Naoki MORI[1] ([1]Kyoto Univ., [2]NMNS, [3]CIST, [4]Osaka Univ.)

シオカラトンボの翅の外表皮表面上には、ナノパイル構造と呼ばれる微小突起が規則正しく並列する特徴的な構造が存在し、高い撥水性・光透過性に寄与していると考えられている。また、体表にも複雑な微細構造が観察されており、撥水性のような物性的機能以外に雌雄間の体色の違いを生み出して性シグナルとして機能していると予測されている。そこで本研究では、シオカラトンボの外皮表面を覆う化合物を同定し、シオカラトンボの翅および体表面上の微細構造の化合物組成の解明を目指した。
まず、シオカラトンボの翅と体を分け，それぞれクロロホルムで２時間浸漬し，表面を構成する化合物をクロロホルムに溶出させた。その抽出液を薄層クロマトグラフィで展開したところ、ジアシルグリセロール・脂肪酸および炭化水素と推測されるスポットが観察された。化合物組成を明らかにするため、翅抽出物をメチル化し GCMS 分析に供試したところ、脂肪酸メチルエステルと予想される複数のピークが検出された。その後、標品の保持時間とマススペクトルの開裂パターンを比較し、抽出物の主要な脂肪酸として、ステアリン酸・パルミチン酸（飽和脂肪酸）・オレイン酸（不飽和脂肪酸）を同定した。また、雌雄間で脂肪酸の組成を比較したところ、ミリスチン酸など一部の脂肪酸は雌の翅に多く蓄積していた。さらに、同様の比較を体表抽出液でも行った結果、体表ではアラキドン酸・エイコサペンタエン酸（炭素鎖 20 の不飽和脂肪酸）が雌にだけ高度に蓄積していた。
外表皮の中でもより表面上の構成成分だけを溶出させるためクロロホルムの浸漬時間を 10 秒間に変更すると、雄にのみ確認される別の構成成分が見出された。この成分を決定するため気相抽出法によって構成成分を捕集した後に GCMS 解析を行ったところ、デカナールに代表されるアルデヒドが複数検出された。雌においても同様の処理を行ってもアルデヒドはほとんど検出できなかったことから、アルデヒドの外表皮表面上の蓄積は雄に特異的な現象であると考えられた。

dragonfly, microstructure, biological components

講演番号：2E23a09
講演日時、会場：3 月 27 日 10:38～ E 校舎 23 会場

巻貝の貝殻形態形成におけるキチナーゼの機能解析

Analysis of chitinase on the formation of snail shell

○米澤 舞[1]、小暮 敏博[2]、遠藤 一佳[2]、清水 啓介[2]、作田 庄平[1]、鈴木 道生[1] ([1]東大院農、[2]東大院理)
○Mai YONEZAWA[1], Toshihiro Kogure[2], Kazuyoshi Endo[2], Keisuke Shimizu[2], Shohei Sakuda[1], Michio Suzuki[1] ([1]Graduate School of Agricultural and Life Sciences, Univ. Tokyo, [2]Graduate School of Science, Univ. Tokyo)

【目的】
巻貝の貝殻は、成長と共に螺旋が何重にも巻いた構造をしており、螺旋の内部の殻は非常に薄くなることが知られている。これは成長した生体部を収納する空間を確保するために、厚く石灰化した貝殻を再度溶かす機構が存在するためと考えられる。これまで軟体動物の貝殻形成において、貝殻の石灰化に関与する生体有機分子についての報告は数多くあるが、その溶解に関与する分子については報告されていない。
貝殻形成における石灰化はキチンを足場としているため、本研究ではキチンの分解に関与するキチナーゼに着目した。Lymnaea stagnalis (モノアラガイ)を実験材料とし、貝殻や外套膜におけるキチナーゼの探索と、その機能解析を目的とした。
【方法】
モノアラガイの殻を酢酸で脱灰し、得られた酸可溶性成分を限外ろ過で脱塩、濃縮することで貝殻抽出液を得た。この貝殻抽出液に対してキチナーゼ活性染色および、キチナーゼの活性測定を行った。また同時に、高塩濃度バッファーを用いて外套膜からタンパク質を抽出し、そのタンパク抽出液に対してもキチナーゼ活性測定を行った。次に外套膜から cDNA を調製し、アコヤガイや他の貝のもつキチナーゼのアミノ酸配列を基にホモロジークローニングを行った。さらに外套膜の RNA-seq 解析を行いキチナーゼ遺伝子の探索を行った。またモノアラガイ貝殻を Trichoderma viride のキチナーゼで処理し、その貝殻形態への影響を SEM で観察した。
【結果】
キチナーゼ活性染色及びキチナーゼ活性測定の結果から、モノアラガイ貝殻酸可溶性画分と外套膜タンパク抽出液にキチナーゼ活性を確認した。また外套膜から調製した cDNA より、2 種類のキチナーゼ遺伝子 chi-Ⅰ、chi-Ⅱの全長配列を決定した。さらに RNA-seq 解析によって、chi-III、chi-IV、chi-V を同定した。これら chi-I～chi-V について外套膜、腹側、神経節、内臓、生殖巣、肺での発現解析を行った。また SEM での観察により、T. viride のキチナーゼで処理した貝殻はコントロールと比較して、微細構造が変化し、キチナーゼのキチン分解活性が貝殻の形態に影響を与えていることが明らかとなった。

biomineralization, chitinase, *Lymnaea stagnalis*

講演番号：2E23a10
講演日時、会場：3 月 27 日 10:49～ E 校舎 23 会場

Investigation of tetrodotoxin in pufferfish and screening of bioactive compounds in marine invertebrates from Solomon Islands

○ Clyde Gorapava PUILINGI, Yuta KUDO, Keiichi KONOKI, Yuko CHO, Mari YOTSU-YAMASHITA (Tohoku Univ.)

Marine environment is an intriguing source of natural toxins and bioactive compounds. With increasing food safety concerns and minimal knowledge of food poisoning from seafood in Solomon Islands, we decide to investigate three species of pufferfish, *Arothron hispidus, Arothron* sp. and *Diodon* sp. for the presence of tetrodotoxin (TTX) (**Fig. 1**), a potent neurotoxin and known agent of fatal food poisoning. LC-fluorescent detection (FLD) and LC-MS[1] analysis revealed the first two species to be toxic. Though TTX level varies in the tested organs, both species accumulate more TTX in the skin which presumably relate to their protection in predator-prey relationship, a role believed to be replaced by thorny spikes in *Diodon* sp., the non toxic species. Internal organs such as liver, ovary and stomach possess moderate to relatively low TTX content. Besides TTX, several TTX analogues were also observed in the toxic species. These include 4,9-anhydroTTX, 5,6,11-trideoxyTTX and 4,9-anhydro-5,6,11-trideoxyTTX in *A. hispidus* and 4,9-anhydroTTX in *Arothron* sp., along with few minor analogues such as 6,11-dideoxyTTX, 5,11-dideoxyTTX and 11-norTTX-6(*S*)-ol. Interestingly, 11-oxoTTX, an uncommon but highly toxic analogue was detected in *A. hispidus*, an occurrence that resembled previous study on Micronesian pufferfish, *A. nigropunctatus*.[2] Based on the presence of TTX revealed in this study and its possible existence in other seafood and marine organisms in Solomon Islands, the need for continuous screening is of great importance.

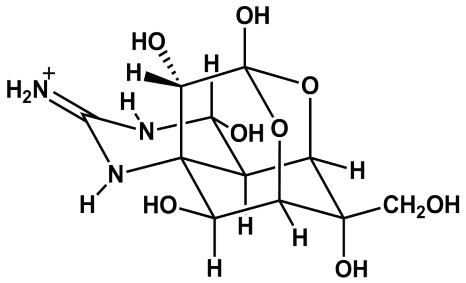


Fig. 1. The structure of TTX

Isolating bioactive compounds from marine invertebrates obtained in Solomon Islands is another area this study aims to explore. Preliminary cell-based screening of thirty marine invertebrates revealed eight of them to be active against Neuro-2a (mouse neuroblastoma) cell line, P388 (murine leukemia) cell line and Jurkat (human T-cell leukemia) cell line. Further isolation and structural elucidation of the potential bioactive compounds using HPLC, LC/MS, MS/MS and NMR are currently under way.

Ref. [1] Yotsu-Yamashita, M. *et al*. *Mar. Drugs* **2013**, *11*, 2799−2813.
[2] Khora, S. S. and Yasumoto, T. *Tetrahedron Lett*. **1989**, *30*, 4393-4394.

tetrodotoxin, bioactive compound, LC/MS

講演番号：2E23a11
講演日時、会場：3 月 27 日 11:10～ E 校舎 23 会場

ネコブセンチュウの誘引現象に関与する生理活性物質の探索
Search for the attractant of root-knot nematode
○吉田 翔太郎[1]、開出 智美[1]、岩堀 英晶[2]、近藤 竜彦[1] ([1]名大農、[2]九州沖縄農業研究センター)
○Shotaro YOSHIDA[1], Tomomi KAIDE[1], Hideaki IWAHORI[2], Tatsuhiko KONDO[1] ([1]Nagoya Univ., [2]NARO/KARC)

【背景・目的】
植物寄生性線虫であるネコブセンチュウは、宿主植物の根に侵入、定着し、維管束周辺に形成した摂食部位から養分を吸収する。この線虫による農作物被害は世界中で報告されており、ネコブセンチュウの防除法の確立は農業上非常に重要な課題である。宿主根に感染する際、ネコブセンチュウは根から分泌される何らかの化学物質を感知し、感染部位へと誘引されると考えられているが、その誘引物質の化学的本体は明らかになっていない。そこで本研究ではこの線虫誘引活性物質を探索し同定することを目的とする。

【方法・結果】
最初に、線虫誘引活性を *in vitro* で評価するための生物検定系を設計した。この生物検定系を用いた実験から、アルファルファの根浸出液に対して線虫が誘引されることが明らかになった。次に根の浸出液をフィルター滅菌して同様の生物検定を行なったところ、誘引活性は大きく低下した。この結果から、誘引活性物質は宿主植物ではなく試料中に含まれる菌に由来するものではないかと推測した。この点を検証するために、アルファルファの水耕液から 15 種類の菌を単離し、その菌体を含む培養液を生物検定に供した。その結果、数種の菌の培養液が線虫誘引活性を示すことを発見した。さらに、活性を示す菌のうちの一種を培養し、培養上清を用いて生物検定を行なったところ、線虫誘引活性が観察された。これまでの実験結果から、水耕液中に生息する細菌が線虫誘引活性を持つ物質を生産していることが強く示唆された。
この活性物質を同定するために、まず活性物質のキャラクタリゼーションを行なった。その結果、高極性かつ高分子量の物質であることが示唆され、活性物質は菌体外多糖であると予想された。そこで、生理活性を示す菌体外多糖の精製法を確立し、単離することに成功した。現在その構造を詳細に解析しており、その結果についても合わせて報告する。

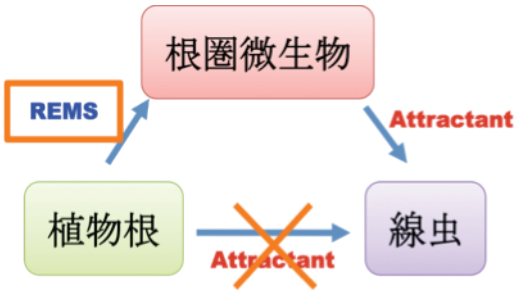
nematode, attractant, polysaccharide

講演番号：2E23a12
講演日時、会場：3 月 27 日 11:21～ E 校舎 23 会場

ネコブセンチュウの誘引現象に関与する宿主根由来物質の精製
Studies on the attraction of root-knot nematode toward the host root
○西川 博崇[1]、小川 舞[1]、村瀬 潤[1]、岩堀 英晶[2]、近藤 竜彦[1] ([1]名大院生命農、[2]九州沖縄農業研究センター)
○Hirotaka Nishikawa[1], Mai Ogawa[1], Jun Murase[1], Hideaki Iwahori[2], Tatsuhiko Kondou[1] ([1]Nagoya Univ., [2]NARO/KARC)

【目的】

ネコブセンチュウは、内部定着性の植物寄生性線虫の一種であり、約 700 種以上の植物に感染することが知られている。ネコブセンチュウは、様々な農作物に感染し、収量を低下させることから農業上非常に深刻な問題となっている。ネコブセンチュウは誘引物質を感知して根に接近すると考えられるがその機構は明らかとなっていない。



我々は、ネコブセンチュウが宿主植物ではなく水耕栽培液から単離した細菌が生産する物質に誘引されることを明らかにした。また植物根からはこの細菌に対して有意に増殖活性を示す物質の存在が示唆された。これらの結果は、宿主根から分泌される物質により細菌が根の周囲で増殖し、増殖した細菌が生産する誘引物質を線虫が感知する、という右図のようなモデルの存在を示唆している。本研究では、この植物根由来の細菌増殖刺激物質（Root-Exudate- derived Microbe-growth Stimulating factor, REMS）の化学的本体を明らかにし、誘引現象を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】

REMS の精製に先立ち、細菌の増殖誘導活性を評価するための生物検定系を確立した。この生物検定系を用いて、活性物質のキャラクタリゼーションを行った結果、種々のオープンカラムや限外ろ過膜を用いた実験から REMS は非常に高極性で低分子のカチオン性化合物であることが示唆された。そこで、次に粗精製法について検討を行い、MeCN による沈澱の除去など有効な粗精製法を確立した。さらに、HILIC カラムを用いた HPLC による分画を行った結果、複数の画分に活性が観察できたことから根の浸出液中には複数の REMS が含まれていることが示唆された。現在、REMS のさらなる精製を進めており、その結果についても発表する予定である。

root-knot nematode, bacteria, growth factor

講演番号：2E23a13
講演日時、会場：3 月 27 日 11:32～ E 校舎 23 会場

新規ストリゴラクトン zealactone の単離および構造決定
Isolation and structure determination of a novel strigolactone, zealactone, from maize root culture
○謝 肖男[1]、来生 貴也[1]、米山 香織[1]、内田 健一[2]、横田 孝雄[2]、野村 崇人[1]、米山 弘一[1]([1]宇都宮大学・バイオサイエンス教育研究センター、[2]帝京大学・バイオサイエンス学科)
○Xiaonan XIE[1], Takaya KISUGI[1], Kaori YONEYAMA[1], Kenichi UCHIDA[2], Takao YOKOTA[2], Takahito NOMURA[1], Koichi YONEYAMA[1] ([1]Center for Bioscience Research and Education, Utsunomiya Univ., [2]Dept. of Biosci., Teikyo Univ.)

【目的】

植物の根から分泌されるストリゴラクトンとその関連化合物は、根寄生雑草による寄生およびアーバスキュラー菌根菌(AM 菌)による共生のシグナルであり、植物の形態形成などに関わる植物ホルモンでもある。昨年度本大会でわれわれはトウモロコシが生産する既知および新奇ストリゴラクトンの存在について報告したが、新奇ストリゴラクトンについては十分な量が得られなかったため、構造決定にはいたらなかった。今回、トウモロコシの水耕液から新奇ストリゴラクトンを新たに精製し、構造解析を行ったので報告する。

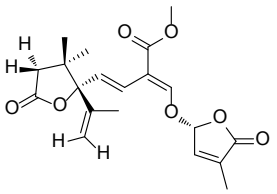
【材料および方法】

トウモロコシの種子（cv. Pioneer 2817）約 500 粒を表面殺菌し、温室で育成した後、水道水を用いて水耕栽培した。水耕液に含まれる根の分泌物を活性炭に吸着させた後、アセトンで溶出し、アセトンを減圧濃縮後、残渣を酢酸エチルで抽出して酢酸エチル可溶中性区（NE 区）を得た。

NE 区をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで分画し、ヤセウツボ（*Orobanche minor*）種子に対して発芽刺激活性を示すフラクションをさらに HPLC で精製した。精製した新奇ストリゴラクトンは、NMR (1D & 2D)、EI-GC/MS、LC-MS/MS によって構造解析を行った。

【結果および考察】

トウモロコシは既知ストリゴラクトンである orobanchol と 5-deoxystrigol を始めとする少なくとも 9 種類のストリゴラクトンを生産していることが確認された。さらに、主要な発芽活性画分を精製し、最も分泌量の多い新奇ストリゴラクトンを単離した。その構造を HRTOF/MS、GC/MS、NMR および CD によって
(2*E*,3*E*)-methyl4-((*R*)-3,3-dimethyl-5-oxo-2-(prop-1-en-2-yl)tetrahydrofuran-2-yl)-2-((((*R*)-4-methyl-5-oxo-2,5-dihydrofuran-2-yl)oxy)methylene)but-3-enoate と決定し、zealactone と名づけた。



Zealactone

strigolactone, plant hormone, structure determination

講演番号：2E23a14
講演日時、会場：3 月 27 日 11:43～ E 校舎 23 会場

紫外線照射イネ葉に蓄積するアミド化合物とイネいもち病菌に対する抗菌活性

UV-induced amides in rice leaves and their antifungal activity against rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae*

○堀江 清孝[1]、酒井 健吾[2]、奥木 美咲[2]、戸嶋 浩明[1,2]、長谷川 守文[1,2] ([1]東京農工大学、[2]茨城大学)
○ Kiyotaka HORIE[1], Kengo SAKAI[2], Misaki OKUGI[2], Hiroaki TOSHIMA[1,2], Morifumi HASAGAWA[1,2] ([1]Tokyo University of Agriculture and Technology, [2]Ibaraki University)

【背景および研究目的】

現在までにイネ由来ファイトアレキシン（PA）として、15 種のジテルペン化合物と 1 種のフラボノイド化合物が報告されている。近年、これらの他にごま葉枯病菌感染や UV 照射処理により、数種のストレス誘導性アミド化合物が生成することを石原らと Park らが報告している。本研究では、インドールアミン及び芳香族アミンとフェニルプロパノイドなどからアミド化合物を化学合成し、これらのイネ葉における UV ストレス誘導性とイネいもち病菌に対する抗菌活性について調べた。

【方法】

・アミド化合物の化学合成　　インドールアミン及び芳香族アミン（トリプタミン、セロトニン、メトキシトリプタミン及びチラミン）とフェニルプロパノイド（桂皮酸、クマル酸、コーヒー酸、フェルラ酸）及び安息香酸からアミド化合物を化学合成した。

・アミド化合物の UV 誘導性評価　　イネに対して殺菌灯を用いて、20 cm の距離から 20 分間 UV 照射を行った。UV 照射後 0～120 時間後の経過時間ごとに、イネに含まれるアミド化合物の存在量を LC/MS/MS を用いて調べた。

・アミド化合物の逆相 HPLC における保持時間の確認といもち病菌に対する抗菌活性試験　　アミド化合物と既知 PA の ODS カラムを用いた逆相 HPLC 分析を行い、各化合物の保持時間を調べた。また、各化合物を含む PDA 培地におけるイネいもち病菌の増殖阻害活性を調べた。

【結果及び考察】

合成した 9 種類のアミド化合物のうち、ベンゾイルトリプタミン、シナモイルトリプタミン、シナモイルチラミン及びフェルロイルセロトニンはイネ葉において UV 照射により有意に生成誘導され、その生成量は既知 PA と同等であった。UV 照射イネ葉に蓄積していた化合物の中では、ベンゾイルトリプタミンとシナモイルトリプタミンにのみイネいもち病菌に対する抗菌活性がみられた。合成したアミド化合物の中で高い抗菌活性を示したものは、逆相 HPLC で比較的遅く溶出されるものであり、それらの保持時間は既知 PA の中で比較的高い抗菌活性を示すサクラネチン等と同程度であった。以上のことから、化合物の極性といもち病菌に対する抗菌活性の間には関連があるものと考えられる。

amide, rice, *Magnaporthe oryzae*

講演番号：2E23a15
講演日時、会場：3 月 27 日 11:54～ E 校舎 23 会場

Synthesis of deoxy-D-allose fatty acid ester and its biological activity on plant growth

○Md Tazul Islam Chowdhury, Hikaru Ando, Ryo C. Yanagita, Yasuhiro Kawanami (Kagawa Univ.)

We have previously reported the regioselective syntheses of D-allose (a C-3 epimer of D-glucose) fatty acid esters and their biological activities on plant growth[1,2]. In this study, we investigated a synthetic procedure for 6-*O*-decanoyl-1,2-dideoxy-D-allose and evaluated its biological activity on plant growth in order to examine structure-activity relationship of D-allose fatty acid esters.

1,2-Dideoxy-D-allose was synthesized by four step reactions: acetylation/bromination, a reductive elimination (Zn/AcOH), a catalytic hydrogenation (H_2, Pd-C), and a hydrolysis (K_2CO_3/MeOH). Esterification of 1,2-dideoxy-D-allose with vinyl decanoate using lipase afforded 6-*O*-decanoyl-1,2-dideoxy-D-allose regioselectively. Then, we performed bioassay using lettuce (*Lactuca sativa*), cress (*Lepidium sativum*), Italian ryegrass (*Lolium multiflorum*), and rice (*Oryza sativa* L.cv. Nipponbare) seedlings. 1,2-Dideoxy-D-allose showed almost no inhibitory activity on lettuce, cress, Italian ryegrass and rice seedlings while D-allose showed inhibitory activity on the growth of these plants. These results suggest that hydroxy group(s) at C-1 and/or C-2 of D-allose might be important for the inhibitory activity. On the other hand, 6-*O*-decanoyl-1,2-dideoxy-D-allose showed significant growth-inhibitory activity on these plants. Co-addition of exogenous gibberellin, GA_3 (1 μM), with a solution of the 1,2-dideoxy-D-allose ester (3 mM) on rice seedlings brought a recovery of rice growth, suggesting that 6-*O*-decanoyl-1,2-dideoxy-D-allose might inhibit biosynthesis of GAs.

1) Kobayashi, M. et al., *Biosci.Biotechnol.Biochem.,* **74**(1), 216-217, 2010.
2) Chowdhury, M.T.I. et al., *Plant Growth Regul* DOI 10.1007/s10725-014-9972-2.

rare sugar, D-allose, plant-growth inhibitor

講演番号：2E23p01
講演日時、会場：3 月 27 日 14:00～ E 校舎 23 会場

久慈産琥珀に含まれる spirolactone 構造を有する酵母 Ca^{2+}-シグナル伝達阻害物質

Yeast Ca^{2+}-signal transduction inhibitor, a spirolactone compound derived from Kuji amber

○清水 栄作[1]、越野 広雪[2]、高橋 優太[1]、新田 久男[3]、木村 賢一[1]（[1]岩手大院農、[2]理研、[3]久慈琥珀（株））
○Eisaku Shimizu[1], Hiroyuki Koshino[2], Yuta Takahashi[1], Hisao Shinden[3], Ken-ichi Kimura[1]
([1]Grad. Sch. of Agri, Iwate Univ., [2]RIKEN, [3]Kuji Kohaku Co. Ltd)

【目的】我々は、植物の樹脂の化石である琥珀を天然資源と捉え、Ca^{2+}超感受性の遺伝子変異酵母 YNS17 株（*zds1*Δ *erg3*Δ *pdr1/3*Δ 株）を用いたスクリーニングにより、ロシア産琥珀（約 4500 万年前）とドミニカ産琥珀（約 2000 万年前）から、現代の植物にも含まれている既知の化合物を単離した。その一方で、久慈産琥珀（約 8500 万年前）からは、現代の植物には含まれていない新規物質 15,20-dinor-5,7,9-labdatrien-18-ol （**1**）（kujigamberol と命名）[1,2)]、13-methyl-8,11,13-podocarpatrien-19-ol（**2**）、並びに 15,20-dinor-5,7,9-labdatrien-13-ol（**3**）を見いだした。引き続き、本研究では久慈産琥珀中の新たな活性物質の探索を目的とした。
【方法・結果】活性物質の単離精製において、YNS17 株と 0.3 M $CaCl_2$ を懸濁した YPD 培地にサンプルを 5 μl 添加し、高濃度の Ca^{2+}存在下で細胞周期が G_2/M 期で停止した酵母の生育回復活性（生育円活性）を指標とした。久慈産琥珀 992.31 g からメタノール抽出、酢酸エチル抽出、シリカゲルカラムクロマトグラフィー（ヘキサン：酢酸エチル＝3：1）、並びに逆相 HPLC（65 %メタノール＋0.1 %酢酸）にて活性物質を精製し、各種機器分析を用いて構造解析をすると共に、ヒト急性前骨髄性白血病細胞 HL60 を用いた MTT アッセイにて細胞毒性の測定を行った。最初に新規物質の単離精製を行い、**1**（66.9 mg）をオイル状物質として単離した。さらに、分取した残りの画分 535.8 mg から 43.8 mg の白色粉末が得られた。HR-EI-MS の結果より分子式 $C_{16}H_{26}O_2$（分子量 250）を示し、UV 吸収は末端吸収で **1** と比較して非常に弱かった。各種 NMR より spirolactone 環を有する化合物であることが示唆され、天然物の marrubiin の分解物としての報告はあるが、天然物資源からの単離精製の報告はこれまでにない物質と推定された。この化合物は、YNS17 株に対し 0.63 μg/spot まで生育回復活性を示し、この値は **1** の 1/10 程度であった。また、HL60 細胞に対しては IC_{50} 値=38.4 μM を示し、**1** とほぼ同じ活性であった。以上のことから、久慈産琥珀由来の生物活性物質はロシア産やドミニカ産琥珀とは異なり、すべて現代の植物に含まれていない物質であることから、久慈産琥珀は琥珀の中でも生物活性物質探索において極めてユニークな天然資源であると考えられる。その理由として、久慈産琥珀の年代の古さや地域の特性、並びに K-Pg 境界（約 6500 万年前）以前の絶滅種が起源樹であるという可能性が考えられる。

1）Kimura，K.，*et al.*，Fitoterapia.，**83**，907（2012）
2）Ye，Y.. Q.，*et al.*，Bioorg. Med. Chem. Lett. **22**，4259（2012）.

yeast Ca^{2+}-signal transduction, Kuji amber, spirolactone

講演番号：2E23p02
講演日時、会場：3 月 27 日 14:11～ E 校舎 23 会場

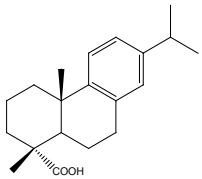
白亜紀のミャンマー産琥珀に含まれる酵母 Ca^{2+} シグナル伝達阻害物質の単離精製

Isolation of yeast Ca^{2+}-signal transduction inhibitors from cretaceous burmese amber

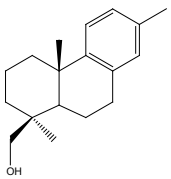
○内田 武史[1]、越野 広雪[2]、高野 侑恵[1]、新田 久男[3]、木村 賢一[1]（[1]岩手大院・農、[2]理研、[3]久慈琥珀（株））
○ Takeshi UCHIDA[1], Hiroyuki KOSHINO[2], Yukie TAKANO[1], Hisao SHINDEN[3], Ken-ichi KIMURA[1] ([1]Grad, Sch. of Agri., [2]RIKEN, [3]Kuji kohaku Co. Ltd.)

【目的】琥珀とは太古の植物の樹脂の化石を指す。我々は、これら琥珀の生物活性に着目した研究を行い、ロシア産琥珀（4500 万年前）、ドミニカ産琥珀（2000 万年前）、並びに久慈産琥珀（8500 万年前）から、Ca^{2+}シグナル伝達に関わる遺伝子変異酵母（*zds1*Δ *erg3*Δ *pdr1/3*Δ）株（YNS17 株）の生育回復活性物質を単離してきた。その結果、ロシア産琥珀やドミニカ産琥珀からは dehydroabietic acid（**1**）をはじめとした既知物質が得られたのに対し、生成年代が K-Pg 境界（6500 万年前）以前である久慈産琥珀からは、現代の植物からは得られていない炭素数 18 の新規テルペノイド、15,20-dinor-5,7,9-labdatrien-18-ol[1,2] (**2**)、13-methyl-8,11,13-podocarpatrien-19-ol (**3**)、および 15,20-dinor-5,7,9-labdatrien-13-ol (**4**) が単離できた。久慈産琥珀のみが新規物質を含む理由は不明であるが、生成年代、起源樹および環境の特徴に起因するものと推察される。そこで、我々は新たな新規物質の探索と久慈産琥珀が含む活性物質との共通点・相違点を比較検討するため、より生成年代の古い、ミャンマー産琥珀（9900 万年前）の生物活性物質を単離精製し、構造と生物活性の解析を行った。
【方法・結果】YNS17 株を用いたスクリーニングにより、ミャンマー産琥珀メタノール抽出物に 6.3 μg/spot まで生育回復活性が見出された。そこで、酢酸エチル抽出、シリカゲルカラムクロマトグラフィー（ヘキサン：酢酸エチル＝3:1、2:1）、逆相 HPLC（80% MeOH + 0.1% 酢酸）を用いて精製し、最終的に 912.16 g のミャンマー産琥珀から 2.4 mg の活性物質 A と 3.3 mg の活性物質 B を得た。HR-EI-MS の結果より、活性物質 A および B はいずれも分子式 $C_{18}H_{24}O_2$（分子量 272）であり、各種 NMR を測定したところ、A は 16,17-bisnordehydroabietic acid、B は 16,17-bisnorcallitrisic acid であると同定した。A と B は、**1** と **3** と同様の生物活性を示した。本研究において、久慈産琥珀と同様にミャンマー産琥珀からも現代の植物から得られていない、炭素数 18 のテルペノイドが得られてきたことから、琥珀の生成年代がユニークなテルペノイドの生成に関与していることに興味が持たれる。

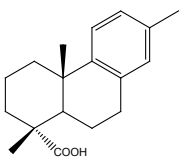
【参考文献】1) Kimura, K., *et al*., *Fitoterapia*, **83**, 907-912 (2012), 2)Ye, Y. Q., *et al*., *Bioorg. Med. Chem. Lett*., **22**, 4259-4262 (2012)



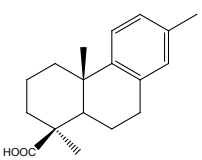
1



3



A



B

Burmese amber, 16,17-bisnordehydroabietic acid, 16,17-bisnorcallitrisic acid

講演番号：2E23p03
講演日時、会場：3 月 27 日 14:22～ E 校舎 23 会場

ジャバラ果皮主成分ナリルチンの生物変換反応とその機能性

Biotransformation of narirutin from *Citrus jabara* and its biological activities

○大田 時帆[1]、奥野 祥治[1]、河野 良平[2]、野村 幸子[2]、宇都宮 洋才[2]、前野 覚大[2]([1]和歌山高専、[2]和歌山県医大)
○ Shiho OTA[1], Yoshiharu OKUNO[1], Ryouhei KOUNO[2], Sachiko NOMURA[2], Hirotoshi UTUNOMIYA[2], Akihiro MAENO[2] ([1]NIT, Wakayama College, [2]Wakayama Med.)

【緒言】

ジャバラ(*Citus jabara*) は和歌山県北山村原産の香酸柑橘類であり、果皮に独特の苦味を持つ。一方、果汁には花粉症緩和効果があることが知られており、その活性本体はフラバノン配糖体であるナリルチンであるといわれている。ジャバラ果皮抽出液のフラボノイド類を HPLC 分析したところ、ナリルチンのみが大量に含有されていた。そこで本研究では、ジャバラ果皮から主要成分であるナリルチンを精製し、ナリルチンの生物変換反応および変換生成物の機能性について検討した。

【方法】

ナリルチンの精製

ジャバラ果皮水抽出液 300 mL(固形分 7.21 g)を DIAION HP20 を充填剤としたカラムクロマトグラフィーにアプライし、H_2O、20、40、60、100% MeOH、EtOAc を溶出溶媒として分画し、ナリルチンを精製した。

ナリルチンの生物変換反応

生物変換反応には *Aspergillus niger* を生体触媒として用いた。反応はシャーレによる静置培養とフラスコによる振とう培養で行った。*A.niger* を一定量になるまで培養した後、ナリルチンを静置培養では 0.25 mg/mL、振とう培養では 0.5 mg/mL になるように添加し、変換反応した。

【結果】

ナリルチンの精製

ジャバラ果皮水抽出液を DIAION HP20 を充填剤としたカラムクロマトグラフィーにより H2O/MeOH 系で分画し、ナリルチンを 0.994 g 得た。^{1}H NMR 解析の結果、5.40/5.37 ppm (H-2) および 2.76/2.72 ppm (H-3) にエナンチオマー由来のシグナルが積分比 1:1 で検出されたことから精製したナリルチンはラセミ体であることが分かった。

ナリルチンの生物変換反応

ナリルチンからさらなる機能性成分の生産を目的として *A. niger* を用いた生物変換反応を行った。培養液を HPLC で分析した結果、静置培養では 1 種類、回転培養では 2 種類の変換生成物がそれぞれ検出された。現在、これらの変換物の構造決定および機能性について検討中している。

Citrus jabara, narirutin, biotransformation

講演番号：2E23p04
講演日時、会場：3 月 27 日 14:33～ E 校舎 23 会場

光学活性 Taxifolin の大量生産法および異性化速度の検討

Large-scale Production of Optically Active Taxifolin and the Investigation of the Isomerization Rates

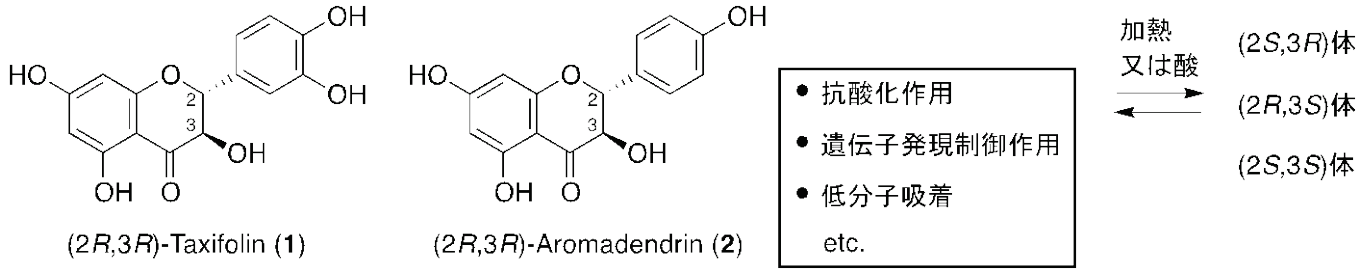
宮田 健吾、○中塚 宏志、中塚 進一（長良サイエンス株式会社）
Kengo MIYATA, ○Hiroshi NAKATSUKA, Shin-ichi Nakatsuka (Nagara Science Co., Ltd.)

Taxifolin はカラマツの主要フラボノイドの一種であり、アンモニアやホルムアルデヒドといった有害ガスの吸着材として利用[1]の他に、抗酸化作用[2]、遺伝子発現制御作用[3]等があることが示されている。これらは、カラマツの心材中に~5%程度と、多量に含まれていることが知られ、カラマツ廃材からも得られるため、その有効利用が期待されている。それらの構造は光学活性なフラバノノールであり、カラマツ中には *trans*-(2*R*,3*R*)体として存在する。その構造は比較的不安定で、加熱により、2 位の立体化学の異性化が進行し、酸性条件下で加熱すると 3 位ヒドロキシ基も異性化することが知られ[4]、抽出単離の操作に注意を要する。

生理活性研究等の詳細な研究を進めるためには、それらを光学活性体として純度高く単離する製法を確立すると共に、それらの物性、反応性等に関する知見を得ることが重要となる。

今回我々は、生産地や部位の異なるカラマツ材料からの抽出方法を検討し、(2*R*,3*R*)体をできる限り異性化させることなく、10 g スケールで抽出、単離、精製することに成功した。HPLC による分析条件を検討し、taxifolin の化合物純度、キラル分析により光学純度がいずれも 99%以上であることを確認した。加えて、類縁体である aromadendrin も光学的に純粋な形で単離した。

また、各種の異性化条件における異性化速度を調査した。



[1] 藤本 英人ほか 2 名 特開 2003-245543 [2] 中山 勉ほか 2 名 特開平 6-248267
[3] Lee, S. B.; Cha, K. H.; Selenge, D.; Solongo, A.; Nho, C. W. *Biol. Pharm. Bull.* **2007**, *30*(6), 1074–1079.
[4] Kiehlmann, E.; Li, E. P. M. *J. Nat. Prod.* **1995**, *58*(3), 450–455.

taxifolin, flavanonol, isomerization

講演番号：2E23p05
講演日時、会場：3 月 27 日 14:44～ E 校舎 23 会場

未熟黒大豆種皮に含まれる flav-2-en-3-ol 3-glucoside の単離とアントシアニンへの変換反応に関する研究

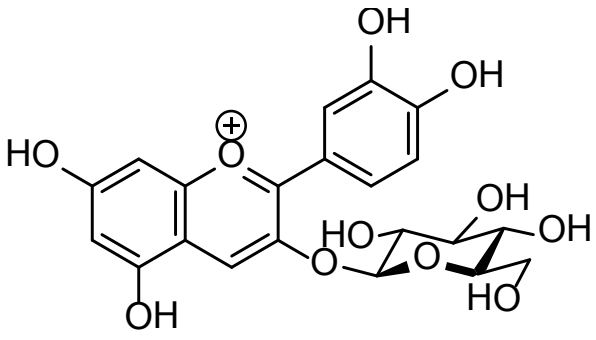
Studies on isolation of flav-2-en-3-ol 3-glucoside in the immature black soybean seed coat and the transformation to the anthocyanin

○林 英美、吉田 久美、近藤 忠雄 (名古屋大)
○Emi HAYASHI, Kumi YOSHIDA, Tadao KONDO (Nagoya Univ.)

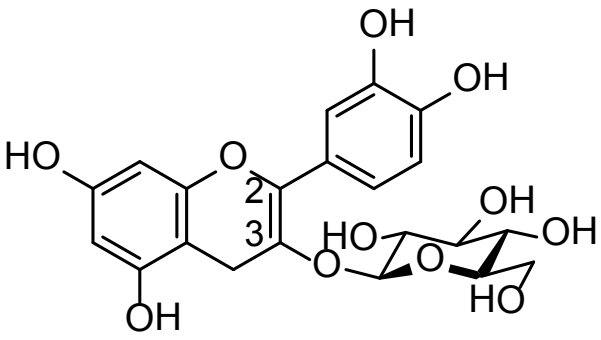
【緒言・目的】　黒大豆(*Glycine max*)種皮にはアントシアニン色素のシアニジン-3-グルコシド(1)が豊富に含まれている。シアニジン-3-グルコシドはアントシアニン色素の中でも抗酸化活性が特に高い事が知られており、多様な健康機能を持つ事で注目されている。

従来、このシアニジン-3-グルコシドの生合成経路では、シスロイコ体がアントシアニジン合成酵素(ANS)によってシアニジンへと空気酸化され、その後、配糖体化酵素(3GT)によってアントシアニンになると考えられてきた。しかし、我々のシアニジン-3-グルコシド合成研究では、シスロイコ体ではなく、配糖化フラベノール体(2)が速やかにシアニジン-3-グルコシドへと酸化された。また、黒大豆の未熟種皮に配糖化フラベノール体が存在するとの報告が、深見らからもなされている。そのため、黒大豆種皮のアントシアニン生合成においてフラベノール体が中間体である可能性を考え、その単離を行った。

【方法・結果】　開花 50 日後の未熟緑色種皮、60 日後、70 日後、100 日後の完熟黒色種皮の 4 段階の種皮を、50% CH_3CN 水溶液で抽出した。別途ケルセチン-3-グルコシドの金属還元によって合成したフラベノール体を用いて目的物を探索した。開花 70 日後の濃紅色に色付いた種皮抽出液に、目的物と一致する m/z = 451$[M+H]^+$のピークを検出した。そこで、この開花 70 日後の種皮抽出物をゲルろ過カラムクロマトグラフィーによって分離後、得られた化合物を ^1H NMR 測定し、flav-2-en-3-ol 3-glucoside(2)と確認した。現在、より大量の抽出と精製を進めている。



cyanidin 3-glucoside(1)



flav-2-en-3-ol 3-glucoside(2)

Glycine max, flav-2-en-3-ol 3-glucoside, cyanidin 3-glucoside

講演番号：2E23p06
講演日時、会場：3 月 27 日 15:05～ E 校舎 23 会場

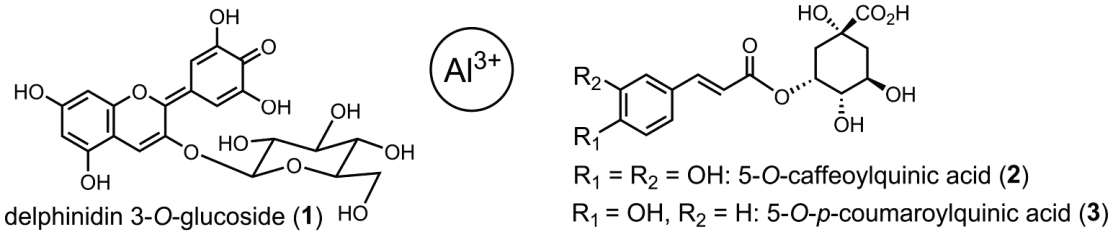
合成した助色素類を用いたアジサイ青色錯体の構造研究

Structural study of Hydrangea blue-complex by using synthetic co-pigments

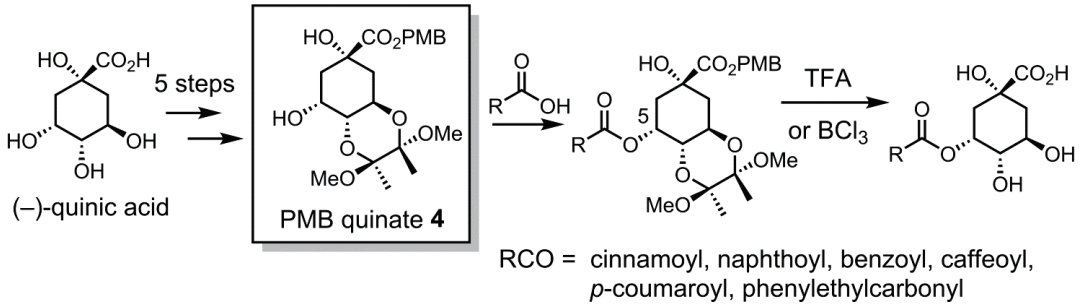
○山田 智美、尾山 公一、近藤 忠雄、吉田 久美 (名古屋大学)
○Tomomi YAMADA, Kin-ichi OYAMA, Tadao KONDO, Kumi YOSHIDA (Nagoya Univ.)

【諸言・目的】アジサイのガク片の青色は、delphinidin 3-glucoside (**1**)、助色素の 5-*O*-caffeoylquinic acid (neochlorogenic acid, **2**)と 5-*O*-*p*-coumaroylquinic acid (**3**) 及び Al^{3+}から形成される青色超分子金属錯体色素により発現する。しかし、その化学構造と発色機構は明らかにされていない。青色色素の構造情報を得る目的で、合成した neochlorogenic acid (**2**) 及び助色素類縁体を用いて錯体形成実験を行った。得られた青色色素の CD、UV/Vis、NMR 測定を行い、構造解明を進めた。

【方法・結果】Neochlorogenic acid (**2**) 及び助色素類縁体の合成において課題となっていた最終段階の脱保護条件を検討し、通算収率 45-60%で助色素の 5-*O*-acylquinic acid を得る方法が確立できた。アントシアニン **1**、各種 3 価の金属イオン(Bi^{3+}, In^{3+}, Sc^{3+}, La^{3+}, Yb^{3+})及び **2** を用いて pH 4.0 の緩衝液中で錯体形成実験を行った。青色色素の形成は、CD および UV/Vis スペクトルにより判断した。Al^{3+}だけがアジサイのガク片の青色を再現できた。さらに、**1**、Al^{3+}と **2** 又は各種助色素類縁体を用いて錯体形成実験を行い、NMR スペクトルを詳細に比較することにより構造解析を行った。会合体の NMR スペクトルが得られたので、現在構造を解析中である。



Scheme 1. アジサイ青色錯体の成分



Scheme 2. 5-*O*-acylquinic acid の合成経路

Hydrangea macrophylla, 5-*O*-acylquinic acid, blue color development

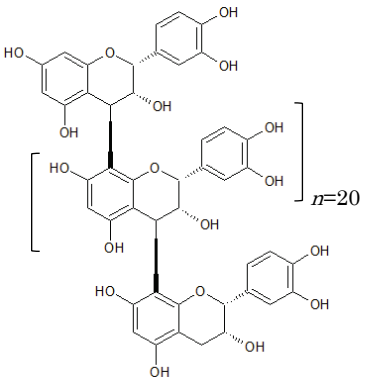
講演番号：2E23p07
講演日時、会場：3 月 27 日 15:16～ E 校舎 23 会場

トキワレンゲのα-グルコシダーゼ阻害成分

α-Glucosidase inhibitors of *Magnolia coco*

○加藤 奈々、河辺 聡子、我如古 菜月、伊東 秀之（岡山県大保福）
○Nana KATO, Satoko KAWABE, Natsuki GANEKO, Hideyuki ITO (Okayama Pref. Univ)

【目的】トキワレンゲ（*Magnolia coco*）は、モクレン科モクレン属に分類される常緑低木であり、中国南部や台湾などが産地で、日本でも温室などで栽培される。その花は、一日花で強いメロンのような芳香を放ち、その煎液は鎮痛、婦人病に効果があるとされている。しかし、トキワレンゲの花の成分については、精油成分を除いてほとんど報告されていない。我々はα-グルコシダーゼ阻害活性成分探索の一環として、様々な植物エキスについてスクリーニングを行った結果、トキワレンゲの花のエキスに阻害活性を有することを見出した。そこで本研究では、トキワレンゲの花に含まれるα-グルコシダーゼ阻害活性成分の探索を目的として実験を行った。
【方法】トキワレンゲの花を 70 %含水アセトンでホモジナイズを行い、濃縮乾固後，エキスを得た。さらにそのエキスをエーテル、酢酸エチル、*n*-ブタノールで順次抽出を行い、各画分および水移行画分を得た。各画分についてα-グルコシダーゼ阻害活性を測定し、活性を示したエキスについては，さらに分離、精製し、活性成分の単離を行った。
【結果】含水アセトンエキスの HPLC 分析の結果、主要成分のピークが見られたので、各種クロマトおよび TLC 分取により分離を行い、４種の化合物を単離した。単離した成分について、NMR, MS などのスペクトル解析を行い、それぞれ chlorogenic acid，rutin，kobusin，および (+)-sesamin と同定した。単離した４種の化合物のα-グルコシダーゼ阻害活性については，chlorogenic acid のみ阻害活性が示された。また溶媒抽出によって得られた各画分について、α-グルコシダーゼ阻害活性を測定した結果、*n*-ブタノールエキスに阻害活性が示された。*n*-ブタノールエキスについて塩酸-ブタノール反応および ^{13}C-NMR スペクトルを測定した結果、epicatechin から構成される procyanidin であることが示唆された。またゲル浸潤クロマトグラフィー分析によるピークの保持時間から、平均 22 量体の procyanidin oligomer から構成されていることが示された。さらにフロログルシノール分解反応および CD スペクトル解析の結果から、図のような平均 22 量体から成る procyanidin oligomer であることが示された。なお、この procyanidin oligomer は、*n*-ブタノールエキスと同等のα-グルコシダーゼ阻害活性を示したことから、トキワレンゲの主なα-グルコシダーゼ阻害活性成分の一つであることが示唆された。



Magnolia coco, α-glucosidase, proanthocyanidin

講演番号：2E23p08
講演日時、会場：3 月 27 日 15:27～ E 校舎 23 会場

男性型脱毛症の防止を目的とした紫リュエリアからのテストステロン還元酵素阻害物質の探索

The search for testosterone 5α-reductase inhibitors from *Ruellia tuberosa* L. for a prevention of Androgenic Alopecia

○須賀 久世、上西 雄大、加藤 英介、川端 潤（北大院農）
○ Hisayo SUGA, Yuta UENISHI, Eisuke KATO, Jun KAWABATA (Graduate School of Agriculture, Hokkaido Univ.)

〔研究背景〕

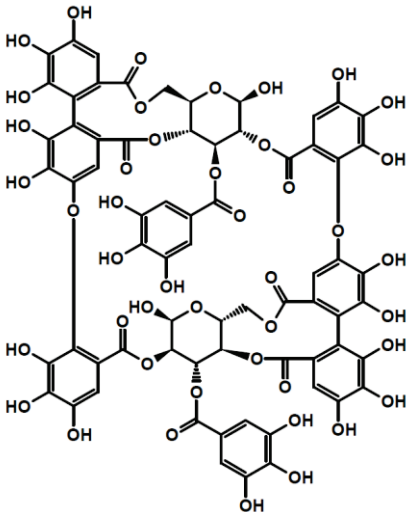
男性ホルモンが関連する疾患の一つに男性型脱毛症（AGA）があるが、この疾患原因の一つにテストステロンが酵素により還元されたジヒドロテストステロン（DHT）の過剰蓄積が挙げられる。そのためテストステロンを DHT に還元するテストステロン 5α還元酵素の阻害は AGA の治療戦略として有効である。そこで本研究では天然の植物からのテストステロン 5α還元酵素阻害物質の探索を目的とした。

〔方法〕

テストステロン 5α還元酵素阻害活性試験にはテストステロンを基質として用い、酵素源としてラット肝臓抽出物である S9 を用いた。被試験物質存在下で酵素反応を行った後に HPLC によって残存テストステロン量を測定し、コントロールとの比較から阻害率を算出した。

〔結果及び考察〕

上記の方法でインドネシア産植物 45 種類についてスクリーニングを行ったところ、紫リュエリア（*Ruellia tuberosa* L.）の果実部に強い阻害活性が見られた。紫リュエリアの果実部の乾燥粉砕物を 50%メタノール水溶液で 3 回抽出し得られた抽出液を、ヘキサン、酢酸エチル、1-ブタノールを用いて溶媒分配したところ水層に阻害活性が確認された。続いて水層を吸着クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィーに供し、活性画分を最後に HPLC によって精製し、クロモン配糖体である biflorin と clove3、および oenothein-B を単離した。biflorin、clove3 についてはすでに弱い（共に IC_{50}>5 mM）阻害活性しかないことが確認されている。oenothein-B の阻害活性を測定したところ 1 mM でほぼ完全に酵素反応を阻害した。



oenothein-B

androgenic alopecia, testosterone 5α-reductase inhibitor, *Ruellia tuberosa* L.

講演番号：2E23p09
講演日時、会場：3 月 27 日 15:38～ E 校舎 23 会場

ローズバッツエキスパウダーからのジペプチジルペプチダーゼ IV 阻害物質の探索

Search for Dipeptidyl Peptidase IV inhibitors from Rose buds extract powder

○上西 雄大[1]、加藤 英介[1]、稲垣 洋介[2]、黒川 美保子[2]、川端 潤[1] ([1]北大院農、[2]キューサイ（株）開発部)
○Yuta Uenishi[1], Eisuke Kato[1], Yosuke Inagaki[2], Mihoko Kurokawa[2], Jun Kawabata[1] ([1]Graduate School of Agriculture, Hokkaido Univ., [2]Q'sai Co., Ltd.)

【背景・目的】

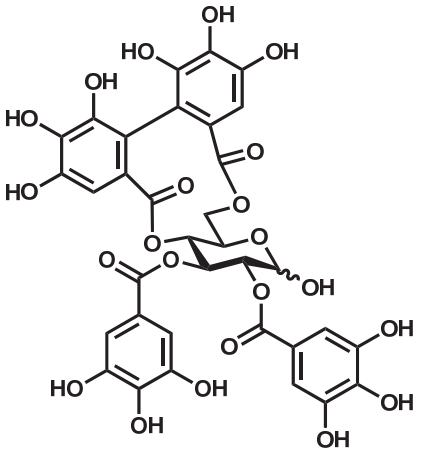
糖尿病の患者数は年々増加傾向にあり、早期の治療や予防が望まれる。Dipeptidyl Peptidase IV (DPP-IV) はインクレチンを分解する酵素である。インクレチンは食後に腸上皮細胞から分泌され、インスリン分泌を促進し、血糖値の急激な上昇を防ぐため DPP-IV の阻害は糖尿病治療の標的となる。そこで本研究ではローズバッツパウダー抽出物から DPP-IV 阻害物質の探索を目的とした。

【方法】

酵素阻害活性試験は DPP-IV inhibitor screening kit（ケイマンケミカル）を用いて次のように行った。C 末端に蛍光基（7-アミノ-4-メチルクマリン）を結合したジペプチドを基質とし、DPP-IV 反応によって遊離する蛍光量を 5 分ごとに測定して反応速度を求め、コントロールと被検物質の比から阻害率を算出した。

【結果】

市販のローズバッツエキスパウダーを水に溶解し、酢酸エチル、*n*-ブタノールで順次抽出を行った結果、酢酸エチル層と *n*-ブタノール層に高い阻害活性が得られた。酢酸エチル層を順相カラムクロマトグラフィー、逆相カラムクロマトグラフィーに順次供し、得られた活性画分について HPLC で精製を行った。その結果、Tellimagrandin I が単離された。活性測定の結果本化合物の活性は比較的弱かったことから、現在より阻害活性が高い化合物を探索中である。



Tellimagrandin I

Dipeptidyl Peptidase IV inhibitors (DPPIV), diabetes, Rose buds

講演番号：2E23p10
講演日時、会場：3 月 27 日 15:49～ E 校舎 23 会場

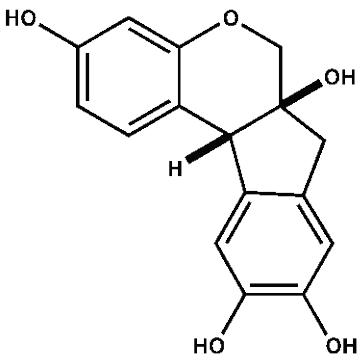
Search and identification of intestinal maltase inhibitors from *Caesalpinia sappan* (L.) wood

○ARSININGTYAS INES SEPTI, EISUKE KATO, JUN KAWABATA (Graduate School of Agriculture, Hokkaido Univ.)

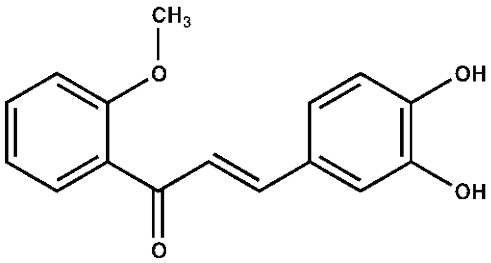
Objective] Discovery and usage of indigenous plants and their bioactive compounds for use against diabetes is gaining momentum to develop physiologically functional foods. *Caesalpinia sappan* L. (Leguminosae) rich in ethnobotanical usage, distributed and cultivated in Southeast Asia, Africa and the Americas, is a promising candidate for blood glucose regulation in diabetic patients. Thus, *in-vitro* intestinal maltase inhibition assay revealed high activity in *C. sappan* extract. The current study aimed at elucidating the compounds responsible for this activity.

[Method] Dried *C. sappan* woods were obtained from Yogyakarta, Indonesia. Determination of maltase inhibitory activity of *C. sappan* was done *in vitro*. Enzymatic assay was used to evaluate their activity to inhibit maltose hydrolysis by rat intestinal glucosidase.

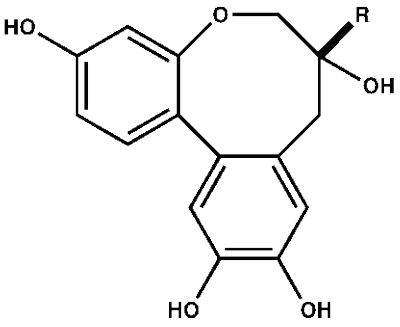
[Result] The ethyl acetate-soluble layer from aqueous methanol extracts of *C. sappan* was fractionated successively by silica gel column chromatography and HPLC (ODS) to yield brazilin (1, 0.03% of weight plant), sappanchalcone (2, 0.01%), protosappanin B (3, 0.5%) and protosappanin C (4, 0.12%). Each of the compounds was tested for intestinal maltase inhibition in 1 mM and showed the inhibitory activity of 1 (10%), 2 (45%), 3 (43%), and 4 (20%). These results suggest the relevance of isolated compounds from *C. sappan* and revealed that protosappanin B as a major intestinal maltase inhibitor in this plant.



Brazilin (**1**)



Sappanchalcone (**2**)



R = CH_2OH: Protosappanin B (**3**)
R = CHO : Protosappanin C (**4**)

Diabetes mellitus, intestinal maltase inhibitors, *Caesalpinia sappan*

講演番号：2E23p11
講演日時、会場：3 月 27 日 16:10～ E 校舎 23 会場

包括的二次元 GCMS を用いた産地間におけるワカメ香気成分の比較解析

Comparative study on the aromatic compounds of wakame seaweed using comprehensive 2D-GCMS

○山下 哲郎[1,2]、新田 祝子[2]、浜田 修[1]、前川 雄二[1]、宮崎 雅雄[2]（[1]岩手大三陸復興推進機構、[2]岩手大農）
○Tetsuro Yamashita[1,2], Shukuko Nitta[2], Osamu Hamada[1], Yuji Maekawa[1], Masao Miyazaki[2]
([1]Organization of Revitalization for Sanriku-region, Iwate Univ., [2]Fac of Agriculture, Iwate Univ.)

【目的】食品の香りは、様々な香気を有する揮発性物質の組み合わせにより構成されており、GC-MS 解析により香りを科学的に特徴づけることで、香気成分の比較を行うことができる。東日本大震災により壊滅的な被害を受けた三陸産ワカメのブランド価値向上を目指し、香気成分の網羅的な比較解析を行うことにより、中国産や国内他産地ワカメとの差別化が可能かどうか検討する。さらに、三陸産ワカメの漁港間での差も比較することにより、各漁港において香気成分の特徴を見出す。

【方法】三陸産ワカメ４種（久慈産、田老産、重茂産、唐丹産）、鳴門産ワカメ６種、中国産ワカメ４種各 10g を精製水 70ml に入れ加熱し、減圧条件下で 30 分熱水蒸留を行い、揮発性物質をヘキサン 1.5ml に抽出した。抽出サンプル 8μl を GC×GC-TOF-MS（PegasusⅣ、LECO）に供した。1 次カラムには DB-1MS（膜厚 0.25μm、長さ 30m、内径 0.25mm）、2 次カラムには DB-WAX（膜厚 0.18nm、長さ 1.5m、内径 0.18mm）を用いて分離したピーク成分の MS スペクトルから、NIST ライブラリーを用いて化合物の同定を行った。

【結果・考察】GC×GC-TOF-MS 測定の結果、すべての試料において 600 個前後の揮発成分が同定され、サンプル間で検出される分子種に違いがあることが確認された。三陸産ワカメにおいては、構成する香気成分はほぼ等しく、その構成比により差が生じていると示唆された。また、国産ワカメ（三陸産および鳴門産）と中国産ワカメでは構成する化合物がかなり異なることがわかった。また、ワカメの特徴的な香気成分とされていた cubenol に関しては、どのサンプルも主要な成分としては検出できなかった。三陸産および鳴門産ワカメの詳細な比較については現在解析を進めているところである。

Wakame, aroma, GCMS

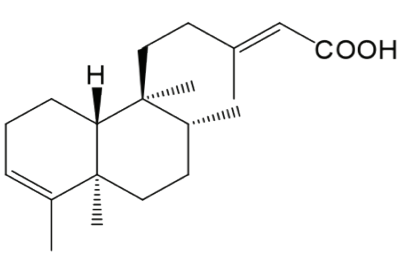
講演番号：2E23p12
講演日時、会場：3 月 27 日 16:21～ E 校舎 23 会場

ハマウツボ科帰化雑草 3 種の成分と生物活性から見た国内分布拡大リスク

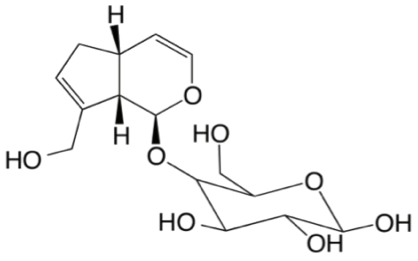
Biological activities of constituents in 3 alien Orobanchaceaes in Japan

○森本 正則、石田 実希、松田 一彦（近畿大院農）
○Masanori MORIMOTO, Miki ISHIDA, Kazuhiko MATSUDA (Kinki Univ.)

【目的】ゴマノハグサ科（APG 分類：ハマウツボ科）の半寄生雑草であるセイヨウヒキヨモギ（*Parentucellia viscosa* (L.) Caruel.）は 1970 年代、ヒサウチソウ（*Bellardia trixago* (L.) All.）が 1980 年代、ベニヒキヨモギ（*P. latifolia* (L.) Caruel.）においては 2009 年に、それぞれ国内帰化が確認された外来種である。これら 3 種の草種は、*Bartsia* という同属のシノニムを持ち、その形態や生活環がよく似ている。先述の 2 種は既に日本国内分布が拡大し、侵略的外来種候補リストにもその名を連ねる。本研究では、これら 3 種の二次代謝産物とその生物活性と日本国内分布拡大への寄与を考察する。
【方法】これら 3 草種は地上部に多量の滲出物を分泌し、種々の小型昆虫を補足していることが観察される。この地上部滲出物を、採集した植物をジクロロメタンで洗浄することによって収集後、残渣をさらにメタノールで抽出することで植物組織内に蓄積されている成分を得た。得られた滲出物とメタノール抽出物ならびにそれぞれの抽出物から単離・同定した成分は、レタスとネズミムギ幼苗に対する植物生長阻害試験およびハスモンヨトウ 3 齢幼虫に対する昆虫摂食阻害試験に供した。
【結果と考察】これらの帰化雑草地上部滲出物の主成分は、いずれもラブダンまたはクレロダン型ジテルペン類で構成されており、顕著な植物生長阻害活性を示さないものの、ハスモンヨトウ 3 齢幼虫に対して摂食阻害活性を示したことから、植食性昆虫からの食害回避に貢献していると考えられた。一方、いずれの草種においても、そのメタノール抽出物の主成分は aucubin や bartsioside などのイリドイド配糖体であり、供試植物や供試昆虫に対して有意な活性を示したことから、滲出物だけでは対応できない大型の植食者に対する防御手段としてはたらくものと考えられた。これら 3 種の帰化雑草中で近年帰化が確認されたベニヒキヨモギは、現在、徳島県吉野川下流域のみに分布している。本種は、セイヨウヒキヨモギやヒサウチソウと類似の生活環と二次代謝物質生合成能を示すことから、これらの 2 種の帰化雑草と同様に今後日本国内で分布を拡大する可能性があると推察された。



Kolavenic acid



Bartsioside

Orobanchaceae, terpene, allelopathy

講演番号：2E23p13
講演日時、会場：3 月 27 日 16:32～ E 校舎 23 会場

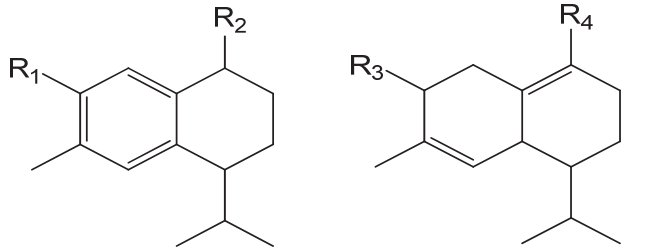
アレチオグルマ地上部滲出物中のセスキテルペン類の構造解析と生物活性

Phytotoxicity and insect antifeedant activity of calamenene and cadinene type sesquiterpenes from camphorweed exudate

○森田 遼、森本 正則、松田 一彦（近畿大院農）
○Ryo Morita, Masanori Morimoto, Kazuhiko Matsuda (Kinki Univ.)

【目的】キク科植物アレチオグルマ（*Heterotheca suhaxillaris* (Lam.) Britt.& Rusby）は、1～2 年生草本でアメリカ南部に分布し、以前に九州で帰化が確認された植物である。これまでに本種地上部滲出物中の主成分であるカラメネン型セスキテルペンカルボン酸や生合成前駆体と思われるカジネン型セスキテルペン類には植物生長阻害活性と昆虫摂食阻害活性があることを報告している[1,2]。本研究では、新たに単離したカジネン型セスキテルペンの絶対立体配置を含む構造決定と生物活性評価ならびにその作用機構を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】本種地上部をジクロロメタンで洗浄して得た滲出物を酸性画分と中性画分に分画し、シリカゲルフラッシュカラムクロマトグラフィーで精製し、酸性画分から 2 種類のカラメネン型セスキテルペンカルボン酸（1, 2）を、中性画分からカラメネン型セスキテルペン（**3**）と酸化度の異なる 4 種のカジネン型セスキテルペン（**4**~**7**）を得た。新たに単離された化合物は、各種スペクトルデータ解析結果から **7** のような平面構造であると決定した。カラメネン型セスキテルペン類はカジネン型セスキテルペン類よりもレタス（*Lactuca sativa* L. cv. greatlakes）およびネズミムギ（*Lolium multiflorum* Lam. cv. wasefudo）幼苗に対して高い生長阻害活性を示した。**4** と **6** は、レタス幼苗とネズミムギ幼苗に対して中程度の生長阻害を示したが、**7** はネズミムギ幼苗に対してのみ生長阻害を示した。一方、ハスモンヨトウ（*Spodoptera litura* F.）3 齢幼虫に対する選択的リーフディスク試験において、**4** は対応する芳香環を持つ **3** より高い摂食阻害率を示した。これらの研究の結果､植物毒性ではカジネン型化合物よりもカラメネン型セスキテルペンの方が高い活性を示し､逆に昆虫摂食阻害ではカラメネン型化合物よりもカジネン型の方が高い活性を示すことが初めて明らかとなった｡これらのアレチオグルマ地上部滲出物は植物や昆虫に対する化学的防衛手段として機能するものと推察された。



1 R_1 = OH R_2 = COOH
2 R_1 = OCH_3 R_2 = COOH
3 R_1 = OH R_2 = CH_2OH
4 R_3 = OH R_4 = CH_2OH
5 R_3 = H R_4 = CH_2OH
6 R_3 = OH R_4 = CHO
7 R_3 = H R_4 = CHO

カラメネン型　　カジネン型

1) Morimoto, M. *et. al. Phytochemistry* **70**, 69-74 (2009)
2) 森田　遼ら：農芸化学会関西支部大会，奈良，(2014)

Sesquiterpene, phytotoxicity, insect antifeedant

講演番号：2E23p14
講演日時、会場：3 月 27 日 16:43～ E 校舎 23 会場

マカ（*Lepidium meyenii*）に含有される脂肪酸とその糖取り込み促進活性

Glucose uptake effect of the fatty acids included in Maca (*Lepidium meyenii*)

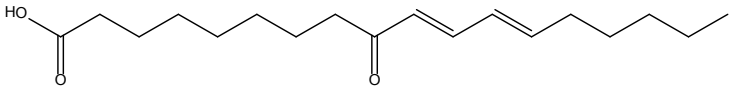
○片山 紳司、加藤 英介、川端 潤（北大院農）
○Shinji KATAYAMA, Eisuke KATO, Jun KAWABATA (Graduate School of Agriculture, Hokkaido Univ.)

【目的・背景】

糖尿病の患者数は年々増加の傾向にあり、予防や治療法の開発による患者数増加の緩和及び解消のために抗糖尿病作用を有する物質の探索が求められている。インスリンは、膵臓ランゲルハンス島β細胞から分泌されるペプチドホルモンの一種であり、血糖値の低下を促進する作用がある。これに類似した作用を有する糖取り込み促進物質は、高血糖や糖尿病の合併症を緩和及び予防することが期待できる。昨年度我々は糖取り込み促進活性のスクリーニング試験より見出されたマカ(*Lepidium meyenii*)抽出液からの活性物質の精製について報告した。今回は活性物質および関連化合物の同定について報告する。

【方法・結果】

糖取り込み促進活性試験にはL6細胞を用いた。被験物質で細胞を刺激した後、2-デオキシグルコースの取り込み量を測定し、コントロールとの比較から糖取り込み促進活性を判断した。マカ抽出液の酢酸エチル可溶画分を、Cosmosil 75C18-OPNを用いた逆相クロマトグラフィーにより分離したところ、75%メタノールおよびメタノール溶出画分に強い活性が認められた。メタノール溶出画分をシリカゲルカラムクロマトグラフィーを用いて分離し、得られた活性画分にを、分取薄層クロマトグラフィーを用いて分画した。これらの画分をNMRにより分析したところ、その主成分は脂肪酸であることが推定されたため、次にGC-MS分析による化合物の特定を試みた。その結果これらの画分には活性成分のひとつとして脂肪酸(**1**)が含まれると推定され、またその各種類縁体も含まれていることが示唆された。現在これらの関連化合物の詳細な構造および活性について検討中である。



9-oxooctadeca-10,12-dienoic acid(**1**)

Glucose uptake, Diabetes mellitus, Lepidium meyenii

講演番号：2E23p15
講演日時、会場：3 月 27 日 16:54～ E 校舎 23 会場

松葉（*Pinus sylvestris*）からの膵リパーゼ阻害物質の探索

Search for the pancreatic lipase inhibitor from *Pinus sylvestris*.

○竹本 彩乃、川端 潤、加藤 英介（北大院農）
○Ayano TAKEMOTO, Jun KAWABATA, Eisuke KATO (Graduate School of Agriculture, Hokkaido univ)

［目的］

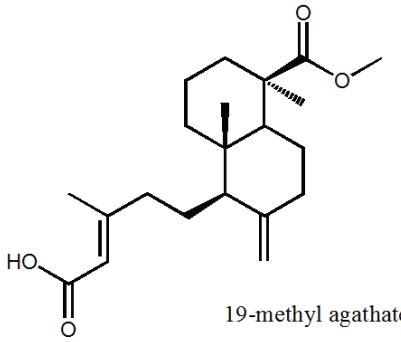
食事中に含まれる脂質の主成分はトリグリセリドであり、膵臓より分泌される膵リパーゼによってモノグリセリドと脂肪酸に分解され、小腸絨毛より吸収される。したがって、膵リパーゼを阻害することで脂質の吸収量が減少し、肥満の予防、改善につながることが知られている。このような作用を持つ脂肪吸収阻害剤に orlistat や cetilistat があり、抗肥満薬として利用されている。一方で、肝機能障害や脂溶性ビタミンの吸収阻害といった副作用もあるため、服用には医師による適切な指示が必要とされる。本研究では、抗肥満作用を持つ機能性食品の開発を目標とし、食用植物 121 種をブタ膵リパーゼを用いた *in vitro* の試験法により評価した。その結果、高い活性を示した松葉（*Pinus sylvestris*）に含まれる活性物質の探索を行った。

［方法］

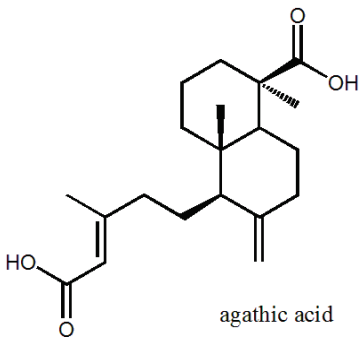
膵リパーゼ阻害活性測定試験には、基質としてトリオレインミセル溶液、酵素としてブタ膵臓リパーゼを用いた。サンプル溶液を酵素反応溶液に添加し、酵素反応により遊離した脂肪酸量をコントロールと比較することで阻害率を算出した。

［結果］

松葉 100 g の 50%MeOH 抽出物を、ヘキサン、酢酸エチル、*n*-ブタノールを用いて溶媒分配した。得られた *n*-ブタノール層を吸着カラムクロマトグラフィー、逆相カラムクロマトグラフィーに供し、HPLC により精製を行った。その結果、19-methyl agathate を 37.4 mg、agathic acid を 4.0 mg 得た。精製した化合物の阻害活性については現在検討中である。



19-methyl agathate



agathic acid

lipase inhivitor, obesity, Pinus sylvestris

講演番号：2E23p16
講演日時、会場：3 月 27 日 17:15～ E 校舎 23 会場

57 種のビルマ伝統医薬抽出物の生理活性について

Biological activities by extracts of 57 plant species used in traditional Burmese medicine

○仁科 淳良[1]、浮谷 基彦[1]、深津 誠[1]、纐纈 守[2]、渡邊 剛[3]、フェイ ニュン[4] ([1]日大理工、[2]岐阜大工、[3]タマ生化学、[4]パセイン大)
○ Atsuyoshi NISHINA[1], Motohiko Ukiya[1], Makoto Fukatsu[1], Mamoru Koketsu[2], Tuyoshi Watanabe[3], Nyunt Phey[4] ([1]Nihon Univ., [2]Gifu Univ., [3]Tama Biochem., [4]Pathein Univ.)

【目的】

漢方薬、アーユルベーダ、ユナニ医学などの伝統医薬と並んで日本民間薬などの伝承薬が現在でも使用され、成分探索、生理活性の詳細な測定などが進められている。一方、近年民主化されたミャンマーでは西洋医薬よりもビルマ伝統医薬が広く使用されている。しかし、政治的な混乱に起因する経済制裁により、鎖国状態であったためビルマ伝統医薬の成分探索などは発展途上といえる。我々は、共同研究先のパセイン大学の協力により、ビルマ伝統医薬５７種を入手した。今回は、予備的に行った、抽出物の生理活性測定経過を報告する。

【方法と結果】

パセイン大学経由でビルマ伝統医薬５７種を入手し、ヘキサン抽出物、酢酸エチル抽出物、メタノール抽出物（合計１７１種）を調製した。物質探索研究対象のスクリーニングを目的として各抽出物を生理活性試験に供した。（１）神経分化誘導作用：各抽出物を PC12 細胞の培地に添加し、ERK1/2 と Akt のリン酸化促進作用を測定した。p. croton メタノール抽出物は 10 μg/ml 以下の濃度で陽性参照化合物（NGF）と同様に ERK1/2 のリン酸化を促進し、5 日後には神経突起伸長と神経フィラメント-M の発現が認められた。すなわち、p. croton メタノール抽出物が PC12 細胞の神経分化を誘導することが判明した。（２）メラニン産生抑制作用：α-MSH が誘導する B16 細胞のメラニン産生抑制作用を測定した。g. cress と h. l. moon の酢酸エチル抽出物は、メラニン産生を抑制し、細胞毒性も微弱であった。特に h. l. moon の酢酸エチル抽出物はメラニン産生と関連する MITF、チロシナーゼ、TRP-2 の発現を顕著に抑制した。（３）抗がん作用：各抽出物の HL60（白血病）、A549（肺胞基底上皮腺癌）および WI-38（線維芽細胞）に対する毒性を比較した。複数の抽出物に WI-38 に対する毒性が低く、HL60 または A549 に対する毒性が強い選択的細胞毒性が認められた。抗がん成分探索候補となる抽出物のアポトーシス関連タンパク質（カスパーゼ 3、8、9、Bcl-2、Bax 等）に対する作用を測定した結果、特に r. s. wood のメタノール抽出物はアポトーシスによりがん細胞の死を誘導することが示唆された。

上記の（１）から（３）以外にビルマ伝統医薬の 3T3L1 細胞を用いた抗糖尿病作用、RAW264.5 細胞を用いた抗炎症作用等のスクリーニングを行うとともに、５７種の生薬から物質探索対象を選択し、クロマトグラフィーを用いた生理活性成分探索を開始したい。

traditional Burmese medicine, neuronal differentiation, melanogenesis inhibition

講演番号：2E23p17
講演日時、会場：3 月 27 日 17:26～ E 校舎 23 会場

ヘンナの抗肥満および抗糖尿病効果

Inhibitory effects of *Lawsonia inermis* on obesity and type 2 diabetes

○大城 華、ファム ティ ベ トゥ、石井 貴広、多和田 眞吉 (琉球大農)
○Hana Oshiro, Pham Thi Be Tu, Takahiro Ishii, Shinkichi Tawata (Ryukyu Univ.)

【目的】

ヘンナ（ヘナ）（学名：*Lawsonia inermis* ）はミソハギ科シコウカ属の常緑低木で、古くから毛髪の染色や皮膚へのペイント等に活用されてきた薬草である。近年、ヘンナのもつ様々な生理活性が明らかになっており、強い抗癌作用や抗酸化作用を示すことが報告されている。抗酸化作用は肥満や 2 型糖尿病といった生活習慣病と関連性が強く、高い抗酸化活性をもつ物質は、有望な抗肥満効果や抗糖尿病効果を示すことが期待される。ヘンナ抽出物には強力なラジカル捕捉活性を有することが知られているが、抗肥満・抗糖尿病に関する報告はない。

本研究では、沖縄産ヘンナのメタノール抽出物より、マウス前駆脂肪細胞 3T3-L1 上における抗肥満・抗糖尿病作用をもつ物質の単離・同定を試みた。

【方法・結果】

ヘンナの乾燥葉（100 g）を粉砕し、10 倍量のメタノールで 3 時間超音波破砕を行って抽出した。メタノールを減圧濃縮後、得られた粗抽出物について酢酸エチルでさらに抽出を行い、酢酸エチル可溶画分 (1.8 g) を得た。次に、酢酸エチル可溶画分を順相オープンカラムクロマトグラフィーに供し、クロロホルム/メタノール混合溶媒で溶出し、8 個の画分を得た。

各画分を 3T3-L1 肥満細胞を用いた各種活性評価試験に供した結果、クロロホルム/メタノール＝9/1 および 8/2 溶出画分において、高い活性が確認できた。さらに、これらの活性画分について分取用 TLC により分離を進めたところ、4 個の画分において強い NO 産生阻害活性と ROS 阻害活性およびα-グルコシダーゼ阻害活性が認められた。現在、活性物質の単離・精製および NMR 等の各種機器分析による構造解析を行っている。

Lawsonia inermis, 3t3-l1 adipocytes, α-glucosidase inhibitory activity

講演番号：2E23p18
講演日時、会場：3 月 27 日 17:37～ E 校舎 23 会場

はぶ草（*Senna occidentalis* L.）種子の有効成分の検索と生理活性について

Chemical constituents of *Senna occidentalis* L. and their physiological activities.

○元矢 倫子[1]、元矢 知志[2]、岡田 芳治[1]、野村 正人[1] ([1]近畿大学、[2]島根大学)
○Michiko MOTOYA[1], Tomoyuki MOTOYA[2], Yoshiharu OKADA[1], Masato NOMURA[1] ([1]Kinki Univ., [2]Shimane Univ.)

【緒言】

近年，漢方医学と西洋医学を互いに取り入れようという東西医学結合の流れが広まっている．この流れを受け，漢方やその原料となる生薬，さらには世界各地で伝承的に効果を持つとされる植物などの成分分析や，効能を科学的に実証するための研究が盛んに行なわれている．本研究で取り上げた，はぶ草（*Senna occidentalis* L.）は， 熱帯アメリカ原産のマメ科植物であり，その種子は生薬および健康茶として多くの人々に飲用されている．しかし，含有成分やその効果に関する詳細な研究報告は不十分である．そこで今回，はぶ草の種子について抽出を行ない，有効成分の検索と生理活性について検討した．

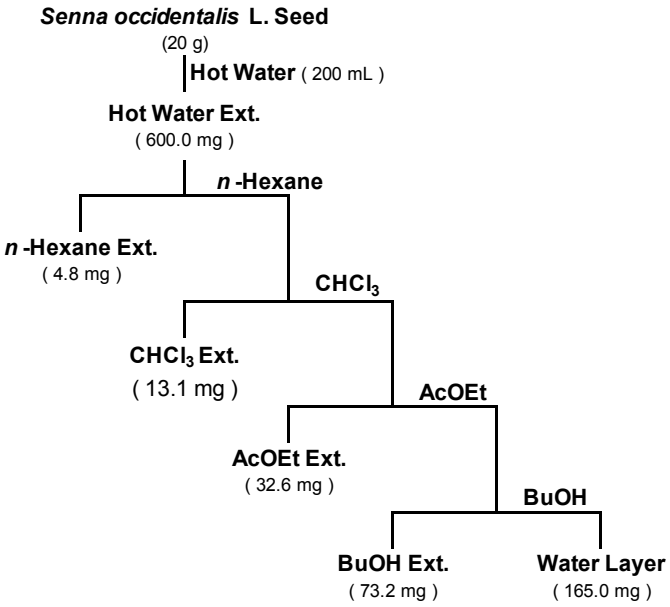


Fig. 1. Fractionation Scheme for *Senna occidentalis* L. Seed.

【実験方法と結果】

岐阜県産のはぶ草（葉取用）種子 20 g に 80°C のお湯を 200 mL 加え，30 分間加熱しながら抽出を行なった．得た熱水抽出部を凍結乾燥後，ヘキサン，クロロホルム，酢酸エチルおよびブタノールを用いて順に溶媒分画を行なった（Fig.1）．

ついで，分画部を濃縮し水層部は凍結乾燥した．また，熱水抽出部，各溶媒分画部および水層部の DPPH ラジカル消去効果試験および活性酸素阻害試験を行なった。その結果，酢酸エチル分画部およびブタノール分画部に高い活性があることを確認した（Table 1）．

Table 1 DPPH Radical Scavenging Assay and SOD-like Activity Assay of Each Ext..

Extract [a]	DPPH Radical Scavenging Assay	SOD-like Activity Assay
	Scavenging Rate (%) [b]	Inhibition Rate (%)
n -Hexane	13.0	N.D. [c]
$CHCl_3$	60.3	N.D.
AcOEt	21.7	64.6
BuOH	N.D.	58.1
Water Layer	N.D.	1.8
α-Tocopherol [d]	86.9	—
Ascorbic acid [e]	—	17.9

a) Concentration:1 mg / mL. b) Final Concentration:0.4 mg / mL. c) Not Detected.
d) Concentration:0.1 mM. e) Concentration:0.1 mg / mL.

Senna occidentalis L., seed, physiological activities

講演番号：2E23p19
講演日時、会場：3 月 27 日 17:48～ E 校舎 23 会場

生薬“細辛（サイシン）”からの塩味惹起物質の単離と同定

Identification of saltiness-inducing substances from the Japanese herbal medicine "saishin"

○奥 直也、岩崎 春香、五十嵐 康弘（富山県大生工・生工セ）
○Naoya OKU, Haruka IWASAKI, Yasuhiro IGARASHI (Toyama Pref. Univ.)

慢性腎臓病（Chronic Kidney Disease, CKD）は 3 ヶ月以上持続する腎障害を指す。初期症状がないため、患者が無自覚のまま進行している場合が多く、食事の西欧化による肥満化傾向を背景に、国内では今や成人の 8 人に 1 人が罹患しているとされ、新たな国民病と呼ばれている。CKD の予防および進行を遅らせるためには、禁煙・運動などの生活習慣の改善と併せて、減塩・タンパク摂取制限などの食事療法が有効である。しかし塩味の代替は非常に難しく、現状では塩化カリウムをベースにアミノ酸等を添加したカクテルが減塩食品に利用されている。しかしアルカリ金属塩を使用している時点で、その組成が腎臓への負担軽減に十分な効果があるとはいえない。

生薬“細辛（サイシン）”はウマノスズクサ科の多年草であるウスバサイシン(*Asiasarum sieboldii*)またはケイリンサイシン(*Asiasarum heterotropoides*)の根を乾燥させたものである。これを噛むと、その名のとおり、麻痺性の辛味を感じるが、このとき多量の唾液が分泌されると共に、はっきりした塩味を感じる。この現象を減塩食品に応用できれば、既存の物とは異なり大幅な減塩効果が得られる。そこで生薬“細辛（サイシン）”より、辛味成分の同定を試みた。

試料 105 g をエタノールで抽出後、溶媒分画を行い、ヘキサン層、90% MeOH 層、ブタノール層、水層の 4 画分を得た。この 4 画分をそれぞれ呈味したところ、ヘキサン層にのみに辛味を感じた。Sephadex LH-20 ゲルろ過クロマトグラフィー、シリカゲルカラムクロマトグラフィー、シリカゲル HPLC、ODS リサイクル HPLC により順次精製、官能試験を行った結果、それぞれ 0.5 mg、0.7 mg、0.5 mg の 3 つの辛味成分を得た。NMR スペクトル解析の結果、いずれも炭素数 16 のイソブチルアミドであり、アシル基部分の幾何異性体であることが判明した。全て既知物質であるものの、うち 1 つは天然物としては初めての報告となる。

過去にケイリンサイシン(*Asiasarum heterotropoides*)からは辛味成分として pellitorine が同定されている[1]が、今回単離には至らなかった。本物質の活性に疑義が持たれたため、現在 1 kg より再精製を進めている。

<参考文献>

1) Yasuda, I.; Takeya, K.; Itokawa, H. *Chem. Pharm. Bull*, **1981**, *29,* 564-566.

chronic kidney disease, taste enhancer, pellitorine

講演番号：2D23a01
講演日時、会場：3 月 27 日 09:00～ D 校舎 23 会場

ソルガムにおける GR24 水酸化反応の立体特異性と位置選択性
Regioselective and stereospecific hydroxylation of GR24 by sorghum
○石輪 俊典[1]、上野 琴巳[1]、中嶌 瞳[1,2]、水谷 正治[1]、滝川 浩郷[1,2]、杉本 幸裕[1,2] ([1]神戸大院農、[2]JST/JICA, SATREPS)
○ Shunsuke ISHIWA[1], Kotomi UENO[1], Hitomi NAKASHIMA[1,2], Masaharu MIZUTANI[1], Hirosato TAKIKAWA[1,2], Yukihiro SUGIMOTO[1,2] ([1]Grad. School of Agric. Sci., Kobe Univ., [2]JST/JICA, SATREPS)

根寄生植物は、世界各地で作物に寄生し農業生産に大きな被害をもたらしている。根寄生植物の種子は、植物の根から分泌される化合物を感受して発芽する。この化合物はストライゴラクトン(SL)と総称され、様々な植物の根滲出液から単離同定されている。我々は、ソルガム(*Sorghum bicolor*)が投与された合成 SL の GR24 を体内に取り込み、複数の水酸化された化合物を分泌すること、また、*Striga gesnerioides* が他の根寄生植物とは異なり SL に対して高度な構造要求性を示すことを見出している。本研究ではソルガムが変換した GR24 の各立体異性体の水酸化物を同定し、水酸化反応の立体選択性と位置選択性を明らかにするとともに、同定のための標品として調製した一連の水酸化 GR24 の *S. hermonthica* と *S. gesnerioides* 種子に対する発芽刺激活性を評価した。

GR24 の各立体異性体は、GR24 ラセミジアステレオマー混合物をシリカゲルクロマトグラフィーで分離後、ラセミ体をキラル HPLC で分離して得た。得られた 4 種の立体異性体の絶対立体配置は CD スペクトルにより決定した。4-Hydroxy-GR24 は、既往の報告に準じて調製した。5 位から 8 位の A 環水酸化 GR24 は、市販の hydroxy-1-indanone の水酸基を保護した後、従来の方法に従って 3 環性ラクトンの調製、D 環カップリング後 TFA で脱保護して得た。水酸化 GR24 の立体は、GR24 と同様にジアステレオマー分離後キラル HPLC でラセミ体を分離し、CD スペクトルに基づいて決定した。

SL 高生産ソルガムを 40% Long Ashton 水耕液、次いで水道水で水耕栽培した。GR24 の各立体異性体を水耕液に添加し、24 時間後、水耕液から根滲出物を酢酸エチルで抽出し、シリカゲルカラムで簡易精製した後、LC-MS/MS 分析に供した。LC-MS/MS 分析の結果、GR24 の 4 種の立体異性体のうちソルガムによって最も水酸化されやすい異性体は 2'-*epi*-GR24 であり、次いで GR24、*ent*-2'-*epi*-GR24、*ent*-GR24 の順であることがわかった。水酸化 GR24 標品のクロマトグラフィーの挙動と比較した結果、GR24 と 2'-*epi*-GR24 は主に 7 位が、*ent*-GR24、*ent*-2'-*epi*-GR24 は主に 4 位が水酸化されていることが判明した。この結果から、ソルガムは GR24 の C 環の立体を認識し、位置選択的に水酸基を導入していることが示された。

S. hermonthica 種子に対する発芽試験の結果、7 位および 8 位への水酸基の導入が GR24 の活性に与える影響は小さいが、4,5,6 位への導入は顕著に活性を低下させることが明らかになった。一方、*S. gesnerioides* 種子に対する発芽試験の結果、活性を示す新たな水酸化 GR24 異性体を見出した。

strigolactone, hydroxylation, seed germination

講演番号：2D23a02
講演日時、会場：3 月 27 日 09:11～ D 校舎 23 会場

ミヤコグサおよびタルウマゴヤシにおけるカーラクトン MAX1 酸化産物のストリゴラクトンへの変換

Conversion of MAX1 oxygenated carlactones to strigolactones in the model legumes Lotus japonicus and Medicago truncatula

○秋山 康紀[1]、佐渡 愛香[1]、徳永 珠美[1]、謝 肖男[2]、米山 弘一[2] ([1]阪府大院・生命環境、[2]宇都宮大・バイオサイエンス教育研究センター)
○Kohki Akiyama[1], Aika Sado[1], Tamami Tokunaga[1], Xiaonan Xie[2], Koichi Yoneyama[2] ([1]Grad. Sch. Life & Environ. Sci., Osaka Pref. Univ., [2]Ctr Biosci. Res. & Educ., Utsunomiya Univ.)

【目的】ストリゴラクトン（strigolactone, SL）はアーバスキュラー菌根共生や根寄生雑草寄生における根圏情報物質として機能するだけでなく，内生植物ホルモンとしても働くテルペノイドである。SL の生合成経路についてはカロテノイドを初発基質としており，カロテノイド酸化開裂酵素 (carotenoid cleavage dioxygenase, CCD) である CCD7 や CCD8，シトクロム P450, D27 などが関与しているとされていたが, その詳細については不明であった。2012 年, *in vitro* で発現させた D27, CCD7, CCD8 を all-*trans*-β-carotene に作用させることでカーラクトン（carlactone, CL）が生成することが明らかになった。2014 年初頭，CL が内生物質として存在し，立体特異的に SL に変換される真の生合成中間体であることが証明された。ごく最近，シロイヌナズナ（*Arabidopsis thaliana*）のシトクロム P450 酵素である AtMAX1 が三段階酸化により CL を 19-ヒドロキシカーラクトン（19-hydroxycarlactone, 19-HO-CL）を経てカーラクトン酸（carlactonoic acid，CLA）に変換することが明らかになった。また，イネでは ^{13}C 標識 19-HO-CL と CLA が 4-デオキシオロバンコール（4-deoxyorobanchol，4DO）とオロバンコールに変換されることが分かった。さらに，イネの MAX1 オルソログである Os900 が CL を 4DO に変換することが示された。マメ科モデル植物であるミヤコグサ（*Lotus japonicus*）とタルウマゴヤシ（*Medicago truncatula*）はストリゴール型の立体配置を持つ 5-デオキシストリゴール（5-deoxystrigol, 5DS）とオロバンコール型の立体配置を持つメディカオール（medicaol）をそれぞれ主要な SL として生産する。一昨年度の本大会において我々は，^{13}C 標識した CL がミヤコグサ根への取り込み実験において 5DS に変換されることを報告した。今回，CL の MAX1 酸化産物である 19-HO-CL や CLA，さらに CLA のメチルエステル体（methyl carlactonoate, MeCLA）の ^{13}C 標識体を合成し，ミヤコグサおよびタルウマゴヤシ根への取り込み実験において SL に変換されるかどうか調べたので報告する。
【方法及び結果】ミヤコグサ根を用いた 19-HO-CL, CLA 及び MeCLA の ^{13}C 標識体の取り込み実験を行ったところ，これら 3 つの化合物はすべて 5DS に変換されることがわかった。CL の取り込み率が 25%であったのに対し, 19-HO-CL および CLA の取り込み率は 70-80%と非常に高かった。一方, MeCLA の取り込み率は 20%であり, 19-HO-CL や CLA に比べて低かった。これは MeCLA が内在性エステラーゼによって CLA に変換されてから 5DS の生合成経路に入るためで，MeCLA から CLA へのエステル加水分解の反応速度が遅いことに起因すると考えられた。現在，タルウマゴヤシ根への ^{13}C 標識 CLA の取り込み実験を行い，CLA がメディカオールに変換されるかどうか調べている。

strigolactone, Lotus japonicus, Medicago truncatula

講演番号：2D23a03
講演日時、会場：3 月 27 日 09:22～ D 校舎 23 会場

酵母異種発現系によるミヤコグサおよびタルウマゴヤシ MAX1 酵素の機能解析
Functional characterization of LjMAX1 and MtMAX1 involved in strigolactone biosynthesis

○森 愛美[1]、謝 肖男[2]、野村 崇人[2]、米山 弘一[2]、秋山 康紀[3] ([1]阪府大・生命環境、[2]宇都宮大学バイオサイエンス教育研究センター、[3]阪府大院・生命環境)
○Narumi Mori[1], Xiaonan Xie[2], Takahito Nomura[2], Koichi Yoneyama[2], Kohki Akiyama[3] ([1]Dept. Life & Environ. Sci., Osaka Pref. Univ., [2]Ctr. Biosci. Res. & Educ., Utsunomiya Univ., [3]Grad. Sch. Life & Environ. Sci., Osaka Pref. Univ.)

【目的】ストリゴラクトン（strigolactone, SL）は植物が生産するアポカロテノイドであり，アーバスキュラー菌根菌や根寄生雑草に対する根圏情報物質として作用する。また SL は植物の枝分かれを抑制するホルモンとしても知られている。SL 生合成において，D14，CCD7，CCD8 酵素により β-カロテンから生合成中間体としてカーラクトン（carlactone, CL）が生成することが明らかになっている。ごく最近，シロイヌナズナの MAX1（MORE AXILLARY GROWTH 1）が CL を基質としてカーラクトン酸（carlactonoic acid，CLA）を生成することが明らかになった。さらに，イネにおける 5 種類の MAX1 のうち，Os900 が CL から 4-デオキシオロバンコール（4-deoxyorobanchol, 4DO）を，Os1400 が 4DO からオロバンコールをそれぞれ生成することが報告された。マメ科のモデル植物であるミヤコグサ（*Lotus japonicus*）とタルウマゴヤシ（*Medicago truncatula*）はストリゴール型とオロバンコール型の SL をそれぞれ生産することが分かっているが，これら植物の MAX1 の機能は明らかになっていない。そこで本研究では，酵母を用いた異種発現系によりミヤコグサの LjMAX1，タルウマゴヤシの MtMAX1a および 1b の酵素機能解析を行ったので報告する。
【方法及び結果】リン酸欠乏下で生育させたミヤコグサとタルウマゴヤシの実生から抽出した全 RNA を用いて cDNA をそれぞれ合成した。この cDNA を鋳型として PCR 法により *LjMAX1*，*MtMAX1a* および *1b* 遺伝子の ORF を増幅した。得られた PCR 産物を pTAC-1 ベクターにクローニングし，大腸菌を用いてプラスミドを増幅した後，ORF を制限酵素で切り出し，ガラクトース誘導性酵母発現ベクターpYeDP60 にサブクローニングした。これをシロイヌナズナの NADPH-P450 還元酵素遺伝子がゲノムに挿入された酵母 WAT11 と WAT21 株に形質転換した。ガラクトースにより発現誘導した形質転換酵母の培養液に CL を添加し, 30℃で 3 時間インキュベートした後, 生成物を酢酸エチルで抽出し，シリカゲルカラムで精製した後，LC-PDA-MS により分析した。LjMAX1 および MtMAX1b 発現菌体では 19-ヒドロキシカーラクトン（19-hydroxycarlactone，19-HO-CL）と CLA の生成が見られた。MtMAX1a 発現菌体では CL は減少したが，19-HO-CL や CLA は検出されなかった。LjMAX1 発現菌体では，19-HO-CL や CLA に加えて，SL と類似した UV スペクトルを持つ分子量 248 の化合物が生成した。インソース CID において本化合物は *m/z* 97 のフラグメントピークを与えたことから SL 誘導体であることが強く示唆された。現在, この SL 様化合物の構造解析を行うと共に LjMAX1, MtMAX1a および 1b 発現菌体から調製したミクロソーム画分を用いた CL の代謝実験を行っている。

strigolactone, MAX1, Lotus japonicus

講演番号：2D23a04
講演日時、会場：3 月 27 日 09:33～ D 校舎 23 会場

機能選択的ストリゴラクトンミミック『デブラノン』の選択性に関する詳察
Insights on selectivity of strigolactone mimic "debranones"
○福井 康祐、間下 大樹志、中村 英光、浅見 忠男（東大院 農生科 応生化）
○Kosuke Fukui, Okishi Mashita, Hidemitsu Nakamura, Tadao Asami (Dept. App. Biol. Univ. of Tokyo)

ストリゴラクトン（SL）は、近年植物ホルモンとしての機能が明らかとなってきたラクトン骨格を有する 4 環性アポカロテノイドであり、その主な機能は腋芽伸長を抑制することによる枝分かれの制御である。我々の研究グループではイネ SL 生合成変異体を応用したアッセイ系を用いて枝分かれ抑制化合物の探索を行い、フェノールとラクトン環からなる新規ストリゴラクトンミミック『デブラノン』の開発に成功した。SL は植物ホルモンとして植物体内で作用する他に、根から分泌され根共生菌の一種であるアーバスキュラー菌根菌（AM 菌）の菌糸分岐を誘導するとともに、ストライガやオロバンキといった根寄生植物の種子発芽を刺激する根圏情報伝達物質としても作用することが知られている。デブラノン類はフェノール上の官能基の位置と種類を適切に選択することにより、SL の多岐にわたる機能の一部を選択的に活性化できることをこれまでの本大会で報告してきた。今回の大会では、更にその選択性について詳細に調べた結果、植物種によって活性をもつデブラノンの構造に差があること、また SL の植物ホルモンとしてのいくつかの機能間でも最も活性の高いデブラノンの構造が異なることを明らかにできたので、それらの結果を報告する。また、天然型 SL が不斉点を有する光学活性物質であることから、合成 SL アゴニストである GR24 の各異性体が植物体や根寄生植物に与える影響を評価した論文が報告されたことを受け、いくつかの代表的な活性を有するデブラノンの光学分割を行ない、それぞれの SL 活性を評価したので、それらの結果も併せて報告する。

Strigolactone, Striga, Phytohormone

講演番号：2D23a05
講演日時、会場：3 月 27 日 09:44～ D 校舎 23 会場

植物病害抵抗性の抑制化合物の構造展開
Structure development of a chemical regulator for plant disease resistance
○栗本 哲哉、姜 凱、徐 銀卿、中村 英光、浅見 忠男（東大院・農生科）
○Tetsuya Kurimoto, Kai Jiang, Eun-kyung Seo, Hidemitsu Nakamura, Tadao Asami (Dept. Appl. Biol. Chem., Univ. of Tokyo)

【目的】植物は病原菌に対する免疫機構の一つとして、サリチル酸（SA）を介して誘導される全身獲得抵抗性（Systemic Acquired Resistance, SAR）を備えており、二次感染を防御していることが知られている。しかしそのメカニズムの詳細については、不明な点も多い。これまで SAR 機構の解明研究には BIT (1,2-benzisothiazol-3(2H)1,1-dioxide)や BTH (Benzo-(1,2,3)-thiadiazole-7-carbothioic acid S-methyl ester)などの SAR 誘導剤が活用されてきた。一方で誘導剤と同様に SAR の機構解明に有効であると予想される SAR シグナルをターゲットにする阻害剤は知られていなかった。そこで我々は SA が誘導する病害抵抗性阻害剤の探索研究に取り組み、これまでに数種類の阻害剤候補物質を報告してきた。それら化合物中で最も活性が高かったのが 4-phenyl-2-{[(3-(trifluoromethyl)anilino) methylidene)cyclohexane-1,3-dione（PAMD）である。PAMD は病害抵抗性阻害剤として高い活性を有していたが、同時に植物の生育阻害効果を示すことが特徴であった。そこで SAR 制御剤としての応用につなげるため、植物の生育阻害活性と病害抵抗性阻害活性との間の相関を調べる事を目的として、PAMD の構造展開を行うことにした。

【方法と結果】合成は、シクロヘキサンジオン化合物、オルトギ酸トリエチルとアニリンを原料として用いて 1 段階で行った。活性評価は、得られた PAMD 類縁体を *PR1*pro::*GUS* シロイヌナズナに処理し、GUS 染色とリアルタイム PCR を行う事で病害抵抗性のマーカー遺伝子である *PR1* の発現状況を調べることで行った。その結果、生育阻害活性が大きく低下したにもかかわらず、SAR 阻害効果が PAMD と同等の化合物を見いだすことができた。また、植物の生育を大きく阻害する一方で、SAR 誘導活性を有すると考えられる化合物を見出すことができた。以上の結果は PAMD の生育阻害活性と病害抵抗性誘導阻害活性は分離可能であること、そして今回得た化合物が新規の作用点を有する特異的な阻害剤の有用な候補となりうることを示唆している。

salicylic acid, Systemic Acquired Resistance, PAMD

講演番号：2D23a06
講演日時、会場：3 月 27 日 10:05～ D 校舎 23 会場

種子の二次休眠を打破する新奇アブシジン酸受容体アンタゴニスト

Novel antagonists of abscisic acid receptors as secondary dormancy-breakers

○三村 尚毅[1]、岡本 昌憲[2]、朝比奈 尚紀[3]、川島 徳晃[3]、大西 敏幸[1,3,4]、轟 泰司[1,3,4]（[1]静大院農、[2]鳥取大乾燥地研究センター、[3]静大農、[4]静大グリーン研）
○ Naoki Mimura[1], Masanori Okamoto[2], Naoki Asahina[3], Noriaki Kawashima[3], Toshiyuki Ohnishi[1,3,4], Yasushi Todoroki[1,3,4] ([1]Grad. School Agric., Shizuoka Univ., [2]ALRC, Tottori Univ., [3]Faculty Agric., Shizuoka Univ., [4]RIGST, Shizuoka Univ.)

高温ストレスを受けたシロイヌナズナの種子は，アブシジン酸（ABA）によって発芽が阻害される（二次休眠）。ABA は，その受容体 PYR/PYL/RCAR（PYL）のアロステリックモジュレーターとして機能し，PYL とタンパク質脱リン酸化酵素 PP2C を結合させ，その活性を阻害することで，自身のシグナルを下流へ伝達する。先ごろ演者らは，PYL と PP2C との結合を妨害し，ABA シグナルを遮断する化合物，PYL アンタゴニスト AS6 を構造基盤設計し合成した（*Nat Chem Biol* **2014**, *10*, 477-482）。ABA の C3'位に硫黄原子を介して直鎖ヘキシル基を付加した AS6 は，他の ABA 結合タンパク質（代謝酵素や輸送体）にほとんど影響を及ぼさずに，ABA と同程度の強さで PYL と結合し，外から与えた ABA の作用だけでなく，浸透圧ストレスや乾燥ストレスによって誘導される ABA 応答も抑制することができる。PYL を介した ABA シグナル伝達経路から二次休眠が誘導されるとすれば，AS6 はそれを打破できると考えられるが，実際にはそのような活性を示さなかった。これは，PYL を介さない未知のシグナル伝達経路から二次休眠が誘導されている，もしくは AS6 には二次休眠を打破するほどの PYL 阻害活性がないためかもしれない。

本研究では後者の可能性に焦点を当て，AS6 よりも PYL 阻害活性を強化した数種類の新奇 ABA アナログを構造基盤設計し，短工程で合成した。ABA の C4'位にプロピニルエーテル基を介して芳香環が結合したこれらの化合物は，その付加した構造によって，重要な PYL-PP2C 間相互作用の妨害と PYL との新たな相互作用の獲得を同時に狙っている。等温滴定カロリーメータを用いてこれらの化合物と PYL との解離定数を測定すると，ABA および AS6 のそれよりも 1/10 ほど小さく，PYL 親和性が 10 倍高いことがわかった。また，シロイヌナズナの生育適温である 22℃において，外から与えた ABA の種子発芽阻害作用をこれらの化合物は AS6 よりも 10 倍強く抑制した上，ABA の 10 当量処理によって ABA 作用を完全に打ち消し，発芽のタイムコースが未処理区のそれと同程度まで回復した。さらに，播種後 48 時間の発芽率が 22℃よりも約 50%低下する 29℃においても，30 μM の濃度で処理した場合に 22℃とほぼ変わらない発芽を示し，二次休眠を打破した。

Plant hormone, Abscisic acid, Secondary dormancy

講演番号：2D23a07
講演日時、会場：3 月 27 日 10:16～ D 校舎 23 会場

6-nor-ABA と 7'-nor-ABA の ABA 受容体サブタイプ選択性

ABA receptor subtype selectivity of 6-nor-ABA and 7'-nor-ABA

○竹内 純[1]、大西 利幸[1]、轟 泰司[1,2,3] ([1]静大院農、[2]静大院創造、[3]静大グリーン研)
○ Jun TAKEUCHI[1], Toshiyuki OHNISHI[1], Yasushi TODOROKI[1,2,3] ([1]Grad. School Agric., Shizuoka Univ., [2]Grad. School Sci. Technol., Shizuoka Univ., [3]RIGST)

アブシジン酸（ABA）は種子休眠や乾燥などの環境ストレス応答において重要な役割を担っている植物ホルモンである。シロイヌナズナにおいて ABA のシグナル伝達は 14 種類の受容体 PYL（PYR1 および PYL1-13）と 7 種類のタンパク質脱リン酸化酵素 PP2C（AB1, ABI1 など）とのタンパク質間相互作用によって制御されている。各種 PYL サブタイプは機能重複している一方で，組織や生育段階において発現パターンが異なることから，特定の生理作用においては機能分担していることが示唆されている（例えば，根における ABA 応答には PYL8 が重要）が，その詳細については未だよく分かっていない。PYL サブタイプを選択的に活性化できる化合物はこの問題を解決する上で有用な化学ツールになると考えられる。そこで演者らは，PYL-ABA 結晶構造と各種 PYL のアミノ酸アライメントに基づいて，ABA 構造アナログがサブタイプ選択的アゴニストとして機能する可能性について検討した。

ABA は受容体ポケットに結合後，ゲートループおよびポケット上部に位置するアミノ酸残基との疎水性相互作用を駆動力として PYL のゲート閉鎖を誘導し，PP2C との結合表面を形成する。この疎水性相互作用には ABA の 6 位および 7'位メチル基が重要な役割を担っている。PYL サブタイプ間でゲート閉鎖に関与するアミノ酸残基を比較すると，ポケット上部のアミノ酸残基が dimeric 受容体（PYR1 と PYL1-3）ではいずれも Val であるのに対して，monomeric 受容体（PYL4-13）では Leu または Ile に置換されていた。そこで，monomeric 受容体では嵩高い Leu/Ile 側鎖が疎水性相互作用を助長して，6 位または 7'位メチル基を欠損した ABA アナログ（6-nor-ABA，7'-nor-ABA）でも PYL のゲート閉鎖を誘導できるかもしれないと考え，両化合物を合成した。

大腸菌発現系により調製した PYL と HAB1 を用いて PP2C 活性試験を行ったところ，予測とは異なり，6-nor-ABA は PYL3, 5, 6 に対して，7'-nor-ABA は PYL2, 3, 5, 6, 10 に対して ABA よりも弱いアゴニスト活性を示した。このことから，ABA アナログの PYL サブタイプ選択性はリガンド結合ポケット付近のアミノ酸残基だけで決まるわけではないことが強く示唆された。ここで，よりサブタイプ選択性が高かった 6-nor-ABA に着目し，最も強いアゴニスト活性を示した PYL5 に対する解離定数を測定したところ，ABA の約 1/20 の親和性を有することが分かった。つまり，6-nor-ABA は ABA の 20 当量処理することで，ABA と同程度に PYL5 を活性化できると考えられる。そこで，シロイヌナズナ種子発芽および根の伸長に対する 6-nor-ABA の活性を調べたところ，ABA と同程度の阻害活性を示すには ABA の 100 当量以上を必要としたことから，発芽時や根の ABA 応答においては，PYL5 は主要な ABA 受容体ではないことが示唆された。現在，乾燥耐性誘導に対する 6-nor-ABA の効果についても検討中である。

Abscisic acid, ABA, agonist

講演番号：2D23a08
講演日時、会場：3 月 27 日 10:27～ D 校舎 23 会場

ABA 代謝不活性化酵素 CYP707A を阻害する新奇アブシナゾール
A novel abscinazole as a specific inhibitor of ABA 8'-hydroxylases
○増田 淳也[1]、久保尻 由貴[1]、轟 泰司[1,2] ([1]静岡大院農、[2]静大グリーン研)
○Junya MASUDA[1], Yuki KUBOJIRI[1], Yasushi TODOROKI[1,2] ([1]Grad. School Agric., Shizuoka Univ., [2]RIGST)

アブシジン酸（ABA）代謝不活性化酵素（CYP707A）の選択的阻害剤アブシナゾール E2B（Abz-E2B）は，植物矮化剤ウニコナゾール（UNI）の塩素を 1,2,3-トリアゾール環に置換し，これにジエチレングリコール鎖を導入することで UNI の矮化活性（ジベレリン生合成酵素 CYP701A 阻害活性）を除去した化合物である。この化合物を一過性処理したリンゴ実生や芝は，ABA 内生量の一時的増加による気孔の閉鎖等を通じて乾燥に対する耐性を獲得するため, Abz-E2B は乾燥耐性付与剤としての利用が期待されている。今回演者らは，アブシナゾールの実用利用を念頭に置いて分子設計を見直し，Abz-E2B と同等かそれ以上の CYP707A 選択的阻害能を持ち, より短ステップ且つ高収率で合成可能な新奇アブシナゾールの創出を目指した。

Abz-E2B の機能発現には，P450 阻害に必須な 1,2,4-トリアゾール環と酵素選択性を生み出しているエチレングリコール鎖が必要不可欠である。一方，1,2,3-トリアゾール環は CYP707A 阻害能への寄与が明らかでないため，他の構造に改変できる可能性がある。そこで演者らは，この官能基を合成が容易でシンプルな構造であるアセチレンに変換した新奇アブシナゾール 4 種を設計した。これらは何れも 6 ステップで総収率 15-25%と，Abz-E2B（9 ステップ，総収率 1%）よりも簡便且つ高収率で得られた。

この中の 1 種は，(–)-Abz-E2B と同等の組換えシロイヌナズナ CYP707A3 阻害活性を示した上，潜在的なオフターゲットであるジベレリン生合成酵素（組換えイネ CYP701A6）に対する阻害活性が(–)-Abz-E2B と同様に低く，高い酵素選択性を維持していることがわかった。さらに，この化合物は ABA によるシロイヌナズナ種子発芽阻害活性を著しく増強し, その効果の強さは(–)-Abz-E2B のそれの少なくとも 10 倍以上であることがわかった。以上，Abz-E2B より高活性かつ高収率の新奇アブシナゾールの創出に成功した。

abscisic acid, abscinazole

講演番号：2D23a09
講演日時、会場：3 月 27 日 10:38～ D 校舎 23 会場

ブラシノライドアゴニスト/アンタゴニストのインシリコスクリーニング
In silico screening of brassinolide agonist / antagonist
○杉浦 愛理、瀧本 征佑、南 沙紀、中川 好秋、宮川 恒 (京大院農)
○Airi Sugiura, Seisuke Takimoto, Saki Minami, Yoshiaki Nakagawa, Hisashi Miyagawa (Kyoto Univ.)

【目的】ブラシノライド (BL) を代表とする植物ステロイドホルモンであるブラシノステロイド (BR) は，極微量で伸長成長や細胞分裂を促進することから，果実重量の増加をもたらす植物調節剤として利用ができる．また，様々なストレス耐性を誘導することから，寒冷地などにおける作物栽培にも応用が期待される．しかし BR の高い合成コストが利用の障壁となっている．一方で昆虫やほ乳類のステロイドホルモンの非ステロイドアゴニストが発明され農薬，医薬として実用化された例のように，BR のステロイド部分を構造簡略化できれば新規活性化合物開発につながると考えられ，構造活性研究が行われてきた．近年になって，コンピューターの計算能力の向上，化合物構造データベースの拡充などにより，バーチャルなリード (あるいはヒット) 化合物の探索手法 (インシリコスクリーニング) が開発され，BR 研究においても，2011 年に BL 受容体 BRI1 の立体構造[1,2]が，さらに 2013 年に BRI1 と補助受容体 SERK1 との複合体立体構造[3]が X 線解析によって解明され，インシリコスクリーニングを用いた分子設計が可能な状況になっている．本研究では，BL のファーマコフォアに基づいたインシリコスクリーニングによって非ステロイド型アゴニストあるいはアンタゴニストの探索を行った．
【方法】これまでに得られている BR の構造活性相関に関する知見，および BL-受容体複合体から得られる情報をもとにしてファーマコフォアを作成し，インシリコスクリーニングソフトウエアの一つである LigandScout (inte:ligand 社) を用いてスクリーニングを行った．データーベースは，ZINC の Web サイト(http://zinc.docking.org)からダウンロードした約 2000 万の化学構造に対して最大 200 個の立体構造を発生させて作成した．このデーターベースに対するインシリコスクリーニングを行って 83 個の候補化合物を得た．さらに，受容体に対する化合物のドッキングシミレーションを用いて受容体への結合様式を精査し，購入可能な 15 個の化合物に絞り込んだ．生理活性は，イネ葉身屈曲試験法を用いて測定した．
【結果および考察】
スクリーニングによって得られた 15 個の化合物の中に，BR アゴニスト活性を示すものは見いだせなかったが，アンタゴニスト活性を持つ化合物を３個発見することができた．そのうちの２つは，置換基の異なる 6-(2-(5-phenylfuran-2-yl)vinyl)pyrimidin-2(1*H*)-one 誘導体であった．
[1] M,Hothorn, 2011, *NATURE*, 474, 467-471, [2] J.She, 2011, *NATURE*, 474, 472-476
[3] Santiago, 2013, *Science*, 6148, 889-892

brassinolide, brassinosteroid, in silico screening

講演番号：2D23a10
講演日時、会場：3 月 27 日 10:49～ D 校舎 23 会場

新奇エチレン様活性物質 KUT15 の生理作用解析
Characterization of a novel ethylene mimic KUT15
○堅固山 裕子[1,2]、北畑 信隆[3]、鈴木 優志[1,2]、安藤 卓也[1,2]、浅見 忠男[1,2] ([1]東大院・農生科・応生化、[2]科学技術振興機構・CREST、[3]東理大・理・応用生物科学科)
○Yuko KENGOYAMA[1,2], Nobutaka KITAHATA[3], Masashi SUZUKI[1,2], Takuya ANDO[1,2], Tadao ASAMI[1,2] ([1]Dept. Appl. Biol. Chem., Univ. of Tokyo, [2]JST, CREST, [3]Appl. Biol. Sci., Tokyo Univ. of Science)

【背景と目的】
エチレンは植物の果実成熟や落葉落花を促進し、芽生えの形態形成に影響を与えるなど広範囲で植物の生長に関わる植物ホルモンである。また根寄生植物の自殺発芽を誘導する可能性も示唆されており、その点でも注目されている。しかし気体であるため、成長制御剤として農業利用を試みる局面においては、濃度調節の難しさや周囲への拡散といった問題が発生する。このような状況から、利用可能な新しい性質を有するエチレン制御剤が求められている。本研究においては、エチレン様活性を有するリード化合物 HJ2 の構造展開を行い、植物成長制御剤として実用可能性のある活性物質の探索とその機能解析を行った。

【方法と結果】
前回の報告では、HJ2 をリード化合物として構造展開した化合物群のエチレン活性評価と、エチレン活性を高めた KUT15 の明所における形態変化について報告した。今回、私たちは、KUT15 処理によるシロイヌナズナの遺伝子発現変動の観察と、KUT15 の作用点の検討を行った。
KUT15 は、エチレン活性の指標となる暗所における三重反応を活性評価に用いることで、HJ2 と比較して高活性を有すると結論付けた化合物である。KUT15 を処理したシロイヌナズナは、エチレン前駆体である ACC を処理した際と同様に、明所においてエチレン関連遺伝子発現量が変動する。またエチレン非感受性変異体 *ein2* に処理した場合エチレン様形態変化は見られないが、野性型に対してはエチレン生合成阻害剤 AIB との共処理で形態変化を促すこと、エチレン受容体阻害剤 STS との共処理の際は競合的に形態変化を促すことが判明し、この化合物の作用点は受容体近傍であることが示唆された。さらに、類縁体処理によりエチレンは発生しないこと、放射性同位体ラベルしたエチレンと受容体との結合が、この化合物及びその類縁体によって阻害されることを見出した。また、エチレンは植物のストレス耐性獲得に寄与するほか、根寄生植物ストライガの発芽誘導作用を有することが知られている。そこで本発表では、以上の実験結果に併せ、KUT15 処理によるシロイヌナズナの塩害耐性獲得性や、根寄生植物に関する発芽誘導性試験についての結果も報告する予定である。

ethylene, phytohormone, arabidopsis

講演番号：2D23a11
講演日時、会場：3 月 27 日 11:10～ D 校舎 23 会場

カルシウム依存性タンパク質キナーゼ CPK33 は FD をリン酸化しフロリゲン複合体形成を制御する
CPK33, a calcium-dependent protein kinase, is responsible for florigen complex formation via FD phosphorylation

○川本 望[1]、笹部 美知子[2]、遠藤 求[1]、町田 泰則[3]、荒木 崇[3]([1]京大・院・生命、[2]弘前大・農学生命、[3]名大・院・理)
○Nozomi KAWAMOTO[1], Michiko SASABE[2], Motomu ENDO[1], Yasunori MACHIDA[3], Takashi ARAKI[3] ([1]Kyoto Univ., [2]Hirosaki Univ., [3]Nagoya Univ.)

フロリゲンである FT は葉の維管束篩部伴細胞において発現した後、翻訳され、茎頂へと輸送される。茎頂において FT は bZIP 型転写因子である FD と複合体を形成し、*APETALA1* (*AP1*) などの花芽形成に関わる遺伝子の発現を促進する。FD タンパク質の C 末端には FT との複合体形成に必要不可欠なリン酸化残基が存在する。我々はこれまでに FD の 282 番目のスレオニン(FD T282)がカルシウム依存性のタンパク質キナーゼである CDPK によってリン酸化を受け、FT との複合体形成がこのリン酸化に依存することを示してきた。このタンパク質の同定に向けて我々は解析を進めてきた。これまでに行った生化学的な解析から、FD のリン酸化には少なくとも 2 つの CDPK、CPK6 と CPK33 が関与することが明らかとなった。これら 2 つの CDPK は、茎頂分裂組織において発現しており、FD と相互作用し、FD T282 をリン酸化する。また T-DNA 挿入変異体を取得し、花成表現系を調べたところ、軽微ながら花成遅延表現型を示した。上記の結果に加えて、*ft* や *fd* と同様に CPK33 の変異は *lfy* 表現系を亢進し、*cpk33; lfy* は *ft; lfy* や *fd; lfy* と類似した表現系を示した。以上の解析から、生化学的な手法によって同定した CPK33 は FD T282 のリン酸化を介してフロリゲン複合体形成を可能にすることで、花成と花芽形態形成を制御する重要なタンパク質キナーゼであると強く示唆された。

flowering, calcium-dependent protein kinase, phosphorylation

講演番号：2D23a12
講演日時、会場：3 月 27 日 11:21～ D 校舎 23 会場

新規植物カルス誘導化合物 FPX と新規植物成長促進化合物 PPG の発見と機能解析

Identification and physiological function of FPX as a novel plant callus inducible compound and PPG as a novel compound of promoter for plant growth

○田中 翔太[1,2]、藤岡 昭三[1]、久城 哲夫[2]、長田 裕之[1,3]、浅見 忠男[4,5]、中野 雄司[1,3,5]（[1]理研、[2]明治大院・農芸化学、[3]理研・CSRS、[4]東大院・農化生、[5]JST CREST）

○Shota Tanaka[1,2], Shozo Fujioka[1], Tetsuo Kushiro[2], Hiroyuki Osada[1,3], Tadao Asami[4,5], Takeshi Nakano[1,3,5] ([1]RIKEN, [2]Agric. Chem., Meiji univ., [3]CSRS, RIKEN, [4]Dept. Biol. Sci., Univ. of Tokyo, [5]JST CREST)

【背景・目的】

植物の成長をポジティブに制御する化合物の探索は、植物における未知の成長メカニズムを解明する為の有用なツールになると期待されるだけでなく、実用作物への応用展開が期待出来る。本研究では、植物成長の様々なステージで促進的な活性を持つブラシノステロイド（BR）の情報伝達経路に特異的に作用する化合物の発見を目的として、アラビドプシス BR 情報伝達変異体の胚軸伸長を指標にし、理化学研究所のケミカルライブラリーNPDepo から新規な生理活性化合物のケミカルスクリーニングを行った。

【方法・結果】

BR 情報伝達因子の機能獲得型変異体 *bil* 群を、ライブラリー化合物含有培地上で暗所発芽させ、発芽 7 日目の胚軸伸長を指標に化合物の活性を解析した。その結果、野生型には胚軸伸長阻害活性を示しながら、BR 情報伝達変異体(*BRI1-OX*、*bil5*、*bil8*)は耐性を示す低分子化合物 FPX が得られた。これらの機能より FPX は BR 情報伝達因子の活性化剤としての機能を持つと考察された。

FPX 存在下において、野生型アラビドプシスを明所発芽後に数週間成長させた結果、カルス形成が引き起こされることが明らかとなった。このカルス誘導活性はイネ、ポプラ、トマト、ダイズ、キュウリにおいても認められた。アラビドプシスのカルスの内生成分について LC-MS で解析した結果、植物体において FPX が加水分解を受け、CPX と PPG に代謝されることが明らかとなった。そこでアラビドプシス胚軸切片による活性解析を行った結果、CPX 単剤でカルス形成の活性持つことに加え、CPX/PPG 共処理条件でカルス形成が促進される傾向が観察され、PPG はカルスの増殖促進活性を持つと考察された。

PPG 単剤存在下の明所条件で野生型アラビドプシスを発芽させた結果、ロゼッタ葉面積が約 200%、側根数が約 200%に増加する植物成長の明瞭な促進活性が観察された。さらに PPG 含有水で生育させたイネにおいても背丈と分けつの伸長促進が観察された。PPG は既知の植物ホルモン、植物成長促進剤とは全く異なる化学構造を持つ化合物であること、その活性が植物の形態を歪にさせることなく大きくする活性を持つことは、PPG が植物成長の新たなメカニズムを明らかにするための有用なツールとなるだけでなく、実用的にも有用な機能を持つ化合物であることを期待させる。現在、発現応答性遺伝子の RT-PCR 解析、ケミカルビーズ法によるターゲットタンパク質の探索の試行などを開始し、PPG の作用機作についての解析を進めている。

Chemical screening, Plant growth regulators, Callus induction

講演番号：2D23a13
講演日時、会場：3 月 27 日 11:32～ D 校舎 23 会場

植物新規アシルスペルミジン類の探索と機能解析

Search and characterization of novel acylated spermidine in plants

○山野 博之[1]、岩川 純也[1]、山岸 卓矢[1]、彦坂 政志[1]、中村 英光[1]、前田 哲[2]、森 昌樹[2]、浅見 忠男[1] ([1]東京大農、[2]農業生物資源研究所)
○Hiroyuki Yamano[1], Junya Iwakawa[1], Takuya Yamagishi[1], Masashi Hikosaka[1], Hidemitsu Nakamura[1], Satoru Maeda[2], Masaki Mori[2], Tadao Asami[1] ([1]Univ. of Tokyo, [2]National Institute of Agrobiological Sciences)

背景・目的

イネアクチベーションタギングラインから見出された *Spotted leaf 18*（*Spl18*）は、一定の生育ステージになると自発的に疑似病斑を生成するラインであり、この *Spl18* の原因遺伝子であるアシルトランスフェラーゼをコードする *OsAT1* 遺伝子を過剰発現させたイネでは、*Spl18* と同じ疑似病斑を生成する。予備試験において *OsAT1* 過剰発現体中にポリアミンの一種であるスペルミジン(Spd)の数種類の誘導体が蓄積することを確認したので、LC-MS/MS にてその構造解析を行った。その結果、これらは N^4-(10-hydroxylauroyl)- spermidine（4N10HydLau）と N^4-(11-hydroxylauroyl)spermidine（4N11HydLau)という 2 種のアシル化スペルミジンであると推定された。

ポリアミン類が植物の生理やストレス応答に関与していることは広く知られている。アシル化スペルミジンの植物内での役割はわかっていないが、これらがポリアミン類の役割の一部を担っている可能性がある。また我々のグループではアシル化スペルミジンとして構造推定した 4N10HydLau と 4N11HydLau を投与したイネ中で病害抵抗性が誘導されることを見出している。そこで、これら化合物の植物内での機能解析のために、各条件下での定量を行った。

方法・結果

各種条件にて生育したイネをメタノール抽出後、LC-MS/MS 分析に供し 4N10HydLau および 4N11HydLau の定性・定量分析をおこなった。4N10HydLau, 4N11HydLau が野生型イネに内生していることを確認した。これら化合物は、*OsAT1* 過剰発現体イネには野生型に対して 5-10 倍蓄積していることがわかった。イネに塩害ストレス、乾燥ストレスを与えた処理区や Spd を投与した処理区では内生量の変化が見られなかった。現在、各条件の再検討および他植物体における内生の確認を行っている。

spermidine, disease resistance, rice

講演番号：2D23a14
講演日時、会場：3 月 27 日 11:43～ D 校舎 23 会場

オカボノクロアブラムシによるハルニレゴール形成の適応的意義に関する研究

Study on adaptive significance of elm gall formation by an aphid

○武井 麻美[1]、伊藤 晋作[2]、石毛 太一郎[3]、田中 啓介[3]、鈴木 義人[1]([1]茨城大・農、[2]東農大・応生科・バイオ、[3]東農大・ゲノムセ)
○Mami TAKEI[1], Shinsaku ITO[2], Taichiro ISHIGE[3], Keisuke TANAKA[3], Yoshihito SUZUKI[1] ([1]Dept. Biores. Sci., Ibaraki Univ., [2]Dept. Bioscience., Tokyo Univ. of Agr., [3]NODAI Genome Research Center, Tokyo Univ. of Agr.)

【目的】ゴールとは昆虫などの刺激により植物組織の成長や分化に異常が起きて形成される組織である。我々はオカボノクロアブラムシ（*Tetraneura nigriabdominalis*）がハルニレ（*Ulmus davidiana* var. *japonica*）に形成するゴールの適応的意義について追及している。形成されたゴール内ではアブラムシがシェルターや摂食対象として利用しているため，ゴールは昆虫に対する抵抗性を失っているとの仮説を立て，典型的な抵抗性反応である揮発性物質の生産を調べたところ，葉では perillene や (*Z*)-3-hexenyl butanoate などの揮発性物質がジャスモン酸（JA）に応答して生産されたのに対して，ゴールでは JA 処理をしても生産誘導されないことが判明した。今回，我々は葉とゴールにおける JA の生産能や応答性に違いがあるかどうかを解析した。また，抵抗性反応に関わる遺伝子の探索およびゴールの新たな適応的意義の追及を目的として，RNA-seq 解析による網羅的な遺伝子発現解析を行った。

【結果】先ず，ハルニレの葉を食害するニレチュウレンジ（*Arge captiva*）を用いて，摂食に対する応答を調べたところ，JA 及びジャスモン酸イソロイシン（JA-Ile）の内生量が増加し，perillene などテルペン類の揮発性物質が誘導されたことから，一般的な植物と同様に JA を介した防御応答が機能していると考えられた。また，葉とゴールに傷害を与えたところ，どちらも JA 及び JA-Ile 内生量が増加したため，ゴールにおいてもジャスモン酸類の生合成は正常に機能しており，シグナル伝達に違いがあると考えられた。JA によって誘導される JA 生合成遺伝子の *LOX*, *AOS*, *AOC*, *OPR3*, シグナル伝達に関わる遺伝子 *MYC*, *JAZ* の発現量をリアルタイム PCR で測定したところ，JA に対する応答性が葉とゴールで異なっており，全体的に葉と比較してゴールで誘導が抑制される傾向が認められた一方で，逆の傾向を示す遺伝子も存在した。RNA-seq 解析の結果，クラスター解析の結果得られた総コンティグ数 82,819 のうち，JA 処理後 1 時間で葉において有意に発現量が増加するものが 1700 程度認められたのに対して，ゴールでは 300 程度にとどまった。また，JA 処理で発現量が減少したものは葉では 600 程度存在したが，ゴールでは 20 ほどであり，全体としてゴールにおける JA 応答性の低下が確認された。なお，上記リアルタイム PCR での結果と，RNA-seq による結果は高い一致が認められ，RNA-seq による定量性が支持される結果となった。

insect gall, jasmonic acid, adaptive significance

講演番号：2D23a15
講演日時、会場：3 月 27 日 11:54～ D 校舎 23 会場

ジャスモン酸輸送体による非傷害部位における傷害応答抑制機構
The excess wounding response in undamaged parts is suppressed by jasmonic acid transporter.
○石丸 泰寛[1]、及川 貴也[1]、鈴木 健史[1]、松浦 英幸[2]、高橋 公咲[2]、浜本 晋[3]、魚住 信之[3]、清水 崇史[4]、瀬尾 光範[4]、太田 啓之[5]、上田 実[1] ([1]東北大理、[2]北海道大農、[3]東北大工、[4]理研 CSRS、[5]東工大生命理工)
○ Yasuhiro Ishimaru[1], Takaya Oikawa[1], Takeshi Suzuki[1], Hideyuki Matsuura[2], Kosaku Takahashi[2], Shin Hamamoto[3], Nobuyuki Uozumi[3], Takashi Shimizu[4], Mitsunori Seo[4], Hiroyuki Ohta[5], Minoru Ueda[1] ([1]Tohoku Univ. Sci., [2]Hokkaido Univ., [3]Tohoku Univ. Eng., [4]Riken, [5]Tokyo Tech. Univ.)

ジャスモン酸（JA）は，植物の傷害時における生体防御機構の中心に位置する植物ホルモンである一方で，植物の成長や発生を調節する化合物でもある．それゆえ，過剰な JA は植物の正常な生育を阻害する．また，JA の自然拡散しやすい特性は，傷害時の素早い応答に適しているが，非傷害部位への不必要な JA 移行も容易にしてしまう．我々は，JA 輸送体が傷害時に拡散する JA を適材適所に再配置して過剰な JA 応答を制御しているのではないかと考え，シロイヌナズナを用いて解析を行った．

これまで，我々は卵母細胞を用いた実験によりグルコシノレート輸送体（GTR1，GTR2）が，ジベレリンや JA-イソロイシン（Ile）を輸送すること，*GTR1* が JA 処理により発現誘導することを明らかにした．さらに詳細に GTR1 の JA-Ile の輸送活性を調べたところ，GTR2 に比べ 5.5 倍高いことが分かった．また，マイクロアレイデータから，NRT1/PTR ファミリーの中で GTR1 だけが JA 処理により発現誘導されることから，GTR1 は傷害時に細胞外から細胞内へ積極的に JA-Ile を取り込んでいると考えられる．

通常条件では，GTR1 は維管束とその周辺の葉肉細胞に発現することで，グルコシノレートの篩管への積み込みを行っていることが報告されているが，傷害時における GTR1 の空間的な発現部位は明らかになっていない．そこで，*GTR1promoter-GUS* 植物を用いて傷害実験を行ったところ，傷害部位に加え，傷害部位に隣接する非傷害部位の維管束とその周辺の葉肉細胞において強い発現がみられた．一方で，非傷害部位では，維管束とその周辺の葉肉細胞に発現が観察できた．

次に，*gtr1* 欠損株を用いた傷害実験を行った．重水素ラベルした JA-Ile あるいは JA を傷害部位に投与した結果，*gtr1* 欠損株では野生株に比べ重水素ラベル化 JA-Ile の篩管への取込み量は 6 分の 1，重水素ラベル化 JA の取込み量は，130 分の 1 にまで減少していた．植物体内では，GTR1 は JA-Ile に比べ JA の輸送活性が高いことを示唆していると共に，傷害部位の篩管への JA-Ile や JA の積み込みは GTR1 を介して行われていると考えられる．さらに，*gtr1* 欠損株の傷害時における JA 応答遺伝子の発現変化を野生株と比較したところ，傷害部位では *VSP1* が，非傷害部位では，*AOS*，*LOX2*，*OPR3*，*OPCL*，*JAR1*，*MYC2*，*PDF1.2*，*THI2.1* の発現量が増加していた．*gtr1* 欠損株の非傷害部位では，過剰な JA-Ile や JA が拡散したために，WT より発現量が増加したと考えられる．
本研究により， GTR1 が非傷害部位へ拡散する JA を篩管内に取り込み，非傷害部位での過剰な傷害応答を制御する輸送体であることを見出した．

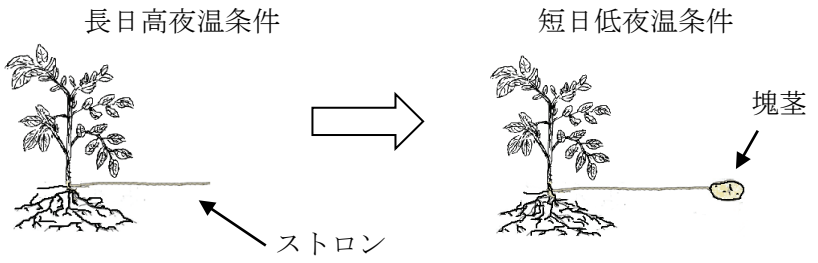
Jasmonic acid, transporter, GTR1

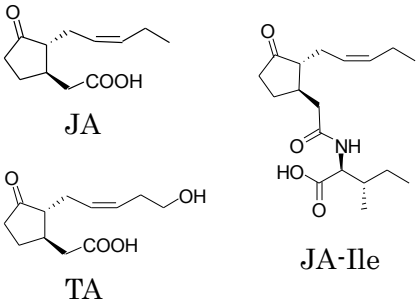
講演番号：2D23p01
講演日時、会場：3 月 27 日 14:00～ D 校舎 23 会場

バレイショ塊茎形成におけるジャスモン酸類の働き
Functions of jasmonate in potato tuberization
○井上 悠敬[1,2]、高橋 公咲[1,2]、崎浜 靖子[1,2]、松浦 英幸[1,2] ([1]日本農芸化学会、[2]北海道大学)
○Yutaka INOUE[1,2], Kousaku TAKAHASHI[1,2], Yasuko SAKIHAMA[1,2], Hideyuki MATSUURA[1,2]
([1]JSBBA, [2]Hokkaido Univ.)

【研究背景】

バレイショ *(Solanum tuberosum)* は小麦、イネ、トウモロコシに次ぐ主要作物である。食用部である塊茎の形成が日長の影響を受けることは古くから知られ、多くの研究によってその詳細な制御機構が明らかにされてきた。長日高夜温条件下では、茎の基部に近い部分から枝分かれしたストロンと呼称される地下茎が水平方向へ伸長する。地上部が短日低夜温条件に晒されるとストロンの先端が肥大して塊茎が形成されるが，この際に起こるジベレリン含量の減少が重要とされている。また，植物の傷害応答等に関わることで知られるジャスモン酸(JA)類が重要な役割を担うことも知られている。一般的に，JA 類のシグナル伝達は活性型であるジャスモン酸イソロイシン(JA-Ile)とその受容体 COI1 を介して行われる。しかし塊茎形成においては，1988 年に単離された 12-OH-JA(ツベロン酸，TA)をはじめとする多くの JA 類が活性を有することが明らかとなっており，JA-Ile 非依存的な未知のシグナル伝達経路が存在する可能性がある。本研究は，バレイショの塊茎形成における JA 類の働きの解明を目的とする。





【結果】

馬鈴薯茎断片培養法により作成した茎断片を用いた塊茎形成誘導試験の結果、JA が JA-Ile よりも強く塊茎形成を誘導し，ジベレリンの阻害に関しても同様の結果が得られた。このことから，JA-Ile 非依存的なシグナル伝達経路の存在が示唆された。また，長日/短日条件で生育させたバレイショの分析から，JA 類のうち TA 及びその配糖体である TA グルコシドの内生量が，JA, JA-Ile よりもはるかに多いことを確認した。現在，これら JA 類のうち植物体内で実際に活性本体として働く物質を特定するための実験を行っている。

potato, jasmonate, plant hormone

講演番号：2D23p02
講演日時、会場：3 月 27 日 14:11～ D 校舎 23 会場

12-オキソファイトジエン酸（OPDA）の代謝産物の合成と植物界におけるその存在

Synthesis of 12-oxo-phytodienoic acid metabolites and the existence in plants

○内山 明[1]、大鹿 遵[1]、梶原 章志[1]、井之口 曜[2]、高橋 公咲[3]、松浦 英幸[3]（[1]北海道大学院農学院、[2]北海道大学農学部、[3]北海道大学大学院農学研究院）
○ Akira UCHIYAMA[1], Jun OSHIKA[1], Akiyuki KAJIWARA[1], Hikari INOGUCHI[2], Kosaku TAKAHASHI[3], Hideyuki MATSUURA[3] ([1]Graduate School of Agriculture, Hokkaido University, [2]School of Agriculture, Hokkaido University, [3]Research Faculty of Agriculture, Hokkaido University)

【研究背景】

12-Oxophytodienoic acid (OPDA) は植物ホルモンの一種であるジャスモン酸(JA)の生合成中間体であり、JA とは異なる生理活性を持つことが示唆されているが、OPDA の代謝産物に関しては情報が少ない。JA 類においては JA と各アミノ酸の縮合体や、JA の 12 位の末端が水酸化された 12-hydroxyjasmonic acid （12-OH-JA）が植物体内で機能を有することが報告されている。OPDA においても同様に OPDA とアミノ酸の縮合体や、OPDA の 18 位の末端が水酸化された 18-OH-OPDA が何らかの機能を有するのではないかと考えられる。リノレン酸から OPDA への生合成反応を触媒する酵素の一つに、アレンオキシドシクラーゼ（AOC）がある。当研究室ではアマ種子から得られる粗酵素溶液とヒメツリガネゴケ(*Physcomitrella patens*)由来の組換え PpAOC を用いた OPDA の立体選択的な酵素合成法を確立している[1]。本研究においては上記の酵素合成法を用いて OPDA と各アミノ酸の縮合体を合成するなど、OPDA の代謝産物を特定することを目的とした。

【方法・結果】

触媒として chloroformic acid ethyl ester を用い、リノレン酸とイソロイシン、バリン、フェニルアラニンおよびグリシンをそれぞれ縮合させた。続いてこれらを基質とし、上記の酵素反応系を用いて OPDA と各アミノ酸の縮合体をそれぞれ 35 %、35 %、10 %および 30 %の収率で得た。またリノレン酸のカルボン酸部位がアルコールに変換した基質でも反応が進行した。これらの実験に伴い、リノレン酸の末端が修飾を受けていても酵素環化反応が進行することを確認した。これらに加え、18-OH-OPDA の合成を進行中である。また、市販の[17,17,18,18,18-$^2H_5$]リノレン酸エチルを加水分解し、[17,17,18,18,18-$^2H_5$]リノレン酸を得た。これを上記酵素反応の基質として、[17,17,18,18,18-$^2H_5$]OPDA を得た。現在 OPDA 添加培地、[17,17,18,18,18-$^2H_5$]OPDA 添加培地および無添加の培地で植物を栽培し、UPLC Tof MS により得られる MS データを用いて主要成分解析により植物の代謝産物を同定する予定である。

【参考文献】

[1] Akiyuki KAJIWARA, Tatsuya ABE, Takahiro HASHIMOTO, Hideyuki MATSUURA, Kosaku TAKAHASHI, *Biosci Biotechnol Biochem*, **76** (12), 2325-2328, 2012

OPDA, jasmonic acid, plant hormone

講演番号：2D23p03
講演日時、会場：3 月 27 日 14:22～ D 校舎 23 会場

ビール酵母抽出物が誘導する植物の病害応答機構の生物有機化学的研究
Plant disease response induced upon treatment of beer yeast extract
○矢口 賢臣[1]、木南 朋久[2]、岩渕 千賀子[2]、北川 隆徳[2]、安原 貴臣[2]、高橋 公咲[1]、松浦 英幸[1]([1]北大院農、[2]アサヒグループホールディングス株式会社)
○Takaomi YAGUCHI[1], Tomohisa KINAMI[2], Chikako IWABUCHI[2], Takanori KITAGAWA[2], Takaomi YASUHARA[2], Kousaku TAKAHASHI[1], Hideyuki MATSUURA[1] ([1]Research Faculty of Agriculture, Hokkaidou Univ., [2]Asahi Group Holdings,Ltd.)

【目的】
安心安全な農産物の供給は重要な課題であり、天然由来の素材を用いた農作物の健全育成技術が検討されている。この事例として、ビール醸造後の酵母から調製した細胞壁資材の葉面散布はイチゴうどんこ病を抑制すると報告されており、食品由来のバイプロダクトを用いる点や植物が本来持っている抵抗力を引き出す点で秀でた技術と考えられるが、その作用機序の詳細は明らかでない。本研究では上記の生物活性を示したビール酵母細胞壁資材を用い、病害抵抗性の誘導機構を明らかにすることを目的とした。

【方法】
検定試料としてビール酵母から細胞壁を抽出し、得られた細胞壁を可溶化した資材を用いた。イネカルスは検定試料を培養液に処理し、48h 培養した。惹起されうる傷害応答経路を評価するため、植物内に蓄積するサリチル酸(SA)、ジャスモン酸(JA)ならびに両化合物の合成経路の主要中間体、代謝産物の蓄積量を非処理のコントロール植物と比較した。目的化合物の分析は UPLC-MS/MS で行い、重水素ラベル物質を用いた内部標準法によって定量した。

【結果および考察】
酵母細胞壁を処理したイネカルスにおいて、フェニルアラニン(Phe)、12-hydroxyJA-Ile、アゼライン酸(Aze)が有意に増加した。Phe の増加はフェニルアラニンアンモニアリアーゼ(PAL)を活性化し、植物体におけるフラボノイド系の二次代謝産物の増加や細胞壁の硬化に関すると推察できる。JA の代謝産物の一つである 12-hydroxyJA-Ile が有意に増加し、JA 応答による病害抵抗性が誘導されると推察した。また、SA 応答による全身移動性シグナル物質として作用する Aze が増加した。以上より、酵母細胞壁の植物への処理は、SA 応答と JA 応答による病害抵抗性を同時に誘導すると推察された。また、JA 類はファイトアレキシンの産性に関与することが報告されており、イネのサクラネチンの蓄積量に影響を与えると推察された。

plant disease response, beer yeast, jasmonic acid, salicylic acid

講演番号：2D23p04
講演日時、会場：3 月 27 日 14:33～ D 校舎 23 会場

サツマイモ不定根形成に関わる制御因子の同定
Identification of genes involved in adventitious root formation in Sweet Potato

○伊藤 茜[1]、田部 記章[2,4]、小林 宏太[2,4]、大鳥 久美[2,4]、田茂井 政宏[1,2,4]、横田 明穂[3,4]、重岡 成[1,2,4] ([1]近畿大・院・バイオ、[2]近畿大・農・バイオ、[3]奈良先端大・先端科技セ、[4]JST, CREST)
○Akane ITO[1], Noriaki TANABE[2,4], Kota KOBAYASHI[2,4], Kumi OTORI[2,4], Masahiro TAMOI[1,2,4], Akiho YOKOTA[3,4], Shigeru SHIGEOKA[1,2,4] ([1]Dept. Adv. Biosci., Grad. Sch. Agr., Kinki Univ, [2]Dept. Adv. Biosci., Fac. Agr. Kinki Univ., [3]Ctr,Frontier Sci.Tech.,NAIST, [4]JST, CREST)

【目的】サツマイモはシンク能力が高く、バイオマス増産のための重要な作物である。光合成産物を蓄積する器官である塊根は不定根が肥大したデンプン貯蔵組織であり、不定根原基の発達はまず太さを、ついで長さと太さを増す。また、同じ節から遅れて出る原基は早めに最大径に達し、根長は短いことから塊根へ成長することは少ない。つまり、不定根原基の太さは不定根形成の初期に決定し、この大きさが塊根分化に際して重要な因子を形成する。しかし、これまでにゲノム未解読のサツマイモを用いてこの段階における遺伝子発現解析を行った例はほとんど報告されていない。そこで本研究はバイオマス増産サツマイモ作出のために、次世代シーケンサーを用いて不定根形成時に発現誘導される遺伝子を網羅的に解析した。

【方法・結果】人工気象室内（14 時間/10 時間　明期/暗期、400 μmol photons m^{-2} s^{-1}、28℃）で水耕槽を用いて栽培したサツマイモ（*Ipomoea batatas* (L.)Lam. cv. *Kokei14*）の茎および不定根原基のある節より抽出した total RNA から cDNA ライブラリーを作成し、Illumina Hiseq を用いて遺伝子発現比較解析を行った。リードデータを用いて Trinity を用いた de novo transcriptome アセンブルを行い、総 2 億 2 千コンティグ長、平均 869 bp からなる約 25 万のコンティグを得た。このうち、茎と比較して節での発現が 2 倍以上高い 6222 コンティグを抽出した。さらに、発現量の高い順から 100 程度の遺伝子に対して BLAST 検索によってアノテーションを行った。その中にはシロイヌナズナの胚発生に重要な PLT 転写因子のホモログ等が存在していた。現在これら遺伝子の完全長 cDNA の取得と、半定量的 RT-PCR によって不定根を含めた各組織における発現量を詳細に解析している。

sweet potato, adventitious root formation, RNA-seq

講演番号：2D23p05
講演日時、会場：3 月 27 日 14:44～ D 校舎 23 会場

シロイヌナズナ熱ショック転写因子 HsfA2 過剰発現によるサツマイモの酸化ストレス耐性強化
Overexpression of *AtHsfA2* confers oxidative stress tolerance in sweet potato

○小林 宏太[1,5]、田部 記章[1,5]、大鳥 久美[1,5]、伊藤 茜[2]、高安 聡子[4,5]、菊池 彰[4,5]、横田 明穂[3,5]、田茂井 政宏[1,2,5]、重岡 成[1,2,5]（[1]近畿大・農・バイオ、[2]近畿大院・農・バイオ、[3]奈良先端大・先端科技セ、[4]筑波大・遺伝子、[5]JST, CREST）
○Kota KOBAYASHI[1,5], Noriaki TNABE[1,5], Kumi OTORI[1,5], Akane ITO[2], Satoko TAKAYASU[4,5], Akira KIKUCHI[4,5], Akiho YOKOTA[3,5], Masahiro TAMOI[1,2,5], Shigeru Shigeoka[1,2,5] ([1]Dept. Adv. Biosci., Fac. Agr., Kinki Univ., [2]Dept. Adv. Biosci., Grad. Sch. Agr., Kinki Univ., [3]Ctr. Frontier Sci. Tech., NAIST, [4]GRC, Univ. of Tsukuba, [5]JST, CREST)

【目的】

移動の自由を持たない植物にとって乾燥や高温などの環境ストレスは生育および生産性に多大な影響を及ぼす。そのため、植物のストレス耐性能強化は生産性向上に繋がる。近年、食糧および燃料問題が危惧される中、分子育種により生産能およびストレス耐性能を向上させた作物に高い注目が集まっている。サツマイモ（*Ipomoea batatas*）はシンク能力が高く、光合成代謝産物を塊根へ大量に蓄積可能であることから、バイオマス増産のための重要な作物である。ところで、我々はこれまでにシロイヌナズナ熱ショック転写因子 HsfA2（AtHsfA2）は酸化的ストレス条件下において顕著に誘導されること、さらに細胞毒として酸化損傷を引き起こす活性酸素の消去酵素であるアスコルビン酸ペルオキシダーゼ（*APX*）、分子シャペロンである熱ショックタンパク質（*HSP*）および適合溶質としてだけでなく抗酸化物質として機能するガラクチノールの合成酵素であるガラクチノールシンテース（*Gol*S）の発現を誘導することで酸化ストレス耐性能獲得に寄与することを明らかにしてきた。そこで本研究では、酸化的ストレス耐性サツマイモの作出を目的として AtHsfA2 をサツマイモ内で過剰発現させた。

【方法・結果】

CaMV *35S* プロモーター制御下で *AtHsfA2* を発現させた形質転換サツマイモ（Pro_{35S}:*AtHsfA2-1, -2*）を作出した。qRT-PCR により、両形質転換体の葉で *AtHsfA2* が高発現していることを確認した。そこで、活性酸素種生成剤であるパラコート処理による酸化ストレス感受性試験を行ったところ、形質転換株は野生株と比較して感受性の低下を示し、クロロフィルの減少も顕著に抑制された。次に、通常条件下(28℃、400 µmol $m^{-2}s^{-1}$)での *Gol*S の発現を qRT-PCR によって解析した結果、形質転換株では野生株と比較して *Gol*S の発現上昇が認められた。さらに、形質転換株および野生株の葉または塊根における、糖アルコールおよびラフィノース属オリゴ糖を定量した。その結果、Pro_{35S}:*AtHsfA2* 株では両組織において高いガラクチノールの蓄積が認められた。また、定植後 100 日目の形質転換株の地上部および塊根部の生重量は野生株と同等の生育を示した。　以上の結果から、サツマイモでのシロイヌナズナ HsfA2 過剰発現は、酸化的ストレス耐性能強化に寄与することが明らかとなった。

sweet potato, oxidative stress tolerance, heat shock transcription factor

講演番号：2D23p06
講演日時、会場：3 月 27 日 15:05～ D 校舎 23 会場

抗菌タンパク質を発現するイネカルスの解析

Analysis of rice calli expressing antibacterial protein

○増村 威宏[1,2]、菊田 桃香[1]、佐生 愛[1]、重光 隆成[1]、森田 重人[1,2]、佐藤 茂[1,2] ([1]京都府大生命環境、[2]京都農技セ・生資セ)
○Takehiro MASUMURA[1,2], Momoka KIKUTA[1], Ai SASOU[1], Takanari SHIGEMITSU[1], Shigeto MORITA[1,2], Shigeru SATOH[1,2] ([1]Kyoto Pref. Univ., [2]Kyoto Pref. AFFTR Center)

遺伝子組換え技術を用いて生産した有用タンパク質を蓄積するキャリアーとして、植物種子のオルガネラを利用した経口医薬品の開発が注目されている。

植物種子は、次世代の成長のための貯蔵物質を蓄積している。イネの場合、種子中の約 70%はデンプンであるが、次に多いのはタンパク質であり、その存在割合は種子中の 6～8%を占める。イネ種子タンパク質の大部分は、貯蔵タンパク質として 2 種類のプロテインボディ（PB）に蓄積している。プロラミンは I 型プロテインボディ (PB-I) に、グルテリンとグロブリンは II 型プロテインボディ (PB-II) に別々に蓄積しており、イネ種子特有の合成、蓄積機構が存在する。これまでの研究により、プロラミンはマルチジーンファミリーにより形成されており、アミノ酸配列が異なる複数のプロラミンがコードされている。PB-I には疎水性の強いプロラミンが層状に蓄積しており、その結果、人体内で消化されにくくその一部は体外に排出されることが考えられている。PB-I に有用タンパク質を蓄積させることができれば、経口投与しても胃酸や消化酵素の働きで分解されることなく、効率よく腸に運搬することができると考えられる。

最近、プロラミンと GFP の融合タンパク質をイネカルス中で発現させたところ、種子内で観察される PB-I によく似た PB-I 様構造体を形成することが明らかになった。この仕組みを応用することで、カルス中でも有用タンパク質を PB-I 様構造体へ蓄積出来るのではないかと考えた。

本研究では、抗菌タンパク質であるマウス由来のディフェンシン 4 をモデルタンパク質として用いて、イネカルス中で発現し、PB-Ⅰ様構造体へ蓄積させ、ヒトや家畜の腸炎などに有効な経口薬の作出の可能性を検討することを目的とした。そこで、プロラミンとディフェンシンの融合タンパク質をコードする遺伝子をイネカルスへ導入した。形質転換カルスを選抜し、ウエスタンブロット法により、カルス中にプロラミン＋ディフェンシン融合タンパク質が発現していることを確認した。また、免疫組織学的観察を行ったところ、カルス中に顆粒状の構造物が確認され、融合タンパク質がイネカルス中で PB-I 様構造体に存在している可能性が示唆された。

今後は、PB-I 様構造体中のディフェンシンが活性を示すかどうかを確認し、経口薬としての可能性を検討したい。

rice, prolamin, ER-derived PB

講演番号：2D23p07
講演日時、会場：3 月 27 日 15:16～ D 校舎 23 会場

実用珪藻 *Chaetoceros gracilis* における代謝工学：リシノール酸生産株の作出と蓄積条件の検討
Metabolic engineering of practical diatom *Chaetoceros gracilis*: Optimization of production of ricinoleic acid in transgenic lines

○安部 竜樹[1]、梶川 昌孝[1]、伊福 健太郎[1]、小川 順[2]、福澤 秀哉[1]（[1]京大院・生命、[2]京大院・農）
○Tatsuki ABE[1], Masataka KAJIKAWA[1], Kentaro IFUKU[1], Jun OGAWA[2], Hideya FUKUZAWA[1]
([1]Grad. Sch. Biostudies, Kyoto Univ., [2]Grad. Sch. Agri., Kyoto Univ.)

【目的】 医薬品や化成品として利用されるリシノール酸は、オレイン酸の Δ12 位の炭素をヒドロキシル化する酵素 Δ12 ヒドロキシラーゼによって産生され、トウゴマや麦角菌がこの酵素を有している。ひまし油は毒性タンパクであるリシンを含むため、他生物でのリシノール酸生成が試みられてきた。分裂酵母でリシノール酸を高蓄積すると細胞毒性を示し、リシノール酸をトリアシルグリセロール(TAG)に結合させることで細胞毒性が軽減される可能性が指摘されていた（Roman ら, 2012）。そこで本研究では、培養後期で全脂肪酸の 80～90%が TAG に移行する実用珪藻キートセロスに対して、麦角菌由来の Δ12 ヒドロキシラーゼ遺伝子 *CpFAH* を導入し、リシノール酸産生の可能性を検討した。

【材料と方法】 珪藻 *Chaetoceros gracilis* Schütt (UTEX LB2658)への形質転換は矩形波パルスエレクトロポレーション法を用いた（伊福ら、2014）。麦角菌 *Claviceps purpurea* NBRC6263 由来 *CpFAH* 遺伝子の発現には、集光性クロロフィル結合タンパク質をコードする珪藻 *Lhcr5* 遺伝子のプロモーターを用いた。脂肪酸の定量・定性分析には、GC-MS を用いた。

【結果と考察】 *CpFAH*発現用プラスミドを珪藻*C. gracilis*に導入し、PCRにより*CpFAH*遺伝子の配列を持つ形質転換体４株を単離した。いずれの株もリシノール酸の蓄積が見られたが、最も蓄積量が多かったCp4株について、リシノール酸の蓄積に対する生育温度の影響を15℃から25℃の範囲で調べた。生育温度が低いほど細胞あたりのリシノール酸蓄積量は上昇する傾向を示し、25℃では全脂肪酸の1.4%だったのに対して、15℃では8.8%（2.2 pg/cell, 3.4 μg/ml）に達した。また15℃ではCp4株の全TAG量が野生型の1.8倍に上昇していた。いずれの温度においても野生株とCp4株との間で生育に差は認められなかった。蓄積したリシノール酸の20%はTAGに１分子結合しており、70%は、TAGに１分子結合した上に、さらにアシル鎖の12位の水酸基で他の脂肪酸（16:0または16:1）とエステル結合していた。分岐鎖脂肪酸の蓄積によって、リシノール酸を含む脂質の疎水性が低下することを抑制し、生育への影響を回避している可能性がある。また、TAG中のリシノール酸に他の脂肪酸が更に結合したことが、Cp4株のTAG蓄積量が野生型よりも増加した原因の一つと考えられた。

ricinoleic acid, metabolic engineering, diatom

講演番号：2D23p08
講演日時、会場：3 月 27 日 15:27～ D 校舎 23 会場

*p*VEC ペプチドの植物細胞透過性における N 末端疎水性領域の役割
Role of the N-terminal hydrophobic region of *p*VEC peptides in plant cell penetration
○林 真由、宮下 正弘、宮川 恒（京大院農）
○Mayu HAYASHI, MASAHIRO MIYASHITA, HISASHI MIYAGAWA (Kyoto Univ.)

【目的】細胞透過性ペプチドは、タンパク質などの親水性分子に融合させることにより、速やかにそれらの分子を細胞内へ移行させることから、ベクターとしての応用が期待されている。我々はこれまでに、4 から 8 残基のアルギニンで構成されるオリゴアルギニンがタバコ懸濁細胞内へ移行することを確認しているが、細胞壁に強く吸着するという問題があった。そこで、オリゴアルギニンとは異なる機構で細胞内に移行すると考えられている *p*VEC（LLIILRRRIRKQAHAHSK-NH_2）を用いてタバコ懸濁細胞に対する透過性の評価をおこなったところ、オリゴアルギニンより高い透過性を示すだけでなく、細胞壁への吸着も低いことが明らかとなった。また、*p*VEC の N 末端疎水性領域（LLIIL）を除いたところ、透過性がオリゴアルギニンと同程度にまで下がっただけでなく、吸着も高まることが判明した。そこで本研究では、*p*VEC の N 末端疎水性領域のもつ吸着軽減効果に着目し、オリゴアルギニンの N 末端にこの疎水性領域を導入し、その植物細胞に対する透過性について評価した。
【方法】オリゴアルギニン（R_8：RRRRRRRRGC-NH_2）、*p*VEC、LLIILR_n-NH_2 (n=2, 4, 6, 8)を Fmoc 固相合成法により合成した。蛍光標識化は、R_8 については fluorescein 5-maleimide のシステイン側鎖への導入により、その他については 5(6)-carboxyfluorescein の N 末端アミノ基への導入によりおこなった。透過効率については、それぞれのペプチドをタバコ懸濁細胞に 30 分間処理し、細胞の洗浄ならびにトリプシンによる吸着ペプチドの除去後に抽出操作を行い、これを蛍光光度計で測定することにより算出した。細胞壁への吸着量については、トリプシン処理後のろ液を蛍光光度計で測定することで算出した。
【結果】オリゴアルギニンの N 末端に疎水性領域を導入したペプチド（LLIILR_n）は、アルギニンが 4、6、8 残基の場合において *p*VEC とほぼ同等の透過性を示し、アルギニンが 2 残基の場合はやや低い透過性を示した。また、これらの細胞壁への吸着もオリゴアルギニンに比べると極めて低く、pVEC とほぼ同等であった。これらの結果より、*p*VEC の N 末端疎水性領域は細胞壁などへの吸着を低減させることによって、透過性を高めていることが示唆された。また、今回得られた LLIILR_4 は *p*VEC の半分の残基数であり、植物細胞における細胞膜透過に用いるベクターとして有用であることが示された。

cell penetrating peptide, plant cell, vector

講演番号：2D23p09
講演日時、会場：3 月 27 日 15:38～ D 校舎 23 会場

ムギネ酸類生合成に関与している酵素の局在
Localization of mugineic acid biosynthetic enzymes
○古賀 悠介、新井 菜月、長坂 征治（東洋大生命）
○Koga YUSUKE, Arai NATSUKI, Nagasaka SEIJI (Toyo Univ.)

【背景・目的】
鉄は生物にとって必須の微量栄養元素である。植物においてはクロロフィル生合成に関与している酵素の活性中心、光合成や呼吸における電子伝達系で機能するタンパク質などが鉄を必要としている。植物は鉄を土壌中から根を使い吸収しているが、土壌、特にアルカリ土壌中の鉄の多くは不溶性の三価鉄の状態で存在している。その為、可溶性の鉄が少ない環境において植物は鉄を容易に獲得することができず、葉が黄化するなどの鉄欠乏症を呈し、極端に欠乏した場合には枯死に至る。高等植物は STRATEGY1 と STRATEGY2 と呼ばれる鉄吸収機構を獲得している。STRATEGY1 は土壌中の三価鉄を還元し吸収する機構であり、双子葉類とイネ科以外の単子葉類が持っている。STRATEGY2 はイネ科植物のみが持つ機構であり、ムギネ酸類（MAs）と呼ばれる三価鉄キレーターの根圏土壌中への分泌から始まる一連の吸収機構である。分泌された MAs は三価鉄をキレートして可溶化しその錯体を吸収する。MAs の生合成経路、合成に関与している酵素群は明らかにされているが、MAs、MAs 合成に関与している酵素の細胞内局在は未解明のままである。我々は、イネ培養細胞（Oc 細胞）を用いて MAs 合成までに必要な酵素であるニコチアナミン合成酵素（NAS)、ニコチアナミンアミノ基転移酵素（NAAT)、デオキシムギネ酸合成酵素（DMAS）の細胞内局在を明らかにすることを目的とした。
【方法・結果】
Oc 細胞の MAs の生合成を確認するために、NAS、NAAT、DMAS のウエスタンブロット解析を行った。結果､イネの植物体での発現に関する報告と同様に鉄欠乏､鉄過剰状態で培養を行った Oc 細胞の NAS、NAAT、DMAS の発現が上昇が確認され、Oc 細胞においても植物体と同様の MAs 生合成、分泌機構が存在することが示唆された。
各酵素の局在を明らかにするために融合タンパク質の発現解析を行った。各酵素と緑色蛍光タンパク質（GFP）との融合タンパク質を一過的に発現させて蛍光観察を行った。まずプロモーターについて、イネ科植物における遺伝子の過剰発現によく用いられているカリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーター（CaMV35Spro）とトウモロコシのユビキチンプロモーター（ZmUbipro）の検討を行った。結果、大きな変化は観察されなかった。CaMV35Spro を用いて NAS-GFP、NAAT-GFP、DMAS-GFP をそれぞれ Oc 細胞で一過的に発現させた結果、NAS と NAAT は小胞に存在していることが示唆され、DMAS は細胞基質全体に存在していることが示唆された。

mugineic acid, rice, localization

講演番号：2D23p10
講演日時、会場：3 月 27 日 15:49～ D 校舎 23 会場

チャ *Camellia sinensis* におけるフラバン-3-オール還元酵素群の解析
Characterization of flavan-3-ol reductases from the tea plant *Camellia sinensis*
康 美玲[1]、丹羽 康夫[1]、小林 京子[1]、関 俊哲[2]、豊岡 利正[2]、中村 順行[3]、○小林 裕和[1] ([1]静県大院・食品栄養環境・薬食生命、[2]静県大院・薬、[3]静県大院・茶学総合センター)
Mirei Kou[1], Yasuo Niwa[1], Kyoko Kobayashi[1], Junzhe Min[2], Toshimasa Toyo'oka[2], Yoriyuki Nakamura[3], ○Hirokazu Kobayashi[1] ([1]Grad. Sch. Nutr. Envir. Sci., Grad. Sch. Integrated Pharmaceut. Nutr. Sci., Univ. Shizuoka, [2]Grad. Sch. Pharmaceut. Sci., Univ. Shizuoka, [3]Tea Res. Center, Grad. Sch. Nutr. Envir. Sci., Univ. Shizuoka)

【背景】静岡県は茶葉生産量日本一を誇り、煎茶として品質が良い品種「やぶきた」がその 9 割を占める。カテキン類に代表されるフラバン-3-オールは、チャの主たる機能性成分であるが、この生合成経路に介在する酵素に関して知見は乏しい。それは、栽培チャのゲノムが大きく (約 4 G 塩基対)、ヘテロ接合であるため、その解析が他の栽培植物に対して後塵を拝していることが一因である。本研究グループは、品種「やぶきた」葉から RNA を調製し、平均鎖 460 塩基の 473,599 リード (世界最多) を達成し、49,256 のコンティグ (網羅率 98%) から構成される発現遺伝子 (EST) データベースを構築した。これを活用し、カテキン類合成の鍵酵素であるフラバン-3-オール還元酵素群を解析した。
【方法】「やぶきた」茶 EST の keyword search や BLAST search により、カテキン類合成系の酵素遺伝子と相同性を有するコンティグを検索し、これらをデータベース公開配列と合わせて ClastalW 解析に供した。今期の一番茶チャ葉から RNeasy Mini Kit (Qiagen) により RNA を抽出し、DNase 処理後、その cDNA を合成した。これから上記検索した未報告 cDNA を PCR 増幅し、In-Fusion HD Cloning Kit (Clontech) にてベクター pCold1 にクローニングした。DNA 塩基配列を確認後、大腸菌 Rosetta DE3 (Novagen) に導入し、タンパク質を IPTG で誘導させた。Dynabeads His-Tag Isolation & Pulldown (Novax) で精製後、基質と共に酵素反応を行い、産物を UPLC-TOF-MS (Waters) にて分析した。
【結果】アントシアニジン還元酵素 (ANR) との相同配列 cDNA の系統樹において、公開配列と異なるものが「やぶきた」茶 EST から 6 種 (KPP01_c2084, KPP01_c3443, KPP01_c3680, KPP01_c6413, KPP01_rep_c19257, KPP01_c23351) 見いだされた。これらのうち、KPP01_c3443 のタンパク質読み取り枠 (ORF) は、337 アミノ酸をコードし、シアニジンからエピカテキンとカテキンの両方の合成を触媒した。この酵素は、GenBank に登録され、ANR 活性があると報告されているチャ由来 AY641729.1 および GU992400.1 と比べて、それぞれ 3 個のアミノ酸が異なっていた。他の 5 種類の cDNA にコードされる ANR の基質特異性についても合わせて報告する。

tea polyphenol, flavonoid, flavan-3-ol reductase

講演番号：2D23p11
講演日時、会場：3 月 27 日 16:10～ D 校舎 23 会場

複数遺伝子クローニングシステムを用いた種々植物への多重遺伝子導入と発現解析

Introduction and expression of multi-genes in various plant by recycling cloning system

○中川 強[1]、税所 利基[1]、芝原 健太[1]、木村 哲哉[2] ([1]島根大学、[2]三重大学)
○tsuyoshi Nakagawa[1], toshiki Saisho[1], kenta Shibahara[1], tetsuya Kimura[2] ([1]Shimane Univ., [2]Mie Univ.)

複数遺伝子クローニングは、複数因子の相互作用に基づく制御機構の解明、タンパク質局在の比較、ゲノム編集ツールの複数発現などにおいて重要な基幹技術である。我々はこれまでに Gateway LR 反応を用いて順次遺伝子をクローニングできる植物用ベクターシステムを開発してきた。本システムでは簡便な操作の繰り返しにより多数の遺伝子を 1 つのベクター組み込むことが可能である。まずタバコ培養細胞 BY-2 に遺伝子導入を行い、プロモーターの検討、複数遺伝子安定発現の検討を行い、本システムにおいては、構成的発現にはノパリン合成酵素プロモーター、安定発現のためにシロイヌナズナのマトリクス付着領域の 1 つを用いることが有効であることを示した。今回は本システムが他の植物種においても有効に働くか、検討を行うことにした。本システムによりレポーター遺伝子 3 個をクローニングしたコンストラクト、5 個をクローニングしたコンストラクトを構築し、シロイヌナズナおよびトマトへ導入した。発現解析を行った結果、いずれの植物においても導入レポーターの発現が観察された。特にシロイヌナズナではマトリクス付着領域による発現安定効果が高いことが示された。本システムが植物への複数遺伝子導入システムとして有効であることが示された。

plant, transformation, multigene

講演番号：2D23p12
講演日時、会場：3 月 27 日 16:21～ D 校舎 23 会場

Development of Dual Site Gateway Binary Vector System Driven by a Constitutive Promoter (Nopaline Synthase) for Plant Transformation and Protein-Protein Interaction Analysis

○Mostafa ABOULELA[1], Tsuyushi Nakagawa[2] ([1]Tottori University, [2]Shimane University)

The introduction of multiple gene combinations into plant genome becomes now a prerequisite for studying gene functions and the regulation of physiological and developmental processes in addition to improvement of crop plants. We developed the Dual site Gateway binary vector system to enable the delivery of two open reading frames (ORFs) into the plant genome using Gateway cloning technology. In this study, a total of 56 dual site Gateway binary vectors were successfully developed. The dual site Gateway binary vectors have many versatility features: (i) The ability of gene fusions to 13 different types of reporter and epitope tags under the control of a nopaline synthetase promoter. (ii) A wide range of plant selectable markers, Kanamycin, Hygromycin, BASTA and Tunicamycin resistance markers, to match a researcher certain purpose. (iii) Genes of interest can be cloned into these vectors by simple LR reaction. The functionality of these vector systems has been validated by testing their cloning performance, expression of the two genes, and application for bimolecular fluorescence complementation (BiFC) analysis using stable and transient expression in *Arabidopsis* and Japanese leek, respectively. The dual site gateway binary vector system enabled the simultaneous delivery of two tested genes into plant chromosome in a single transformation process. Combining all these advantages together makes our dual site Gateway binary vector system a powerful vector system in gene function analysis experiments.

Plant transformation, Dual site, Gateway vectors

講演番号：2D23p13
講演日時、会場：3 月 27 日 16:32～ D 校舎 23 会場

イネ用の新規ゲノム編集ベクターの構築と評価
A novel binary vector for genome editing of rice

○黒田 昌治、山口 知哉、山川 博幹（農研機構・中央農研）
○Masaharu Kuroda, Tomoya Yamaguchi, Yamakawa Hiromoto (NARO Agric. Res. Cent.)

【研究目的と方法】

ゲノム編集技術は、ゲノム上の特定部位の塩基配列を設計通りに改変することを可能とし、今後の農作物育種のキーテクノロジーとなるものである。そこで我々は、この技術をイネ研究に導入するべく、簡便に遺伝子構築ができるような新規のイネ用ゲノム編集ベクターの開発をめざした。

以前に作製した制限酵素のみで遺伝子多重連結ができるバイナリーベクター[1]を改良して、新規なイネ用ゲノム編集ベクター（TALEN版とCRISPR/Cas版）を作成した。これらのベクターでは、目的遺伝子の構築が最小手順で行えるように設計してある。ベクターのパフォーマンス確認用として、GFPを過剰発現するイネを作出するとともに、増殖中のカルス小片からDNAを抽出して変異を検出するための簡便な手法を確立した。

【結果と今後の展望】

GFP配列を標的とする遺伝子改変用コンストラクトをGFP過剰発現カルスへ導入した後、選抜培地上でGFP蛍光が消失したカルスの増殖が見られるかを指標として遺伝子編集実験を行った。蛍光が消失したカルスにおいては、蛍光が消失したカルスにおいては、標的部位の配列に塩基欠失等の変異が生じてGFP遺伝子が破壊されており、我々が作製したイネ用ゲノム編集ベクターの有効性が確認できた。

我々は、インキュベーター内で植物体を高密度に水耕栽培する方法（Single-tube hydroponics）を既に開発している[2]。本方法では、通常の汎用型インキュベーターあたり、イネで288個体、ダイズで72個体を設置できるため、限られた場所と機材でも、ゲノム編集作物のスクリーニングと世代促進を効率よく進められる。収量性や品質等の農業形質を効率的かつ迅速に改善する育種システムの構築を目標として、まずは高温登熟性改良に応用する試みを進めている。

[1]Kuroda M.(2010) Biosci. Biotechnol. Biochem.74, 2348-2351 [2] Kuroda M.(2014) Biosci. Biotechnol. Biochem.78, in press

rice, genome editing, molecular breeding

講演番号：2D23p14
講演日時、会場：3 月 27 日 16:43～ D 校舎 23 会場

未利用リゾビウム属細菌の植物形質転換への応用

An application of unutilized *rhizobium* species to plant transformation.

○山本 真司、坂井 綾子、鈴木 克周（広島大理）
○Shinji YAMAMOTO, Ayako SAKAI, Katsunori SUZUKI (Hiroshima Univ.)

アグロバクテリアによる形質転換法は、対象とする植物の種類はもちろん、使用するアグロバクテリア菌株の種類によっても遺伝子導入効率は大きく変わる。我々は同細菌による植物形質転換技術の高効率化・適用可能な生物種の拡大を目的に、現在まで形質転換に利用されてこなかったアグロバクテリアを含むリゾビウム属細菌に着目し、これらを着実に形質転換に利用できる菌株へ加工する技術の開発を行っている。非病原性のアグロバクテリア近縁種は病原性アグロバクテリアのもつ病原プラスミド（Ti/Ri プラスミド）を持たせると、遺伝子導入能力を獲得する。また、その病原性（遺伝子導入が可能な植物種の範囲やその効率）は病原プラスミドと染色体バックグラウンド、そしてその組み合わせによって予期せず大きく変わる。現在までに、我々は病原プラスミドに RP4 由来の転移起点（*oriT*）を含む小型プラスミドを一時的に融合させることで、アグロバクテリア間で効率よく病原プラスミドを移動させることに成功した。

本研究では、同技術を用い、*Agrobacterium* 属 3 種 5 株のもつ病原プラスミドの除去と交換（ハイブリッド化）を試みた。病原プラスミドの除去は、病原プラスミドと同じ不和合グループに属するプラスミドを導入し、競合させることで病原プラスミドを失った細胞を得る。そこでまず、病原プラスミドが属する 4 種類の不和合グループについて、それぞれに対応する病原プラスミド除去用プラスミドを作成し、各菌株に導入した。その結果、5 株中 4 株で効率にばらつきはあるものの病原プラスミドを失った細胞を得ることができた。また、MAFF301724 株のもつ病原プラスミドである pRi1724 は、他の病原プラスミドとは異なる新規な不和合グループに属することが示唆された。次に、作成した病原プラスミド交換株の病原遺伝子誘導能を比較した結果、野生型よりも高い病原遺伝子誘導能を示す菌株が多数見出され、形質転換への転用が期待できる結果となった。

Agrobacterium, Ti plasmid, transformation

講演番号：2D23p15
講演日時、会場：3 月 27 日 16:54～ D 校舎 23 会場

アグロバクテリウムによる遺伝子導入効率を向上させる化合物の同定

Chemical genetic identification of compounds that improve *Agrobacterium*-mediated transient transformation

○木村 光宏、磯部 祥子（かずさ DNA 研究所）
○Mitsuhiro KIMURA, Sachiko ISOBE (Kazusa DNA Res. Inst.)

植物細胞への遺伝子導入に多く用いられるアグロバクテリウム法は形質転換効率が高い、高発現領域に導入遺伝子が挿入されやすい、導入コピー数が比較的少ないなどの利点がある。しかし、アグロバクテリウムによる植物細胞への遺伝子導入効率には植物種や品種間で差異がみられ、形質転換体を作出する際の問題となっている。そこで、本研究では 3600 種類の生理活性物質から構成される LATCA 化合物ライブラリーを用いて、アグロバクテリウムによる遺伝子導入効率を向上させる化合物の選抜を行った。その結果、遺伝子導入効率を向上させる化合物として、ニトリル系除草剤であるクロロキシニルを同定した。この化合物はミヤコグサやイネへの遺伝子導入効率を向上させ、アグロバクテリウム *vir* 遺伝子の誘導を促進した。よって、クロロキシニルは多くの植物種への遺伝子導入系の改良に利用できると期待している。

Agrobacterium, *Lotus japonicus*, chloroxynil

講演番号：2D23p16
講演日時、会場：3 月 27 日 17:15～ D 校舎 23 会場

スクロース誘導性プロモーターを用いた *Nicotiana plumbaginifolia* 毛状根における GUS の継続的な高発現

High-level and continuous expression of sucrose inducible promoter-GUS fusion gene in transgenic *Nicotiana plumbaginifolia* hairy roots

○本間 洋平、山川 隆（東大院農）
○Youhei HONMA, TAKASHI YAMAKAWA (Tokyo Univ.)

［目的］*Agrobacterium rhizogenes* の感染によって生じる毛状根は植物バイオリアクターの開発において有用な材料であると考えられている。植物バイオリアクターの開発によく用いられているプロモーターは、カリフラワーモザイクウイルスの 35SRNA プロモーターの様な常時発現型のプロモーターである。しかし、異種遺伝子を宿主植物に常時発現させることは、宿主植物への負担が大きいと考えられている。そこで我々は常時発現型のプロモーターの代わりにスクロース濃度に応じて遺伝子発現を誘導するプロモーター（Spo^{min}）を用いて、条件特異的に植物に異種タンパク質を発現誘導させる系の開発を試みてきた（1)。昨年度の大会において我々は Spo^{min} が *Nicotiana plumbaginifolia* の毛状根において、特定条件下で異種タンパク質を大量に生産させることが可能であることを発表した。本研究では、Spo^{min} を導入した *N. plumbaginifolia* の毛状根をフラスコ規模で長期間培養した場合、スクロース誘導性がどのように変化するか確認することを目的とした。

[材料と方法] Spo^{min} の下流に GUS の cDNA、および GUS を細胞質、アポプラスト、ER に輸送する配列をそれぞれ連結した 3 種類のコンストラクトを *N. plumbaginifolia* にそれぞれ導入した（1)。この *N. plumbaginifolia* 組換え体に *A. rhizogenes* ATCC 15834 株をリーフディスク法によって感染させ、毛状根を誘導した（2)。毛状根の一部を切り取り、300 ml 容三角フラスコ規模で、0%、6%スクロース含有 LS 培地に浸して振盪培養し（25℃、60-120 rpm、暗条件)、GUS の発現を誘導した。培養は 20 週間継続した。スクロース処理によって誘導された GUS の活性をそれぞれ測定した。

[結果と考察] Spo^{min} によって発現誘導された GUS 活性は、培養期間中継続的に認められた。GUS 活性は、毛状根の増殖中は維持されたが、毛状根の増殖が停滞し始めた増殖期後期では、低下する傾向が認められた。これは、増殖能の低下によって、毛状根は GUS の発現誘導を維持する余力が低下したからではないかと考えられる。毛状根を培養した溶液中からも GUS 活性が僅かだが検出された。気泡型培養槽を用いた培養については現在継続中であり、この結果についても報告する。
以上から、スクロース処理と Spo^{min} による GUS の発現誘導は、毛状根の培養条件を調整することで長期間の維持が可能であると考えられる。

1　Honma and Yamakawa 投稿中
2　本間、山川、日本農芸化学会 2014 年度東京大会　講演番号：2C05a02

Agrobacterium rhizogenes, *Nicotiana plumbaginifolia*, sucrose inducible promoter

講演番号：2D23p17
講演日時、会場：3 月 27 日 17:26～ D 校舎 23 会場

Would *UGE* gene's overexpression directly influence an alteration of AGP polysaccharide?

○TAYEBEH ABEDI[1], Akio IWASAKI[2], Toshihisa KOTAKE[2], Nobukazu TANAKA[1] ([1]Hiroshima Univ., [2]Saitama Univ.)

Aim; Basically, carbohydrates serve as structural components in plant cells. Particularly, galactose is an important constituent of galactolipids, cell-wall polysaccharides and glycoproteins such as arabinogalactan proteins (AGPs). AGPs are a family of highly glycosylated hydroxyproline-rich glycoproteins (HRGPs), which express mainly on the surface of plasma membrane and cell wall and have important roles in plant growth and development. AGPs are modified by posttranslational modifications (hydroxylation and glycosylation) in the Golgi apparatus. Essential enzymes involved in AGPs glycosylation are glycosyltransferases (GTs), UDP-galactose epimerases (UGE) and UDP-galactose transporters (UGT). UGE is a nucleotide sugar interconverting enzyme, which synthesizes UDP-galactose (UDP-Gal) from/to UDP-glucose (UDP-Glc).

Methods; In order to investigate the influence of *UGE2* overexpression on AGP polysaccharide in plants, *AtUGE2* gene driven by 35S promoter was introduced into tobacco using *Agrobacterium* transformation method. Then, considering gene expression at transcription level tested by RT-PCR, 8 lines selected from 17 transformed lines were examined for UGE enzyme activity and AGP polysaccharide quantification using colorimetric method.

Results; UGE enzyme activity assay revealed significant difference between control and transformed lines ($P<0.01$). The remarkable increase in the UGE activity was observed in lines 3, 6 and 1 (7.1 fold, 6.4 fold and 6.2 fold, respectively). Colorimetric assay based on Yariv reactivity was used for AGP polysaccharide quantification in 11th leaf of transformed and control plants. The results showed no significant difference between control and transformed lines.

To sum up, overexpression of *AtUGE2* remarkably influenced UDP-Gal conversion from UDP-Glc in transformed tobacco plant. However, no significant enhancement in AGP polysaccharide quantity was observed. At present, HPLC analysis is performed to estimate the difference of produced UDP-Gal in transgenic and control plants. Furthermore, to investigate the influence of *AtUGE2* and *hUGT1* (human UDP-galactos transporter 1) genes co-expression on AGP polysaccharide content of tobacco plant, crossing between *AtUGE2*-transgenic plants and *hUGT1* -transgenic ones is in progress.

arabinogalactan protein, UDP-galactose epimerase, polysaccharide

講演番号：2D23p18
講演日時、会場：3 月 27 日 17:37～ D 校舎 23 会場

AGP 糖鎖量の減少と植物形質との関係
Relationship between decrease of AGP polysaccharide and plant phenotype
○岩田 佳奈[1]、小竹 敬久[2]、円谷 陽一[2]、田中 伸和[1] ([1]広島大院先端、[2]埼玉大院理工)
○Kana IWATA[1], Toshihisa KOTAKE[2], Yoichi TUMURAYA[2], Nobukazu TANAKA[1] ([1]Hiroshima Univ., [2]Saitama Univ.)

【目的】アラビノガラクタンタンパク質(AGP)は植物のプロテオグリカンで、植物の発生と分化、細胞間コミュニケーション、プログラム細胞死、二次細胞壁の蓄積、木部分化など植物の形態や生理現象に関わる重要な物質であることが知られている。GPI アンカーで細胞表層に係留される AGP は、β-1,3-ガラクタン主鎖に β-1,6-ガラクタン側鎖が結合した複雑な糖鎖構造を持つためその機能は解明されていない。当研究室では AG 糖鎖の機能を解明するため、糖鎖を人為的に増加・減少させる方法の開発に取り組んでいる。具体的には、UDP-ガラクトース輸送体(UGT)の高発現によるゴルジ体への UDP-ガラクトースの輸送量の増加や、AG 糖鎖分解酵素によって AG 糖鎖を分解し減少させることを行っている。これまでの研究で、タバコに *UGT* 遺伝子を発現させると AGP 量は増加し、生育が向上し、細胞壁が厚くなることを見出している。また、木部の幅および細胞数も増加していた。したがって、AG 糖鎖量が増加すると、生育と分化の向上がみられるといえる。

本発表では、AG 糖鎖を人為的に増加・減少させ、植物の形質との関係を調べることで AGP の機能を解明することを目的とする。

【方法及び結果】

AGP 糖鎖を減少させるため、AG 糖鎖の主鎖を外側から切断する 2 種のエキソ-β-1,3-ガラクタナーゼ遺伝子(白色腐朽菌 *Panerochaete chrysosporum* 由来 Pc3GAL とウスバタケ *Irpex lacteus* 由来 Il3GAL)をバイナリーベクターpBI121 に組み込んだコンストラクトを保有するアグロバクテリウムをタバコに感染させ、形質転換体を得た。得られたタバコ植物は再生培地上では増殖が可能であったが、再生は不完全であり、得られた再生体もコントロールより生育が悪く、小型で葉の先端など一部が枯れているものがあった。特に Pc3GAL を導入したタバコは Il3GAL を導入したタバコよりも再生体を得ることが難しかった。また、AGP と特異的に結合する Yariv 試薬を用いた単純放射免疫拡散法により AGP 量を調べるとほとんどなくなっていた。さらに正確に AGP 量を測定するため、Yariv 試薬を用いた比色分析による AGP 定量も行ったが、形質転換体はコントロールよりも AGP 量が減少していた。したがって、AG 糖鎖量が減少すると、生育は阻害されるといえる。

現在、RT-PCR による各遺伝子の発現解析、β-1,3-ガラクタンを用いた酵素活性測定を行っており、遺伝子の発現、酵素活性、形質および AGP 量の関係を詳しく調べる予定である。

arabinogalactan protein, polysaccharide, galactanase

講演番号：2D23p19
講演日時、会場：3 月 27 日 17:48～ D 校舎 23 会場

下流 ORF の翻訳効率を高める 5'非翻訳領域における翻訳エンハンサー活性の検定

Evaluation of the enhancer activity in the 5' untranslated region that strongly elevates the translation of the downstream ORF

○島田 浩章[1]、青木 裕美[1]、寺村 浩[1,3]、榎本 裕介[1]、Schepetilnikov Mikhail[2]、Ryabova Lyubov[2]、佐々木 忠将[1,4]、草野 博彰[1] ([1]東京理科大・生物工、[2]ストラスブール大学、[3]現　神戸大・工、[4]現理研)

○ Hiroaki SHIMADA[1], Hiromi Aoki[1], Hiroshi Teramura[1,3], Yusuke Enomoto[1], Mikhail Schepetilnikov[2], Lyubov Ryabova[2], Tadamasa Sasaki[1,4], Hiroaki Kusano[1] ([1]Tokyo Univ. of Sci., [2]Univ. of Strasbourg, [3]Kobe Univ., [4]Riken)

イネの *OsMac1* 遺伝子の転写産物にはおよそ 500 塩基からなる 5'非翻訳領域(5'UTR)が存在する。この 5'UTR はエキソン１とエキソン２の結合部位で３種類のスプライシングバリアント(UTRa、UTRb、UTRc)が生じる。このうち最も長い UTRc は下流の ORF の翻訳量を 15 倍以上に促進した。一方、UTRa と UTRb はこのような効果は認められなかった。OsMac1 のホモログである *OsMac2* と *OsMac3* の mRNA にもそれぞれ 312 塩基と 318 塩基からなる 5'UTR が含まれていた。これらの 5'UTR も *OsMac1* と同様に下流 ORF の翻訳量を高めるエンハンサー機能を持っていた。*OsMac2* の場合は 11 倍程度に、*OsMac3* は 30 倍程度に高める効果を示した。そこで、レポーター遺伝子として GUS を結合した 5'UTR 配列を用いて翻訳エンハンサー活性をもたらす機能領域の同定を試みた。*OsMac1* では、３つのスプライシングバリアントの間で異なる 38 塩基の配列の有無が翻訳エンハンサー活性に重要な役割を果たすと考えられたため、この領域の配列の部分的な欠損および塩基配列の付加をさせた変異体 5'UTR を構築し、下流 ORF の翻訳量を測定した。その結果、いずれの場合も UTRc よりも低い翻訳効率を示した。一方、UTRc に含まれる 38 塩基の配列の塩基配列について長さを変えずに様々に変異させた UTR を構築し翻訳活性を調べたところ UTRc と同様な翻訳エンハンサー活性を示した。このことからこの領域が翻訳エンハンサー活性に重要であることが明らかになったが塩基配列の依存性が低いことが示唆された。おそらく RNA の高次構造がエンハンサー機能に大きく関与しているのではないかと思われた。これと並行し、UTRc および *OsMac3* の 5'UTR の高次構造に影響を与えると思われる様々な部位について塩基配列の一部を置換・欠損させた変異体 5'UTR を作製し、これらの翻訳効率を調べたところ、下流 ORF の翻訳量を著しく低下させる複数の領域が存在することがわかった。これらの結果から、これらの領域が翻訳エンハンサー活性に重要な役割を果たしていることが示唆された。

translation enhancer, non-coding RNA, mRNA

講演番号：2D23p20
講演日時、会場：3 月 27 日 17:59～ D 校舎 23 会場

新規な翻訳エンハンサーを利用した植物による高効率な物質生産の構築

Evaluation the translational enhancer for utilizing high-efficient recombinant protein production in plant

○今村 智弘、青木 裕美、佐藤 航平、草野 博彰、島田 浩章（東京理科大・生物工）
○Tomohiro IMAMURA, Hiromi AOKI, Kouhei SATO, Hiroaki KUSANO, Hiroaki SHIMADA (Tokyo Univ. of Sci.)

【目的】発表者らは、イネ由来の新規な翻訳エンハンサーを発見している。この翻訳エンハンサーは、*OsMac1, OsMac2, OsMac3* 遺伝子に含まれる 5'UTR に存在し下流 ORF の翻訳量を 5-30 倍に高める。現在、これら翻訳エンハンサーの機能を利用した高効率な高い生産性を示す物質生産系の構築に取り組んでいる。本発表では、翻訳エンハンサーの有効性を検定すると同時に、目的生産物の生産に対する有用性を検討した。

【方法】先行研究より高い翻訳促進活性を示した *OsMac1* UTRc および *OsMac3* 5'UTR を翻訳エンハンサーとして用い、感温性エラスチン類似ペプチド（Elastin like peptide, ELP）融合タンパク質の生産を試みた。生産宿主には、ベンサミアナタバコ(*Nicotiana benthamiana*)とイネ(*Oryza sativa*)を利用した。ベンサミアナタバコでは、アグロインフィルトレーション法を用いた緑葉での一過的発現により生産量を検定した。イネでは、アグロバクテリウム法により形質転換体カルスを作成し、この生産性を調査した。これらの解析から導入した翻訳エンハンサーの効果を評価した。

【結果】ELP 融合タンパク質遺伝子の上流にカリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーターを挿入した発現プラスミド（p35S-ELP）を構築した。それぞれの翻訳エンハンサーの効果を検定するために、ELP 融合タンパク質遺伝子に含まれるコード領域の上流にあたる 5'非翻訳領域に、*OsMac1* UTRc または *OsMac3* 5'UTR の配列を導入することでプラスミド（p35S-OsMac1-UTRc-ELP, p35S-OsMac3-5'UTR-ELP）を得た。これらの発現プラスミド保持するアグロバクテリウムをベンサミアナタバコおよびイネに導入し、これらの細胞における目的産物の生産を試みた。その結果、いずれの形質転換体でも ELP 融合タンパク質の生産を認めることができた。それぞれの生産量を比較したところ、p35S-OsMac1-UTRc-ELP と p35S-OsMac3-5'UTR-ELP 導入した個体では、p35S-ELP に比べて生産物の蓄積量の増加が認められた。この結果より翻訳エンハンサーは、これらの植物においてその翻訳量を増強する効果を有することが示された。

translation enhancer, molecular farming, ELP peptide

講演番号：2D25a06
講演日時、会場：3 月 27 日 10:05～ D 校舎 25 会場

マツタケシロに含まれる抗菌物質の解明
An antimicrobial substance from shiro of *Tricholoma matsutake*
○西野 勝俊[1]、城 美沙緒[1]、大泉 一也[1]、大倉 龍起[1]、藤田 徹[2]、山田 明義[3]、田中 千尋[1]、笹森 貴裕[4]、時任 宣博[4]、平井 伸博[1]([1]京大院農、[2]京都府農水技セ、[3]信州大農、[4]京大化研)
○Katsutoshi NISHINO[1], Misao SHIRO[1], Kazuya OIZUMI[1], Ryuki OKURA[1], Toru FUJITA[2], Akiyoshi YAMADA[3], Chihiro TANAKA[1], Takahiro SASAMORI[4], Norihiro TOKITOH[4], Nobuhiro HIRAI[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Kyoto Prefectural Agriculture, Forestry and Fisheries Technology Center, [3]Shinsyu Univ., [4]Institute for Chemical Research, Kyoto Univ.)

【目的】マツタケ（*Tricholoma matsutake*）はアカマツの代表的な菌根菌であり、その子実体は環状に形成される。この環のことはフェアリーリングと呼ばれており、このリングとその内部の土壌には菌根や菌糸を含むマツタケ菌のコロニーが形成されている。この領域のことをシロと言い、菌糸の伸長とともに毎年約 10–15 cm ずつ外側へと拡大する。その先端は生育が活発で菌根量が最も多く、活性菌根帯と呼ばれている。活性菌根帯から採取したシロはグラム陰性菌や枯草菌に対して抗菌活性を示す一方、培養菌糸や子実体、シロの圏外土壌は抗菌活性を示さない。これまで活性菌根帯のシロに含まれる抗菌活性物質本体はα-pinene などのモノテルペンと推定されていた。しかし我々の追試によって、モノテルペンは活性物質本体ではないことが明らかにされた。本研究はシロに含まれる真の抗菌活性物質の単離、同定を目的とした。なお、2014 年度大会において、抗菌活性本体の活性はシュウ酸よりも明らかに強いことを報告した。
【方法と結果】抗菌活性は枯草菌を用いたペーパーディスク法により測定した。活性菌根帯のシロ試料 35 g の 20% MeOH 抽出物を活性炭カラムで精製し、その水溶出区を TOYOPEARL DEAE ゲルで精製した結果、抗菌活性は 100 mM HCl 溶出区に認められた。これをアニオン交換樹脂の Oasis® WAX により精製したところ、抗菌活性成分は 5% NH_3 含有 MeOH 区に溶出した。この画分を水から再結晶化し、無色針状結晶を得た。X 線構造解析の結果、この結晶をシュウ酸アルミニウム錯体と同定した。シュウ酸アルミニウムが抗菌活性を有することを明らかにしたのは今回が初めてである。シュウ酸の抗菌活性がアルミニウムに配位することによって増強されることも判明した。シロにおけるシュウ酸アルミニウムの分布を調べるために活性菌根帯とその内外土壌を採取し、水抽出物を ^{27}Al-NMR 測定した結果、活性菌根帯にのみシュウ酸アルミニウムが濃度 0.2 mg/g で検出された。この結果は水抽出物の抗菌活性の強さとよく相関していた。

これまでシュウ酸アルミニウムは、植物が分泌したシュウ酸により土壌中の不溶性リン酸アルミニウムから可溶性リン酸が遊離する反応の副産物、あるいは酸性土壌における可溶性アルミニウムの解毒代謝物と考えられていた。しかし今回の研究により、シュウ酸アルミニウムは機能をもたない副産物ではなく、それ自身が抗菌作用を持つ活性物質であることが明らかとなった。しかも、実際のシロにおけるシュウ酸アルミニウムの分布と抗菌活性が相関していることから、シュウ酸アルミニウムはシロの発達と維持に重要な役割を果たしている可能性が高いと考えられる。

Tricholoma matsutake, antimicrobial substance, aluminium oxalate

講演番号：2D25a07
講演日時、会場：3 月 27 日 10:16～ D 校舎 25 会場

花粉に含まれる蛍光物質の化学生態学（第 2 報）

Chemical ecology of fluorescent compounds from flower pollens. II

○川上 真理[1]、森 信之介[1]、大石 雅典[1]、福井 宏至[2]、後藤 勝実[3]、月岡 淳子[3]、佐久間 正幸[1]、刑部 正博[1]、杉岡 稔朗[1]、平井 伸博[1]（[1]京都大院農、[2]香川大名誉教授、[3]京都薬科大附属薬用植物園）

○Mari KAWAKAMI[1], Shinnosuke MORI[1], Masanori OISHI[1], Hiroshi FUKUI[2], Katsumi GOTO[3], Junko TSUKIOKA[3], Masayuki SAKUMA[1], Masahiro OSAKABE[1], Nariaki SUGIOKA[1], Nobuhiro HIRAI[1] ([1]Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]Prof. emeritus of Kagawa Univ., [3]Garden Med. Plants, Kyoto Pharm. Univ.)

【目　的】

多くの植物の花粉は紫外線照射により蛍光を発する。葯は多くの場合、花の外側へ突出しているため花粉中の遺伝子は紫外線障害の危険性に強く曝されている。蛍光は吸収した光のエネルギーの一部を熱として、残りをより長波長の光に変換して発光する現象であることから、花粉中の遺伝子を紫外線による損傷から保護する機能があると推定される。活性酸素を消去する抗酸化作用による遺伝子保護も考えられる。一方蛍光は昆虫が花粉を視認することに役立っている可能性もある。そこで本研究は花粉が示す蛍光物質の機能解明を目的として、蛍光物質の同定ならびに昆虫を用いた行動実験を行った。昨年度大会では、ヤツデなどの花粉の蛍光物質の蛍光性官能基がカフェオイル基であること、ミツバチが太陽光の下カフェ酸含有ろ紙に誘引されることを報告した。今回はモモ花粉の蛍光物質の同定ならびにより詳細なミツバチの行動実験の結果を報告する。

【結果と考察】

モモ（*Prunus persica*）の花粉 3.9 g をメタノールで抽出し、蛍光物質 MF-1(1 mg)と MF-2(0.3 mg)を単離した。スペクトル解析の結果、MF-1 を feruloyl glucose、MF-2 を *cis*-feruloyl glucose と同定した。それらの蛍光極大波長 433 nm が ferulic acid metyl ester のもの（419 nm）とほぼ一致したことから、モモ花粉の蛍光は feruloyl 基に由来することがわかった。Feruloyl glucose は feruloyl 基に由来すると考えられる抗酸化活性を有しており、花粉に含まれる蛍光物質が紫外線から遺伝子を保護するための抗酸化剤としても機能していることが支持された。

カフェ酸によるミツバチの誘引効果は蛍光ではなく揮発分子による疑いがもたれたので、カフェ酸より高極性のクロロゲン酸を用いてミツバチの行動実験を行った。20 mg/g クロロゲン酸含有ろ紙と非含有ろ紙に訪れた個体数を計測したところ、前者のろ紙には後者のろ紙よりも約 1.25 倍多くの個体が訪れた。カフェ酸含有ろ紙では、低濃度の 10 mg/g の方が高濃度の 100 mg/g よりも明るい蛍光を示す（これは高濃度では蛍光物質自身が蛍光をより多く吸収するためと推定される）。この両者のミツバチに対する誘引性を比べたところ、前者には後者よりも約 1.20 倍多い個体が訪れた。これらの結果より、ミツバチは揮発分子（匂い）を検知しているのではなく、蛍光を視認しかつそれに誘引されることが強く示唆された。今後、モモ花粉の蛍光物質の蛍光性官能基に相当する ferulic acid methyl ester を用いた行動実験を行う予定である。

fluorescence, honeybee, pollen

講演番号：2D25a08
講演日時、会場：3 月 27 日 10:27～ D 校舎 25 会場

圃場環境下のダイズにおける生育過程を通じたフラボノイド含量の解析
Analysis of the flavonoid contents in field-grown soybeans during the growth
○山崎 由実[1]、杉山 暁史[1]、高瀬 尚文[2]、矢崎 一史[1] ([1]京都大生存研、[2]京都学園大バイオ環境)
○Yumi YAMAZAKI[1], Akifumi SUGIYAMA[1], Hisabumi TAKASE[2], Kazufumi YAZAKI[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Kyoto Gakuen Univ.)

ダイズ根から分泌されるフラボノイドは、根粒菌との共生に必要なシグナル分子として機能することが明らかにされている。根圏におけるフラボノイドの機能については、根粒菌以外にも菌根菌や病原菌、線虫、また他植物との相互作用など様々な報告がある。水耕栽培においてダイズの根からのフラボノイド分泌を経時的に解析したところ、生育初期ではアグリコンであるダイゼインの分泌量が多いが、開花以降、その分泌量は減少し、マロニル配糖体であるマロニルダイジンの分泌量が増加することが明らかになった。また、アポプラストでのフラボノイド配糖体の加水分解を触媒するβ-グルコシダーゼ *ICHG*（Isoflavone Conjugate-Hydrolyzing β-Glucosidase）の発現は開花期以降に低下し、それに伴い配糖体の根からの分泌量が増加することが示唆された。本研究では、根圏シグナル分子としてのフラボノイドの土壌中での機能を明らかにすることを目的として、圃場で生育したダイズを用いて様々な生育ステージにおけるフラボノイド含量と、*ICHG* 及びフラボノイド生合成遺伝子の発現変動を解析するとともに、根圏微生物叢を解析している。

京都学園大学の実験圃場で黒ダイズ及びエンレイを栽培し、黒ダイズは V1、V8、V11（Vn：主茎の第（n-1）複葉まで完全展開)、R2（開花盛期)、R6（子実肥大盛期)、R8 期（成熟期）に、一方エンレイは V1、V8、R3（着莢始)、R6、R8 期に葉及び根をサンプリング後、速やかに凍結した。フラボノイドは、凍結乾燥した葉及び根から 80%メタノールで抽出し、HPLC により定量した。各生育ステージの器官別フラボノイドの含有量及びその組成を比較したところ、黒ダイズとエンレイの品種間で大きく異なる傾向が見出された。根においては、黒ダイズでは R2 期（生殖生長期初期）において、配糖体のマロニルダイジン及びダイジンの含量が増大した。一方、エンレイの根では、R3 期でアグリコンのダイゼイン含量が増加した。黒ダイズ、エンレイともに、根では生育ステージを通じてマロニルダイジンの蓄積量が最も多く、ダイゼイン誘導体がゲニステイン誘導体よりも多いことが示された。現在、*ICHG* 及びフラボノイド生合成系遺伝子発現の解析及び MiSeq を用いて根圏微生物の 16s rRNA 遺伝子の解析を行っている。

root exudate, rhizosphere, flavonoid

講演番号：2D25a09
講演日時、会場：3 月 27 日 10:38～ D 校舎 25 会場

連作における土壌細菌の菌叢の経時変化

Dynamics of soil bacteria community under continuous cropping

○宮崎 恭之介、向 真樹、ディネッシュ アディカリ、荒木 希和子、久保 幹（立命館大）
○Kyonosuke MIYAZAKI, Msaki MUKAI, Adhi Dinesh, Kiwako S. ARAKI, Motoki KUBO (Ritsumeikan Univ.)

【背景・目的】

連作には農地や農作物の組み合わせの管理が容易な利点がある反面、連作障害という問題が生じる。連作障害とは、連作する農作物が病原菌に感染するといったことにより、農作物の品質や収量が低下する現象のことである。連作障害を引き起こす病原菌として糸状菌が知られているが、細菌の分泌物も植物の根に影響があることが知られている。しかし、細菌の植物への影響はほとんど知られていない。

本研究では連作中の土壌における細菌の総菌数ならびに菌叢を測定し、連作障害に対する細菌の関与を明らかにすることを目的とした。

【手法・結果】

連作障害が生じやすい3種類の異なる科に属する植物(*Pisum sativum* L. :エンドウ、*Cryptotaenia canadensis subsp. japonica*：ミツバ、*Abelmoschus esculentus*：オクラ)を土壌(TC 30,000、TN 1,200)の入ったワグネルポット(1/5000 a)で栽培した。また、コントロールとして 3 種類の植物を順に栽培(輪作)した。それぞれの植物を栽培終了時に抜去し、新たな植物をポットに定植して繰り返し栽培した。定植毎に土壌のサンプリング、抜去した植物の生長の測定を行った。サンプリングした土壌から DNA を抽出し、eDNA の定量により総細菌数の測定を行った。また、抽出した DNA を用いて 16S rRNA 遺伝子 PCR－DGGE 法により菌叢の解析も行った。

植物生長の測定の結果、2 回目以降の連作ではほとんど生長しない植物や葉の色が変色する植物など連作障害が観察された。総細菌数は連作の回数が増すにつれ、2 億(cells/soil-kg)ほど減少していることが分かった。また、菌叢解析の結果、植物種ごとに菌叢が違っており、どの植物でも連作を繰り返すにつれて、特定の菌叢に偏る傾向が見られた。これらのことから、連作に伴う総細菌数と菌叢の変化が作物の連作障害に関わっていることが示唆された。

continuous cropping disease, bacteria, 16S rRNA Gene PCR-DGGE

講演番号：2D25a10
講演日時、会場：3 月 27 日 10:49～ D 校舎 25 会場

AM 菌細胞壁キチン質に由来するオリゴ糖によるイネ菌根共生遺伝子の発現誘導
Induction of symbiotic gene expression by AM fungal cell wall-derived chitinous oligosaccharides in rice (*Oryza sativa*)
○辰己 雄亮、秋山 康紀（阪府大院・生命環境）
○Yusuke TATSUMI, Kohki AKIYAMA (Osaka Prefecture Univ.)

【目的】アーバスキュラー菌根菌（AM 菌）と植物との共生は 80%以上もの陸上植物に見られる。AM 共生において，宿主植物と AM 菌はそれぞれが生産するシグナル物質により互いの存在を認識する。AM 菌が生産するシグナル物質は Myc factor と呼ばれ，現在までにリポキトオリゴ糖（Myc-LCO）とキチンオリゴ糖が報告されている。しかしながら，Myc-LCO とキチンオリゴ糖による共生応答誘導は部分的かつ限定的であることが明らかになってきており，真の共生シグナル物質が別に存在することが強く示唆されている。植物における AM 菌の共生シグナル物質の受容には LysM 型キチン系受容体が関与していると考えられている。そこで本研究では AM 菌の主要な細胞壁成分であるキチン質について構造解析を行い，AM 菌の細胞壁から生成し得るキチン質オリゴ糖の存在について精査した。それらオリゴ糖を化学的・酵素的手法により調製し，イネにおける AM 共生マーカー遺伝子の発現誘導について調べ，新たな共生シグナル物質の存在の可能性を検討した。
【方法および結果】AM 菌 *Rhizophagus irregularis* の菌体を 1 N NaOH 続いて 2% AcOH で加熱還流することによりキチン画分を得た。これを *Streptomyces griseus* 由来のエンド型キチナーゼで処理し，酵素加水分解産物について TLC, LC-MS, NMR 分析を行ったところ，キチン 2 糖に加えて，非還元末端側の糖残基のアセトアミド基が脱アセチル化されたキチン 2 糖が同定された。このことから AM 菌のキチンは *N*-アセチルグルコサミンだけではなく，グルコサミンを含むヘテロ多糖であることが明らかとなった。そこで AM 菌の細胞壁キチンから生成し得るオリゴ糖断片として部分 *N*-脱アセチルキチンオリゴ糖の共生シグナルとしての機能について調べることとした。キトサン 4 糖の部分 *N*-アセチル化により調製した部分 *N*-脱アセチルキチン 4 糖をイネ（*Oryza sativa* cv. Nipponbare BL2）の発芽 3～4 日後の実生に処理し，12 時間後の根における AM 共生マーカー遺伝子（*AM1, AM2, AM3, RAM1*）の発現量を qRT-PCR により測定した。その結果, *AM1, AM3, RAM1* について発現量の顕著な増加が見られた。一方，Myc-LCO (C16:0，C18:1) およびキチン 7, 8 糖 では共にマーカー遺伝子の誘導は見られなかった。これらのことからグルコサミンを含む部分 *N*–脱アセチルキチンオリゴ糖が共生シグナル物質として機能している可能性が示唆された。現在，グルコサミンのみからなるキトサンオリゴ糖による共生マーカー遺伝子の発現誘導について解析を進めている。

arbuscular mycorrhizal fungi, Myc factor, chitin

講演番号：2D25a11
講演日時、会場：3 月 27 日 11:10～ D 校舎 25 会場

マメ科植物ミヤコグサにおける SWEET 輸送体ファミリーの解析

Analysis of SWEET transporters in a legume plant, *Lotus japonicus*

○吉水 麻祐子[1]、杉山 暁史[1]、齊田 有桂[1]、高梨 功次郎[1]、Davide Sosso[2]、Wolf B Frommer[2]、矢崎 一史[1]（[1]京都大生存研、[2]Carnegie Institution）
○Mayuko YOSHIMIZU[1], Akifumi SUGIYAMA[1], Yuka SAIDA[1], Kojiro TAKANASHI[1], Davide Sosso[2], Wolf B Frommer[2], Kazufumi YAZAKI[1] ([1]Kyoto Univ. RISH, [2]Carnegie Institution)

植物は自然界において様々な土壌微生物と相互作用することが知られている。特に、根粒菌及び菌根菌と植物との共生は、それぞれ窒素及びリン栄養の獲得に寄与し農業上重要であることから古くから研究されてきた。根粒菌はマメ科植物の多くと共生し、共生器官である根粒を形成する。根粒内部では根粒菌が大気中の窒素をアンモニアに変換して宿主植物へ供給し、その一方で宿主植物は根粒菌の生育に必要な炭素源などの養分を供給する。そのため、根粒内では様々な代謝物や無機イオンが複数の膜を超えて双方向に移動するため、多くの膜輸送体やイオンチャンネルがあると考えられる。しかし、根粒菌のエネルギー源となる炭素源の輸送経路に関しては、地上部から転流したショ糖が、根粒内で代謝されジカルボン酸の形態で根粒菌へ供給ことが生化学的に明らかにされているにも関わらず、この経路に関与する輸送体はほとんど明らかになっていない。さらに、マメ科を含め陸上植物の約 80%は菌根菌と共生するが、この共生系では、菌根菌が根圏に伸ばした菌糸を介してリンなどのミネラルを宿主植物へ供給する。一方宿主植物は、エネルギー源となる糖などを提供する。菌根共生においても、植物細胞から共生菌への炭素源供給を担う膜輸送体が存在すると考えられているが、未だ同定されてはいない。そこで本研究では、マメ科のモデル植物であるミヤコグサ（*Lotus japonicus*）を用いて、共生微生物への炭素源供給に関わる輸送体を解析するため、2010 年にシロイヌナズナで見出された新規糖輸送体ファミリーSWEET に着目して解析を行った。
ミヤコグサのゲノム上には 13 種の SWEET 遺伝子が存在するが、RT-PCR による発現解析の結果、根粒で発現するものは *LjSWEET3* のみであることが明らかになった。また、アーバスキュラー菌根菌（AM 菌）感染でも *LjSWEET3* のみ発現が上昇した。さらに、Real-time PCR 法により発現解析を行ったところ、*LjSWEET3* の発現は根粒の生育に伴って増加し、成熟した根粒内で最も高くなることが明らかになった。*LjSWEET3* の推定プロモーター領域として上流約 2 kb を単離し、Promoter:GUS 形質転換体を用いて組織発現解析を行ったところ、LjSWEET3 は地上部においては葉の付け根の腋芽部分、地下部では根、根粒、及び菌根が発達した付近の根の維管束柔組織で発現が認められた。また、GFP 融合タンパク質を用いた一過的発現解析により、LjSWEET3 は細胞膜局在であることが示唆された。現在、RNAi 形質転換体の解析及び、AM 菌感染条件下での LjSWEET3 発現の組織特異性を解析している。

sugar transporter, symbiosis, Lotus japonicus

講演番号：2D25a12
講演日時、会場：3 月 27 日 11:21～ D 校舎 25 会場

サツマイモネコブセンチュウのエフェクターたんぱく質 MSP7 の機能解析
Functional analysis of MSP7, an effector protein of root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*
○光増 可奈子[1]、相良 知実[1]、中上 知[1]、山口 泰華[1]、佐野 亮輔[2]、倉田 哲也[2]、後藤 デレック[3]、深尾 陽一朗[2]、澤 進一郎[1]([1]熊本大院・自然科学、[2]奈良先端大、[3]北海道大)
○Kanako MITSUMASU[1], Tomomi SAGARA[1], Satoru NAKAGAMI[1], Yasuka YAMAGUCHI[1], Ryosuke SANO[2], Tetsuya KURATA[2], Derek GOTO[3], Yoichiro FUKAO[2], Shinichiro SAWA[1] ([1]GSST, Kumamoto Univ., [2]NAIST, [3]Hokkaido Univ.)

【目的】　植物寄生性線虫は宿主への感染を成立させる際、エフェクターたんぱく質と呼ばれる分泌たんぱく質群を宿主細胞に注入することが知られている。宿主細胞はエフェクターたんぱく質の生理活性によってその構造や性質を変化させ、線虫が寄生できる場を提供するとともにその成長と繁殖に都合の良い環境を形成することになる。本研究では、サツマイモネコブセンチュウ（*Meloidogyne incognita*）が、シロイヌナズナ（*Arabidopsis thaliana*）に感染する際に注入するエフェクターたんぱく質の中でも、特に MSP7 と呼ばれるたんぱく質に注目して、その宿主細胞への作用機構を明らかにすることを目的とした。
【方法と結果】　これまでに Yeast Two Hybrid スクリーニングによって、MSP7 と相互作用する宿主因子の候補遺伝子として、B3 ドメインを含む転写因子をコードする遺伝子 *ABS2/NGAL1* を得ている。今回、*A. thaliana* の *ABS2/NGAL1* 過剰発現株（B3OX）や *ABS2/NGAL1* を機能抑制型に変換した過剰発現株（B3SRDX）を用いて、RNA-seq 解析を行った。その結果、B3OX と B3SRDX 共にストレス応答や、生物および非生物による刺激への応答に関わるとされる遺伝子群の発現が有意に変動していることがわかった。このことから、ABS2/NGAL1 は *M. incognita* の感染に応答して機能し、MSP7 はその機能を抑制することで感染を容易にしている可能性が考えられた。また、B3OX、B3SRDX に加え、MSP7 の過剰発現株（MSP7OX）に *M. incognita* を感染させ、感染後 14 日の根こぶの形成数を比較した。野生型株と比較して、B3OX や B3SRDX では根こぶ数はほぼ同数、MSP7OX ではやや多い傾向が見られたが、統計的に有意ではなかった。このことから、ABS2/NGAL1 および MSP7 は感染率には強く影響しないことが分かった。現在、各過剰発現株の根こぶ形成過程に注目し、根こぶの内部構造を組織学的に解析し、ABS2/NGAL1 と MSP7 の機能について検討している。

root-knot nematode, effector protein, *Arabidopsis thaliana*

講演番号：2D25a13
講演日時、会場：3 月 27 日 11:32～ D 校舎 25 会場

寄生植物 *Striga hermonthica* 由来 D14L タンパク質の構造機能解析
Structural and functional analysis of D14L protein from parasitic plant *Striga hermonthica*
○徐 玉群[1]、宮川 拓也[1]、中村 英光[1]、中村 顕[1]、大塚 淳[1]、浅見 忠男[1,2]、田之倉 優[1] ([1]東大院・農生科、[2]JST・CREST)
○Yuqun Xu[1], Takuya Miyakawa[1], Hidemitsu Nakamura[1], Akira Nakamura[1], Jun Ohtsuka[1], Tadao Asami[1,2], Masaru Tanokura[1] ([1]Grad. Sch. Agr. Life Sci., Univ. Tokyo, [2]CREST, JST)

「魔女の雑草」とも呼ばれているストライガ（*Striga hermonthica*）は、アフリカの農業生産に甚大な被害を及ぼす根寄生植物である。ストライガは、アフリカの農地に広く存在しており、休眠状態での寿命が長く、土壌中の種子を除去することは困難である。種子は、適した条件下で、宿主（或いは一部の非宿主）植物の根から分泌されたシグナル物質のストリゴラクトン（SL）を感受して発芽することが知られている。一方、SL は植物内在性ホルモンとして働き、イネにおける SL シグナル伝達は、α/β 加水分解酵素 D14 が SL の受容体として機能することにより行われることが示されている。また、シロイヌナズナの D14 様タンパク質（D14L）の KAI2 は、植物を燃やした際に煙に含まれる発芽促進物質カリキンの受容体として知られ、合成 SL アナログ GR24 との相互作用ならびに GR24 分解活性も認められている。したがって、種々の D14L タンパク質が SL シグナル伝達の制御に関与する可能性が考えられる。

本研究では、ストライガにおける D14 様タンパク質 ShD14L に着目し、SL 及びカリキンとの相互作用とその受容機構の解析に取り組んだ。*Striga hermonthica* の cDNA からクローニングされた D14L タンパク質について精製・結晶化を行い、in house の X 線回折装置を用いて、2.0 Å 分解能の X 線回折データを取得した。ShD14L の結晶構造は、分子置換法により決定され、D14 及び KAI2 と同様に、α/β 加水分解酵素フォールドからなるコアドメインとキャップ構造で構成されていた。コアドメインは、7 本の α ヘリックスと 7 本の並列した β ストランドからなり、キャップドメインは 4 つ α ヘリックスを形成していた。D14 及び KAI2 との構造比較から、ShD14L の活性ポケットが推定された。また、ShD14L には D14 及び KAI2 とは異なる構造的特徴も観測された。さらに、我々は等温滴定カロリメトリー等の結合アッセイを利用し、ShD14L とカリキンとの相互作用を観測することができ、活性ポケットを構成するアミノ酸残基に変異を導入することで、カリキン結合に関わる残基を同定した。

Dwarf14, karrikin, strigolactone

講演番号：2D25a14
講演日時、会場：3 月 27 日 11:43～ D 校舎 25 会場

ミヤコグサの根粒で発現するシステインプロテアーゼの解析
Analyses of nodule specific cystein proteases from *Lotus japonicus*
○藤江 誠[1]、金原 一真[2]、川崎 健[1]、山田 隆[1] ([1]広島大先端研、[2]広島大工)
○Makoto FUJIE[1], Kaduma KANEHARA[2], Takeru KAWASAKI[1], Takashi YAMADA[1] ([1]Hiroshima Univ., [2]Hiroshima Univ. Eng.)

マメ科植物と根粒菌の共生窒素固定系は、農業への利用価値が高く、また学術的にも興味深い分野であり、その分子メカニズムの解明が期待される。我々はレンゲソウ（*Astragalus sinicus*)を材料として、根粒特異的に発現するシステインプロテアーゼを解析してきたが、現在はミヤコグサ（*Lotus japonicus*)よりホモログを単離し、ミヤコグサを対象として研究を進めている。システインプロテアーゼは、植物中ではセネッセンス、アポトーシス、ストレス応答などで働くことが報告されている。ミヤコグサに存在する 4 個の根粒特異的システインプロテアーゼ遺伝子 GNf037h07、GNf089d01、GNf032f12、GNf071h01 は、それぞれの発現パターンが異なることが qRT-PCR により示されているが、それぞれの機能の詳細は不明である。そこで一連のシステインプロテアーゼ遺伝子の根粒内での発現時期・領域の特定や細胞内局在の解明に向けてレポーターを用いて解析することを目指した。

当研究室で以前に GFP を用いて根粒内での発現解析を行っているが、共生細胞内では GFP の蛍光が抑制されるため自家蛍光との判別が困難で、有意な結果は得られなかった。GUS は発色による検出が可能であり、自家蛍光が強くても利用できるため、レポーターとして GUS を用いた解析を行った。システインプロテアーゼのプロモーター領域を pGWB3 vector に組み込み、promoter-GUS-terminator カセットを作製後、pUB-GFP vector に導入して GUS を発現させるプラスミドを作製した。これを *Agrobacterium rhizogenes* LBA1334 株を用いて、毛状根形質転換法でミヤコグサに形質転換し、生じた毛状根に根粒菌を接種し根粒を形成させた。GFP 蛍光を指標として形質転換された根粒を選抜し、GUS 染色パターンを解析した。非常に興味深いことに、4 種類のシステインプロテアーゼはそれぞれが異なった発現パターンを示した。GNf037h07 は比較的に発現が弱めで、共生細胞を取り囲む周辺の柔細胞で発現が見られた。GNf089d01 は RT-PCR では発現が確認されていたが、GUS を用いた系では発現は確認されなかった。GNf032f12 は比較的に発現が強く、根粒内の感染領域で発現が確認された。また、一部の個体では感染領域では発現が見られず、根粒基部の維管束で発現が認められた。GNf071h01 は根粒内の維管束、根粒基部の維管束、根粒近傍の根の維管束で発現が認められた。4 種類のシステインプロテアーゼは、アミノ酸配列の相同性は高いが、根粒内ではそれぞれ異なる機能を分担していることが示唆された。現在は、プロテアーゼの機能解析を進めるために GNf037h07 について、プルダウンアッセイにより相互作用するタンパク質の検出を試みている。

Lotus japonicus, Nodule, cystein protease

講演番号：2D25a15
講演日時、会場：3 月 27 日 11:54～ D 校舎 25 会場

イネの Ca^{2+}依存性エンドヌクレアーゼである IREN は過敏感細胞死において認められる DNA 断片化の実行因子である

IREN functions in the degradation of nuclear DNA during the hypersensitive response cell death in rice

○若園 貴仁、大坪 由佳、日比野 孝紀、向 由起夫、蔡 晃植（長浜バイオ大院バイオ）
○Takahito Wakazono, Yuka Ootsubo, Takanori Hibino, Yukio Mukai, Fang-Sik Che (Nagahama Bio Univ.)

過敏感細胞死は植物が病原菌を認識したときに認められる植物免疫反応の一つであり、核 DNA の断片化などを伴う自発的な細胞死である。これまでに我々は、イネが褐条病細菌 *Acidovorax avenae* のイネ非病原性 N1141 菌株を認識すると過敏感細胞死が誘導されること、また、この過敏感細胞死が植物特有の転写因子である OsNAC4 によって誘導されることを明らかにすると共に、分子内に EF-hand モチーフを有するエンドヌクレアーゼ様分子をコードする *IREN*（immune-related endonuclease）が過敏感細胞死誘導時に OsNAC4 によって発現誘導されることを示した。そこで、過敏感細胞死における IREN の機能を明らかにすることを目的としてまず、IREN の細胞内局在について調べた。イネプロトプラストで IREN-Venus を発現させたところ、Venus 由来の蛍光が核に認められた。そこで、過敏感細胞死誘導時における IREN の蓄積部位を IREN 抗体によるウエスタンブロットで調べたところ、IREN は過敏感細胞死誘導時に核に蓄積することが示された。次に、IREN が、過敏感細胞死誘導時に認められる DNA の分解に関与しているかを明らかにするために、イネプロトプラストで IREN を一過的に過剰発現させたところ、核 DNA の分解が認められたことから、IREN は、過敏感細胞死誘導時に認められる DNA 断片化を引き起こすエンドヌクレアーゼであることが明らかとなった。次に、IREN のエンドヌクレアーゼとしての特性を明らかにするために、大腸菌を用いてリコンビナント IREN を作製し、DNA 分解酵素としての特性を調べた。その結果、リコンビナント IREN のエンドヌクレアーゼ活性は、Ca^{2+}、Mg^{2+}、Mn^{2+}を必要とし、Zn^{2+}によって阻害されることが示された。さらに、IREN エンドヌクレアーゼ活性の至適 pH は、Ca^{2+}、Mg^{2+}存在下においては pH 9 であることも示された。次に、過敏感細胞死における IREN の役割を明らかにするために、イネ培養細胞に IREN を過剰発現させたところ、明瞭な細胞死は認められなかった。一方、この IREN を酵母で発現させたところ、酵母の細胞死は誘導しなかったが、生育は阻害されることも明らかになった。このことから、IREN によって誘導される核 DNA の断片化は過敏感細胞死の誘発現象ではなく、過敏感細胞死の終着現象のひとつであることが示された。

DNA degradation, endonuclease, hypersensitive response

講演番号：2D25p01
講演日時、会場：3 月 27 日 14:00～ D 校舎 25 会場

ピレスリン生合成に関わる TcGLIP の機能および構造の解明（１）－X 線結晶構造解析をめざした酵素の発現と精製－

Function and structure of TcGLIP involved in pyrethrin biosynthesis (1) -Expression and purification of enzyme for X-ray structural analysis-

○宇都宮 麻衣、松田 和奈、廣瀬 友璃香、伊原 誠、松田 一彦（近畿大農・応生化）
○ Mai UTSUNOMIYA, Haruna MATSUDA, Yurika HIROSE, Makoto IHARA, Kazuhiko MATSUDA (Kinki Univ.)

【目的】

ピレスリンは除虫菊に含まれる殺虫成分で菊酸と 2 位に 3 種の置換基をもつ 4-ヒドロキシ-3-メチル-シクロペンテノロンが縮合したエステル化合物である。我々は他に先駆けてこのエステル結合の形成を触媒する酵素が GDSL リパーゼの一種であることを解明し TcGLIP と命名した。TcGLIP は、絶対配置を含めて基質を厳密に認識するが、そのメカニズムは未だに明らかにされていない。そこで本研究では、X 線結晶構造解析法を用いて TcGLIP の基質認識および反応のメカニズムを解明するため、結晶化に適した TcGLIP の調製方法と結晶化条件について検討したので報告する。

【方法と結果】

まず、TcGLIP のペリプラズム移行シグナル配列をマルトース結合タンパク質（MBP）と置換した MBP 融合タンパク質発現コンストラクトを作成した。このとき、MBP タグを容易に除去できるように HRV3C プロテアーゼ認識配列を MBP と TcGLIP の間に挿入した。大腸菌 BL21 株をはじめ数種の大腸菌株をもちいて、過剰発現に適した株の選抜を行ったところ、OrigamiB(DE3)pLysS 株が最も多くの可溶性タンパク質を与えることが判明した。しかし、大腸菌を用いて発現させた MBP 融合 TcGLIP は、ゲルろ過カラムクロマトグラフィーと電子顕微鏡分析により、大部分は凝集体を形成することが判明した。このことをふまえて TcGLIP の会合状態とピレスリン合成活性との関係を調べたところ、単量体が最も高いピレスリン合成活性を示すことが明らかとなった。

そこで、TcGLIP を単量体として調製するため、大腸菌での発現誘導は低温で行い、精製にはアミロースレジンを用いた。アフィニティ精製と 2 種類の担体を用いた陰イオン交換カラムクロマトグラフィーを組み合わせることで、単量体として単分散のゲルろ過カラムクロマトグラムを与えるタンパク質として、MBP 融合 TcGLIP を精製することに成功した。さらに、本融合タンパク質を HRV3C プロテアーゼで処理することにより MBP タグを切断した TcGLIP の精製を試みた。その結果、MBP タグを切断した TcGLIP は単量体として振る舞い、しかも MBP 融合タンパク質と変わらない反応速度論を示す TcGLIP を精製することに成功した。現在、このようにして精製した TcGLIP の結晶化条件のスクリーニングを行っており、その結果を併せて報告する。

TcGLIP, pyrethrin, *Tanacetum cinerariifolium*

講演番号：2D25p02
講演日時、会場：3 月 27 日 14:11～ D 校舎 25 会場

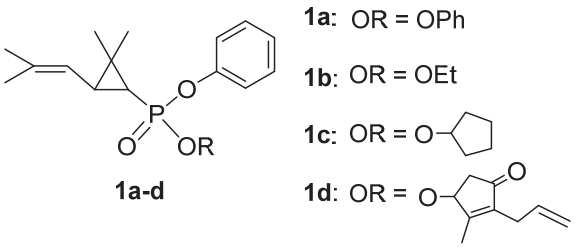
ピレスリン生合成に関わる TcGLIP の機能および構造の解明（２）　－ホスホン酸型反応機構依存的阻害剤の設計と合成－

Function and structure of TcGLIP involved in pyrethrin biosynthesis (2) -Design and synthesis of phosphonate mechanism-based inhibitors-

○明石 拓也[1]、竹内 孝幸[2]、宇都宮 麻衣[2]、伊原 誠[2]、松田 一彦[2]、平竹 潤[1] ([1]京大化研、[2]近畿大院・農・応生化)
○Takuya AKASHI[1], Takayuki TAKEUCHI[2], Mai UTSUNOMIYA[2], Makoto IHARA[2], Kazuhiko MATSUDA[2], Jun HIRATAKE[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Kinki Univ.)

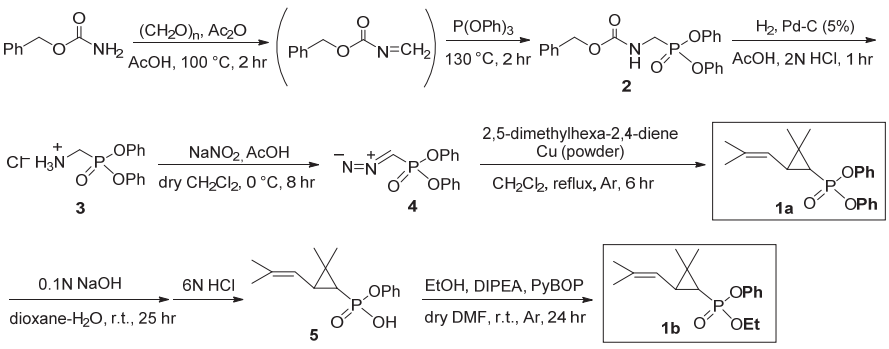
【背景・目的】

除虫菊のピレスリン生合成の最終段階を触媒する酵素（TcGLIP）は、セリン残基を活性中心とするリパーゼの一種である。すなわち、TcGLIP は、活性セリン残基による菊酸 CoA チオエステルへの求核攻撃ののち、アシル酵素中間体を生成、レスロロンによる脱アシル化を経る二段階のエステル交換反応によりピレスリンを生成する。その反応機構は、セリンプロテアーゼときわめて類似しており、そのため、有機リン酸エステルによりセリン残基をリン酸化することで不可逆的な阻害が可能であると考え、ホスホン酸ジエステル型阻害剤 **1a-d** を合成した。



【方法・結果】

ホスホン酸ジエステル **1a** および **1b** の合成経路を Scheme 1 に示す。Benzyl carbamate と paraformaldehyde および $P(OPh)_3$ を Ac_2O の存在下で縮合させアミノホスホン酸誘導体 **2** を合成した。接触水素化分解によりアミン **3** としたのち、sodium nitrite によりアミノ基をジアゾ化する段階で検討を重ねた結果、無水 CH_2Cl_2 溶媒、0 ˚C、AcOH 触媒という条件下、約 90%の収率でジアゾ化合物 **4** を得ることができた。ジアゾ化合物 **4** と 2,5-dimethylhexa-2,4-diene を、銅粉触媒下、CH_2Cl_2 溶媒中 Ar 気流下で加熱環流することによりシクロプロパン化し、ジフェニルエステル **1a** を *cis* および *trans* 体の混合物として得た。さらに、化合物 **1a** を NaOH で加水分解し、モノフェニルエステル **5** を定量的に得た後、縮合剤 PyBOP および塩基 DIPEA の存在下、EtOH と室温で 24 hr 反応させ、ホスホン酸ヘテロジエステル **1b** を合成した。化合物 *cis* および *trans*-**1a** を完全に分離した後、それらを出発原料に、同様の方法で cyclopentanol および allethrolone を反応させ、阻害剤 **1c** および **1d** の *cis* および *trans* 体をそれぞれ選択的に合成し、TcGLIP に対する阻害活性を調べる予定である。



Scheme1. Synthesis of phosphonates **1a** and **1b**

pyrethrin biosynthesis, TcGLIP, inhibitor

講演番号：2D25p03
講演日時、会場：3 月 27 日 14:22～ D 校舎 25 会場

ピレスリン生合成に関わる TcGLIP の機能および構造の解明（３）　　－阻害活性と阻害の様式－

Function and structure of TcGLIP involved in pyrethrin biosynthesis (3) -Activities and mode of action of phosphonate inhibitors-

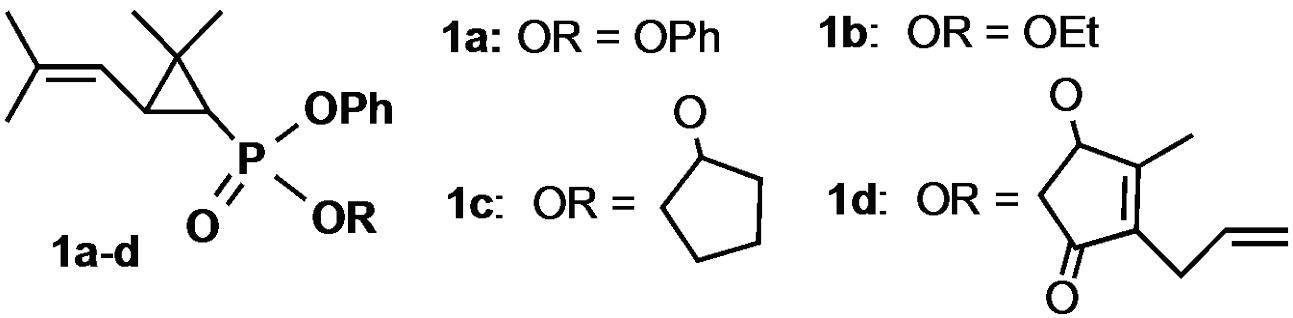
○竹内 孝幸[1]、明石 拓也[2]、宇都宮 麻衣[1]、伊原 誠[1]、平竹 潤[2]、松田 一彦[1] ([1]近大院農・応生化、[2]京大化研)

○Takayuki Takeuchi[1], Takuya Akashi[2], mai Utsunomiya[1], Makoto Ihara[1], Jun Hiratake[2], Kazuhiko Matsuda[1] ([1]Kinki Univ., [2]Kyouto Univ.)

【目的】ピレスリンは除虫菊（*Tanacetum cinerariifolium*）が生合成する天然殺虫性物質であり、菊酸とピレスロロンからなるエステル化合物である。我々はこれまでにこのエステル結合の形成を触媒する酵素”TcGLIP”が GDSL リパーゼファミリーの一種であることを明らかにしているが、基質である菊酸 CoA およびピレスロロンの基質認識や反応メカニズムの詳細は未解明である。本研究では、係る問題を解決するためのケミカルプローブとして、前演者が発表した、TcGLIP の反応機構依存的阻害剤となるリン酸エステル類（下図）の組換え TcGLIP に対する阻害活性を評価したので報告する。

【方法】TcGLIP は大腸菌 Origami B 株を用いてマルトース結合タンパク質（MBP）融合タンパク質として発現させ、アフィニティークロマトグラフィーと陰イオン交換クロマトグラフィーで精製した。酵素活性は菊酸 CoA とピレスロロンとの反応により生じたピレスリン I を HPLC で定量することにより求めた。一連の TcGLIP 阻害剤 **1a-d** の阻害活性は、阻害剤と精製酵素を一定時間インキュベートした後の残存酵素活性と阻害剤処理前の酵素活性を比較することで評価した。

【結果】MBP 融合状態と MBP 切断後の TcGLIP のピレスリン I 合成活性に関する速度論的パラメーターを求めたところ、MBP の存在は反応速度論に影響しないことを明らかにした。そこで、実験の簡便性を重視して MBP と融合させた TcGLIP に対するホスホン酸ジフェニルエステル **1a** の阻害活性を測定した。その結果、化合物 **1a** は濃度依存的、かつ、インキュベーションの時間依存的に TcGLIP を阻害し、その阻害様式は不可逆的であった。本講演では、ジフェニルエステル **1a** 以外のホスホン酸ジエステル型阻害剤 **1b-d** の TcGLIP 阻害活性についても合わせて紹介する予定である。



ピレスリン生合成酵素 TcGLIP 阻害剤

Pyrethrin, TcGLIP, Inhibitor

講演番号：2D25p04
講演日時、会場：3 月 27 日 14:33～ D 校舎 25 会場

膜結合型ダイズ PDI ファミリーPDIL7 の同定及びその酵素学的性質の解析
Identification and analysis of the enzymatic properties of soybean membrane-bound protein disulfide isomerase family protein GmPDIL7
○奥田 綾、松崎 元紀、三田 竜太、増田 太郎、裏出 令子（京大院農・農学）
○Aya OKUDA, Motonori MATSUSAKI, Ryuta MITA, Taro MASUDA, Reiko URADE (Kyoto Univ.)

【目的】真核細胞の粗面小胞体で生合成されるタンパク質の大部分は分子内あるいは分子間ジスルフィド結合を有しており、これらはフォールディングと立体構造の安定化に重要な役割を果たしている. 細胞小胞体にはタンパク質の酸化的フォールディングを担う複数の Protein Disulfide Isomerase (PDI)ファミリーが存在し、それらの多くがジスルフィド結合形成を伴うフォールディング活性を有するが、反応には Ero1 などの他の酸化酵素からのジスルフィド結合の供給が必要である. PDI ファミリーの酵素化学的性質や作用機構については哺乳動物や酵母で研究が先行し, 植物の PDI ファミリーについては未解明な部分が多い. 本研究では, 新規なダイズの膜結合型 PDI ファミリーPDIL7 を同定し, その酵素学的性質を明らかにすることを目的とした.
【方法・結果】ダイズ全ゲノム配列データベース上でのホモロジーサーチによりダイズ PDIL7 遺伝子 (*GmPDIL7*) を見いだし, ダイズ葉から調製した mRNA を用いて RT-PCR により cDNA をクローニングした. cDNA の塩基配列から推定された GmPDIL7 のアミノ酸配列には, N 末端シグナル配列, 活性中心 CGHC を有するチオレドキシン様配列, C 末端近傍の 1 回膜貫通領域が存在していた. リアルタイム RT-PCR により, GmPDIL7 の mRNA はダイズ組織に普遍的に発現し, 特に根での発現が高いことが明らかとなった. 登熟過程の種子においては, 胚の発生初期と登熟後期に比較的高い発現が見られた. *GmPDIL7* cDNA を用いて, シグナル配列と膜貫通領域以降の C 末端領域を除いたリコンビナント GmPDIL7(rGmPDIL7)の大腸菌発現系を構築し, 精製標品を調製した. システイン残基を 2 個含む decapeptide を基質として測定した rGmPDIL7 のチオール酸化活性は, これまでに同定された 5 種類のダイズ PDI ファミリーと同等の酸化活性を示した. 一方、グルタチオン共存下での還元変性 RNaseA を基質とした酸化的リフォールディング活性は, 既知ダイズ PDI ファミリーの中で最も低いことが明らかとなった. 一方 , rGmPDIL7 は PDI ファミリータンパク質の活性化酵素である GmEro1 により迅速に酸化されることがグルタチオン, NADPH, NADPH レダクターゼとのカップリング系による測定で明らかとなった. そこで, GmEro1 共存下での還元変性 RNaseA の酸化的リフォールディング活性を測定したところ, 他の PDI ファミリーに比して低い活性が検出された. 遊離チオール基の Maleimide PEG 修飾法により測定した GmPDIL7 活性中心チオール基の酸化還元平衡定数は 19.9 mM であった. この値から小胞体内のレドックス環境で GmPDIL7 の活性中心は主に酸化型であると考えられた. 以上の結果から, GmPDIL7 は生体内で主にタンパク質にジスルフィド結合を導入する酸化酵素として働くことが示唆された.

PDIL7, protein disulfide isomerase, oxidative folding

講演番号：2D25p05
講演日時、会場：3 月 27 日 14:44～ D 校舎 25 会場

ダイズ種子貯蔵タンパク質の立体構造形成に関わる 2 種類の PDI ファミリーによる協働的作業の分子機構
Molecular mechanism of cooperative oxidative folding by two soybean protein disulfide isomerase family proteins
○松崎 元紀、奥田 綾、小石原 克典、三田 竜太、廣瀬 明歩、増田 太郎、裏出 令子（京大院農・農学)
○Motonori MATSUSAKI, Aya Okuda, Katsunori Koishihara, Ryuta Mita, Akiho Hirose, Taro Masuda, Reiko Urade (Kyoto Univ.)

【背景と目的】主要作物であるダイズは栄養源として種子貯蔵タンパク質であるグリシニンおよびβ-コングリシニンを蓄積する。これらの貯蔵タンパク質の蓄積には、子葉細胞小胞体でのジスルフィド(S-S)結合を伴ったフォールディング(酸化的フォールディング)が必須である。酵母および動物細胞の主要な酸化的フォールディング経路として、Ero1-Protein Disulfide Isomerase (PDI)経路が知られている。我々はダイズにおいて、複数の PDI ファミリーがグリシニンおよびβ-コングリシニンのフォールディングに関与していること見出したが [1-3]、一つの基質に複数の PDI ファミリーが同時に働くという報告は動物でもほとんど存在せず、その作用機構は全く不明であった。これまでに、ダイズの Ero1 オーソログ(GmEro1)は、ダイズ PDI ファミリーのうち GmPDIM を酸化(活性化)するが、GmPDIL-2 を酸化しないこと、GmPDIM と GmPDIL-2 が小胞体内で会合していること、また *in vitro* で協働的に作用し迅速な酸化的フォールディングを行うことを明らかにしてきた。本研究では、GmEro1 と GmPDIM および GmPDIL-2 の連携による酸化的フォールディングの作用機構を S-S 結合形成という視点から詳細に明らかにすることを目的とした。**【方法と結果】**GmEro1、GmPDIM、GmPDIL-2 及びこれらの変異タンパク質を大腸菌発現系を用いて大量発現し、純化した。GmEro1 存在下での GmPDIM および GmPDIL-2 共存系による還元変性 RNaseA の酸化的フォールディング速度は、単独の GmPDIM あるいは GmPDIL-2 による速度の和の 4.5 倍となり、GmPDIM と GmPDIL-2 が協働的に作用することが示された。このとき、RNaseA への S-S 結合導入速度も 2 倍に上昇することを Ellman 法により明らかにした。NADPH とグルタチオンレダクターゼをカップリングさせる方法で GmEro1 による GmPDIM の酸化速度を測定し、GmPDIL-2 の共存により単独の場合の 1.4 倍に酸化が促進されることを明らかにした。この GmPDIL-2 による促進効果は、活性中心変異により GmPDIL-2 の酸化還元触媒活性を欠失させると消失した。以上の結果から、GmEro1 により形成された GmPDIM の活性中心の S-S 結合が GmPDIL-2 の活性中心へ転移することで GmPDIL-2 が活性化される反応の存在が示唆された。我々は、GmEro1 存在下で GmPDIM と GmPDIL-2 共存系でみられる酸化的フォールディング反応の相乗的な促進は、GmPDIM を介して活性化された GmPDIL-2 による基質の S-S 結合形成の促進と、高いフォールディング能を有する GmPDIL-2 による基質のフォールディング速度の加速によると考えている。1) Wadahama, H., et al. (2007) *FEBS J.*, **274**, 687-703. 2) Wadahama, H., et al. (2008) *FEBS J.*, **275**, 399-410. 3) Kamauchi, S., et al. (2008) *FEBS J.*, **275**, 2644-2658.

protein disulfide isomerase, Ero1, folding

講演番号：2D25p06
講演日時、会場：3 月 27 日 15:05～ D 校舎 25 会場

トチュウ(*Eucommia ulmoides*)由来ファルネシル二リン酸合成酵素の機能解析
Functional characterization of Eucommia farnesyl pyrophosphate synthase

○梶浦 裕之[1]、鈴木 伸昭[1]、武野 真也[1]、金子 嘉信[2]、藤山 和仁[3]、中澤 慶久[1] ([1]日立造船株式会社、[2]大阪大院・酵母リソース、[3]大阪大・生物工学国際交流センター)
○Hiroyuki KAJIURA[1], Nobuaki SUZUKI[1], Shinya TAKENO[1], Yoshinobu KANEKO[2], Kazuhito FUJIYAMA[3], Yoshihisa NAKAZAWA[1] ([1]Hitachi Zosen Corporation, [2]Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [3]ICBiotech, Osaka Univ.)

【 目的 】トチュウ(*Eucommia ulmoides*)は温帯圏で生育する落葉性の高木で, バイオポリマーである長鎖の *trans*-ポリイソプレンを合成する．この長鎖 *trans*-ポリイソプレン生合成にはアリル基質に対しイソペンテニル二リン酸(IPP)を連続的に転移させる *trans*-prenyltransferase (TPT)が関与する．当研究室ではトチュウ EST ライブラリーを構築し，トチュウにある 5 種類の TPT の存在を明らかにした[1)]．しかし，これまで他の生物から同定されている TPT の多くはファルネシル二リン酸（FPP，C_{15}）をはじめとする短鎖のイソプレン化合物を合成し，この FPP を合成する FPP synthase (FPS)がトチュウ由来 5 種類の TPT 内にも含まれることが予想された．そこで本研究ではトチュウに存在する TPT のうち FPS と推測される EuTPT2，4 の機能解析を行った.

【 方法 】2 種類のトチュウ由来 *TPT*(*EuTPT2*，*4*)をクローニングした後，EuTPT2，4 が細胞内で FPS として機能することを出芽酵母 *erg20*欠損株の相補性試験で確かめた. さらに両酵素の機能解析を行うため, C 末端に His-tag を融合した組換えタンパク質を大腸菌で発現させた．両酵素の発現を確認後，Co^{2+}カラムで精製し，精製タンパク質に対しアリル基質と IPP を加え諸条件下で反応させ，反応産物を薄層クロマトグラフィー，UPLC，あるいは LC-MS により解析した.

【 結果 】EuTPT2，4 はそれぞれ 342，及び 349 アミノ酸からなり，TPT に存在する 7 つの保存領域と $DD(X)_nD$ モチーフを 2 箇所保持していた．*EuTPT2*，*4* は出芽酵母 *erg20* 変異株を相補し，粗酵素溶液に Dimethylallyl pyrophosphate (DMAPP)と IPP を加え反応させた結果，最終産物として FPP を合成した．また大腸菌で発現し精製した組換え酵素の諸性質を確認したところ，そのアリル基質の選好性は異なったものの両酵素は DMAPP，及び Geranyl pyrophosphate に対し IPP を転移し FPP を合成した．興味深いことに，FPP をアリル基質にした場合，両酵素は Geranylgeranyl pyrophosphate も合成し，酵素反応の際 Mg^{2+}のみならず，Co^{2+}及び Mn^{2+}も EuTPT2，4 に結合し，酵素の IPP の転移反応を活性化することが明らかとなった.

1) Suzuki *et al.*, *Planta*, **236**, 1405-1417, (2012)

Eucommia ulmoides, Farnesyl pyrophosphate synthase, *trans*-prenyltransferase

講演番号：2D25p07
講演日時、会場：3 月 27 日 15:16～ D 校舎 25 会場

オジギソウ由来ミモシナーゼとシスタチオニンβ-リアーゼの進化的関係
Evolutionary relationships between *Mimosa* mimosinase and cystathionine ß- lyase
○大貝 茂希[1]、福田 雅一[1]、屋 宏典[2]、多和田 眞吉[1] ([1]琉球大農、[2]琉球大熱生研)
○Shigeki OGAI[1], Masakazu FUKUTA[1], Hirosuke OKU[2], Shinkichi TAWATA[1] ([1]Ryukyu Univ., [2]Ryukyu Univ Comb.)

【目的】ミモシナーゼは、亜熱帯マメ科植物ギンネム・オジギソウの有するアレロパシー物質ミモシンを加水分解し、3H4P (3-hydroxyl-4-(1H)-pyridone)、ピルビン酸及びアンモニアを生成する反応を触媒するピリドキサール-5'-リン酸(PLP)要求酵素である。触媒する反応において炭素と窒素の結合を切断するため C-N リアーゼに分類される。一方、ミモシナーゼは、シスタチオニンβ-リアーゼ(CBL)と高い相同性を示し(~59%)、遺伝子重複を経た進化により生じた酵素であることが示唆されているが、CBL は炭素と硫黄の結合を切断する C-S リアーゼに分類され、両酵素は互いの基質に対して触媒作用を示すことはない。それらのことから C-S リアーゼである CBL が C-N リアーゼであるミモシナーゼに変異したメカニズムを解明することは酵素の分子進化や機能の解明、人工分子設計に寄与出来るのではないかと考えられる。【方法・結果】オジギソウ由来ミモシナーゼについて、2 次構造予測を行い、配列の報告されている植物由来 CBL の 2 次構造予測との比較を行った。また、3 次元構造がすでに明らかになっているシロイヌナズナ由来 CBL(相同性 54.8%)鋳型として、ホモロジーモデリングを用いて酵素の構造を三次元化し、酵素の基質結合部と基質とのドッキングシミュレーションにより、結合に関わるアミノ酸残基の推測を行った。2 次構造予測では顕著な差は見られず、3 次元構造化では基質結合ポケット内での変異はあまり確認できなかったが、ドッキングシミュレーションによりミモシンのピリドン環と相互作用する可能性の高い Asn106 やシスタチオニンの遠位アミノ基及び遠位カルボキシル基と相互作用する可能性の高い Ser102、Lys284 において変異が起こっていることが分かった。今回判明した部位と、アライメントによって重要であると思われる部位に Inverse PCR 法を用いて変異を導入し、活性に与える影響を調査した。

Mimosine, Mimosinase, Molecular evolution

講演番号：2D25p08
講演日時、会場：3 月 27 日 15:27～ D 校舎 25 会場

ヒヤシンス・トリプシンインヒビター前駆体の同定

Identification of hyacinth trypsin inhibitor precursors

○塩井 成留実、藤 秀美、村瀬 優美、寺田 成之（福岡大学理）
○Narumi SHIOI, HIDEMI TO, YUMI MURASE, SHIGEYUKI TERADA (Fukuoka Uni. Dep., Chem.)

【目的】
当研究室では、ヒヤシンス球根より Bowman-Birk 型のトリプシンインヒビター(LHTI)を十数種単離している。最近、LHTI の遺伝子構造は、成熟タンパク質にはない短い配列（DGHRAAVGLPASRSDAEVAV、linker 配列）を隔て複数の LHTI が 1 つながりの前駆体としてコードされていること、また、その前駆体は linker 配列の Glu20-Val21 間をヒヤシンス芽抽出物に含まれる LHTI プロセシング酵素(linker processing enzyme, LPE)によって切断されることがわかってきた。しかしながら、ヒヤシンス球根中から LPE や LHTI 前駆体の単離および同定までには至っていない。本研究では、LHTI cDNA クローニングより得られた塩基配列をもとに LHTI 前駆体の構造について報告する。また、1 年のどの時期に LHTI の前駆体やその成熟型が存在するのかをヒヤシンス球根(鱗茎)や芽を用いてウエスタンブロッティングより調査したので併せて報告する。
【方法】
前駆体遺伝子の解析：ヒヤシンス球根から抽出した RNA から cDNA を調製し、特異的なプライマーにより LHTI 遺伝子全長のクローニングを行った。
LHTI 前駆体と成熟体の発現時期の調査：各月のヒヤシンス鱗茎および芽より、タンパク質と DNA を単離した。抗 LHTI ポリクローナル抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った。
前駆体遺伝子の発現:発現ベクターには pET32a を、宿主細胞には大腸菌 Rosetta-gami B(DE3)pLysS を用い、発現を誘導した。
linker 配列切断活性：LHTI-X1 (thioredoxin-S-His tag と linker 配列がついた LHTI を大腸菌で発現)と芽抽出物を 37℃で反応後、電気泳動で分解を調べた。切断箇所は逆相 HPLC とアミノ酸配列分析で同定した。
【結果】
発芽時期球根中の cDNA クローニングの結果、LHTI 前駆体遺伝子は、282 アミノ酸残基をコードしており、開始コドンを含む新規の配列(head 配列)に続き、3 つの異なる LHTI が linker 配列を挟むようなタンデムにコードされていた。また、linker 配列内の 3 残基、6 残基が欠失しているクローンも単離することに成功した。各月のヒヤシンス芽および鱗茎のウエスタンブロッティングの結果、鱗茎においては、前駆体と考えられる約 30kDa の位置にバンドを検出し、そのバンドは発芽時期の 3-5 月に減少していた。一方、成熟型と推測される約 10kDa のバンドはどの時期にも存在していた。芽においては 1-4 月までは 30kDa、10kDa のどちらにもバンドが検出されなかった。

trypsin inhibitor precursors, precursor processing enzyme, expression

講演番号：2D25p09
講演日時、会場：3 月 27 日 15:38～ D 校舎 25 会場

発熱植物ザゼンソウにおける PEBP 遺伝子ファミリーの同定および解析

Functional analysis of the PEBP genes in thermogenic skunk cabbage (*Symplocarpus renifolius*)

○稲葉 靖子[1,2]、増子（鈴木） 潤美[3]、前川 春彦[2]、渡辺 正夫[3]、稲葉 丈人[2] ([1]宮崎大 TT 推進、[2]宮崎大農、[3]東北大院・生命科学)
○Yasuko Inaba[1,2], Hiromi Masuko-Suzuki[3], Haruhiko Maekawa[2], Masao Watanabe[3], Takehito Inaba[2] ([1]Miyazaki Univ, OPTT., [2]Miyazaki Univ., [3]Tohoku Univ.)

【背景と目的】植物による発熱現象は、これまで種子植物の中の原始的な植物を中心に、約 80 種類の植物で報告がある。その中でサトイモ科に属するザゼンソウは発熱能力が高いことで知られており、氷点下を下回る寒冷環境下でも花の体温を 20℃前後に保つ。ザゼンソウを含む多くの発熱植物は花の開花とほぼ同時に発熱を開始することから、発熱機構を理解するためには開花機構の解明が不可欠であるが、発熱する植物の開花制御機構については不明な点が多い。そこで本研究では、一般の植物の花成に重要な役割を担う PEBP（phosphatidyl ethanolamine-binding protein）遺伝子ファミリーのうち、主要なサブファミリーの一つである *FT*（*FLOWERING LOCUS T*）に着目して、ザゼンソウの花成および開花制御機構における当該遺伝子の役割を明らかにするとともに、発熱と開花の関係を分子レベルで探ることを目的とした。
【方法と結果】まず、ザゼンソウ花の cDNA データベース上で PEBP 遺伝子の探索を行い、Sr*FT* および Sr*MFT*（*MOTHER OF FT AND TFL1*）の部分配列を取得後、得られた配列を基にザゼンソウの cDNA から全長遺伝子の単離・同定を行った。系統樹解析から、SrFT は単子葉植物 FT グループの中で初期に分岐した FT であり、ラン科植物の FT と近距離に位置していた。一方、SrMFT は FT よりも進化的に古い MFT サブファミリーの中で、被子植物グループに分類された。*SrFT* 遺伝子を形質転換したシロイヌナズナの解析から、SrFT には一般の植物 FT と同様に花成を促進する役割があることが示された。加えて、ザゼンソウにおける詳細な発現解析の結果、*SrFT* は葉に加えて花の維管束組織でも高く発現しており、花蕾から開花に至る過程で発現が上昇したことから、花成の後の段階である開花の過程にも関与することが示唆された。さらに、*SrFT* はシアン耐性呼吸酵素をコードする *SrAOX* と花内部の組織間で類似した発現分布を示し、マイクロアレイの解析から両遺伝子と同様の発現分布を示す遺伝子としてミトコンドリア機能や呼吸代謝に関わる多くの遺伝子が同定された。したがって、開花関連遺伝子と呼吸/発熱関連遺伝子を共通に制御する機構の存在が示唆された。一方、*SrMFT* は、*SrFT* に比べて発現の特異性が低く、解析した全てのザゼンソウ組織およびステージで一様に発現していた。現在、*SrMFT* を形質転換したシロイヌナズナを作出しており、本大会では、*SrMFT* の機能についても合わせて報告する予定である。

FLOWERING LOCUS T, Floral thermogenesis, Respiration

講演番号：2D25p10
講演日時、会場：3 月 27 日 15:49～ D 校舎 25 会場

ナス科植物ステロイドグリコアルカロイドの構造多様性に関わる生合成酵素の機能解析
Characterization of the biosynthetic enzymes involved in the structural diversity of steroidal glycoalkaloids in *Solanaceae*

○中安 大[1]、梅基 直行[2]、大山 清[3,4]、渡辺 文太[5]、村中 俊哉[6]、斉藤 和季[7]、杉本 幸裕[1]、水谷 正治[1] ([1]神戸大院・農、[2]キリン・基盤研、[3]東工大院・理工、[4]理研 CSRS、[5]京大・化研、[6]大阪大院・工、[7]千葉大院・薬)
○ Masaru NAKAYASU[1], Naoyuki UMEMOTO[2], Kiyoshi OHYAMA[3,4], Bunta WATANABE[5], Toshiya MURANAKA[6], Kazuki SAITO[7], Yukihiro SUGIMOTO[1], Masaharu MIZUTANI[1] ([1]Grad. Sch. Agric. Sci., Kobe Univ., [2]Central Lab. Key Tech., Kirin Co., Ltd, [3]Grad. Sch. Chem. & Mater. Sci., Tokyo Tech. Univ., [4]CSRS, RIKEN, [5]ICR, Kyoto Univ., [6]Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [7]Grad. Sch., Pharm. Sci., Chiba Univ.)

【背景および目的】
ナス科植物であるジャガイモ、トマト、ナスにはそれぞれα-ソラニン、α-トマチン、α-ソラソニンといった分子内に窒素原子を持つステロイドグリコアルカロイド（SGA）が多く含まれている。一方、トウガラシはカプシコシドという窒素原子を持たないステロイドサポニンを蓄積している。また、4 種の化合物の 25 位の立体は互いに異なる。α-ソラニン、α-トマチンの立体は 25*S*型である一方、α-ソラソニン、カプシコシドでは 25*R*型である。SGA はコレステロールを前駆物質とし、C-16, 22, 26 位の酸化、C-26 位のアミノ化、E, F 環形成、C-3 位の配糖化を経て生合成されると推定されている。しかし、生合成遺伝子および生合成経路は明らかとなっていない。したがって、SGA 生合成を分子レベルで明らかにすることを目的とした。

【結果および考察】
先行研究において、ジャガイモ、トマト由来の 2 種の P450 遺伝子（*SGA1*, *SGA2*）がコレステロール C-26 水酸化、C-22 水酸化をそれぞれ触媒することを同定した。本研究では、ナス科植物ステロイドサポニンの立体構造の多様性を解明するために、ナス、トウガラシから *SGA1* ホモログ（*SGA1H*）を単離した。SGA1H は SGA1 とアミノ酸レベルで 75%の相同性を示した。続いて、昆虫細胞－バキュロウイルス発現系を用いて SGA1H 組換えタンパク質を作製し活性を評価した結果、22-ヒドロキシコレステロールを基質として 26 位の水酸化を触媒する活性を確認した。現在、更なる機能解析を行っている。我々は SGA の立体構造の多様性は SGA1 および SGA1H による C-26 水酸化活性の立体選択性に起因していると考えている。

Solanaceae, steroidal glycoalkaloid, P450

講演番号：2D25p11
講演日時、会場：3 月 27 日 16:10～ D 校舎 25 会場

アセロラにおけるアスコルビン酸生合成酵素 GDP-D-mannose pyrophosphorylase の転写調節機構の解明

Transcriptional regulation mechanism of gene for GDP-D-mannose pyrophosphorylase, ascorbic acid biosynthesis enzyme in acerola.

○近藤 隆之、藤川 愉吉、江坂 宗春（広島大院生物圏）
○Takayuki KONDO, Yukichi FUJIKAWA, Muneharu ESAKA (Hiroshima Univ.)

【目的】アスコルビン酸(AsA)はビタミン C として知られ、その強い還元能により活性酸素種を無毒化するなど、植物における抗酸化物質として重要な機能を有している。植物において AsA は D-fructose-6-P を初発物質とする Smirnoff-Wheeler 経路で主に生合成されると考えられている。アセロラは、その果実に AsA を大量に含んでおり AsA 高含有植物として知られている。しかし、アセロラにおいて AsA 生合成がどのように制御され、AsA を豊富に生合成、集積するのかは不明である。これまで当研究室では、アセロラ果実について、Smirnoff-Wheeler 経路の AsA 生合成酵素である GDP-D -mannose pyrophosphorylase (GMP)の発現調節機構に着目し研究を行ってきた。その結果、アセロラ GMP 遺伝子上流域-1100~-1080 bp の領域に転写活性化シス因子が存在する可能性を示した。本研究では、アセロラ GMP の転写調節機構の解明を目的として、アセロラ GMP プロモーターの転写活性化シス因子およびトランス因子について解析した。
【方法・結果】初めに、シロイヌナズナ GMP 遺伝子上流域を、部分的に、アセロラ GMP 遺伝子上流域に置換し、ルシフェラーゼをレポーター遺伝子としたプロモーター解析を行った。その結果、アセロラ GMP 遺伝子上流域-1100~-1080 bp の導入では、プロモーター活性の増加が認められなかったのに対し、-1200~-600 bp ではプロモーター活性の増加が認められた。このことは、アセロラ GMP 遺伝子の発現は、その遺伝子上流域-1100~-1080 bp だけでなく-1200~-600 bp に存在する複数のシス因子により調節されている可能性を示唆している。次いで、アセロラ GMP 遺伝子上流域-1200~-600 bp に対するトランス因子の存在を明らかにするために、上流域-1200~-600 bp の DNA 断片をビオチン標識し、アセロラおよびシロイヌナズナ葉から抽出した核タンパク質を用いてゲルシフトアッセイを行った。現在、アセロラ GMP プロモーターの転写活性化シス因子およびトランス因子の同定を試みている。

ascorbic acid, Acerola, gene expression

講演番号：2D25p12
講演日時、会場：3 月 27 日 16:21～ D 校舎 25 会場

ヌクレオシド三リン酸による ACC 酸化酵素の活性調節

Regulation of ACC oxidases by nucleoside triphosphate

○飯尾 野生、前川 拓磨、宇野 知秀、金丸 研吾、山形 裕士（神大院農・生機科）
○hiroki IIO, takuma MAEKAWA, tomohide UNO, kengo KANAMARU, hiroshi YAMAGATA (Grad. School Agr. Sci., Kobe Univ)

［目的］エチレンは、花芽の形成、器官脱離、果実の追熟、感染防御など様々な生理現象を制御している重要な植物ホルモンである。エチレンはメチオニンから S-アデノシルメチオニン、1-アミノシクロプロパン-1- カルボン酸（ACC）を経て合成される。ACC 酸化酵素（ACO）は ACC を酸化しエチレンに変換する最後の反応を触媒し、アスコルビン酸、炭酸水素イオン、Fe(Ⅱ)イオンを補因子として必要とするが、これら補因子の作用機構やその他の活性調節因子などについては不明な点が多い。本研究では、シロイヌナズナとトマトの ACO についてヌクレオシド三リン酸による活性調節機構を中心に新たな酵素学的特性を報告する。

［方法・結果］大腸菌で発現・精製したシロイヌナズナの AtACO2 とトマトの LeACO1 の至適 pH はともに pH 6.9 であったが、両酵素とも pH の上昇に伴い失活した。アルカリ性での失活は可逆的であり、還元型グルタチオンの添加によりこの失活を部分的に防げたことから、失活は酵素の酸化によることが示唆された。AtACO2 の活性は 12 mM ヌクレオシド三リン酸（NTP）で 15 分間前処理することにより約 5 倍に増加することを見出した。4 種類の NTP（ATP、GTP、CTP、UTP）の間でこの活性化の程度に差がなかった。AtACO2 はヌクレオシド二リン酸でも約 2 倍に活性化されたが、ヌクレオシド一リン酸は活性に影響しなかった。また、トリポリリン酸でも約 3 倍に活性化されたがピロリン酸、リン酸は活性に影響しなかったことから、NTP による ACO 活性の調節には NTP の 3 個のリン酸基が重要であることが示唆された。一方、LeACO1 の活性は NTP により AtACO2 とは逆に 50%程度阻害された。これまで NTP による ACO 活性の調節の報告はなく、今回の結果は生理的にも重要な発見と考えられる。一方、AtACO2（320 残基）の C 末端側 100 残基と LeACO1（315 残基）の C 末端側 98 残基を交換した組換えキメラ酵素の内、$AtACO2^{1\text{-}220}$－$LeACO1^{221\text{-}318}$ は NTP による活性化がほぼ消失したのに対し、$LeACO1^{1\text{-}217}$－$AtACO2^{218\text{-}317}$ は NTP により阻害されず、逆に約 2 倍に活性化した。また、既報の *Petunia hybrid* の ACO の三次構造を基に作成した AtACO2 と LeACO1 の構造モデルを比較したところ、C 末端側 100 残基中のループ構造の長さと α-ヘリックス近傍の構造に相違点が認められた。以上の結果から NTP によるこれらの ACO の活性化や阻害には C 末端側に存在するループ構造と α-ヘリックスの関与が示唆された。

Ethylene, Acc oxidase, Nucleoside triphosphate

講演番号：2D25p13
講演日時、会場：3 月 27 日 16:32～ D 校舎 25 会場

植物細胞ゴルジ体局在ポリガラクツロナーゼの同定
Identification of polygalacturonase localized at Golgi apparatus in plant cell
○井上 嘉之[1]、神野 淳[2]、大橋 貴生[3]、藤山 和仁[3]、石水 毅[1]（[1]立命館大学・生命、[2]阪大・院理、[3]阪大・生工国際セ）
○YOSHIYUKI INOUE[1], ATSUSHI JINNO[2], TAKAO OHASHI[3], KAZUHITO FUJIYAMA[3], TAKESHI ISHIMIZU[1]（[1]Ritsumeikan Univ., [2]Osaka Univ., [3]ICBiotech,Osaka Univ.）

【目的】ポリガラクツロナーゼ（PG）はペクチン主骨格であるポリガラクツロン酸を分解する酵素である。PG は果実の成熟化、さやの開裂、葉の落葉など、様々な機能に関連している。シロイヌナズナゲノムには 69 種類の PG 遺伝子が見いだされている。他の植物も含めてこれまで生化学的に解析された PG は全て可溶性タンパク質である。しかし、当研究室で最近、植物のミクロソーム画分に PG 活性を見いだした。このことは膜結合型 PG の存在を示しており、植物 PG の機能を探る上で興味深い。そこで、本研究では、この膜結合型 PG の生理機能を探るために、この酵素の細胞内局在場所を明らかにすることを目的とした。
【方法・結果】エンドウ上胚軸から調製したミクロソーム画分を 20-50 %（w/w）のスクロース密度勾配遠心法により、各細胞小器官（液胞、小胞体、ゴルジ体、形質膜、ミトコンドリア）を分画した。各細胞小器官の分画位置は、マーカー酵素の活性を利用した。PG 活性はゴルジ体画分に分画され、活性触媒部位はゴルジ体内腔側にあることを見いだした。また、本酵素はエキソ型の PG であり、ガラクツロン酸 6 糖が最も作用する基質であることも見いだした。ゴルジ体局在膜結合型 PG の至適 pH は 4.5 であった。ゴルジ体内腔はペクチンの生合成が行われる場であり、形質膜局在セルラーゼが形質膜で行われるセルロース生合成に関わっていることを考え合わせると、今回同定したゴルジ体局在 PG とペクチン生合成との関連に興味が持たれる。また、本酵素の至適 pH4.5 がゴルジ体の pH 約 6.7 と異なるので、この PG に別の酵素活性があることも想定される。

polygalacturonase, Golgi apparatus, pectin

講演番号：2D25p14
講演日時、会場：3 月 27 日 16:43～ D 校舎 25 会場

Characterization of wild-type and recombinant hydroxynitrile lyase from *Passiflora edulis* in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris* - effect of glycosylation on the enzyme stability

○Aem NUYLERT[1], Yuko Ishida[1,2], Yasuhisa Asano[1,2] ([1]Toyama Pref, Univ., [2]JST,ERATO)

[Purpose**]** Hydroxynitrile lyase (HNLs) is one of the key enzymes in plant cyanogenesis catalyzing the final step in the biodegradation pathway of cyanogenic glycosides. As the reversible reaction of HNLs, the enzyme catalyzes the synthesis of optically pure cyanohydrins which are important synthetic intermediates for fine chemical and pharmaceutical industry. The HNL from *Passiflora edulis* (*Pe*HNL) was reported to be a novel source of *R*-HNL by Asano *et al.,* (2005). However, the quantities of *Pe*HNL in the wild-type are of low level. To enhance the production yield, *Escherichia coli* and *Pichia pastoris* have been used as hosts for its expression. Nevertheless, the recombinant proteins from different expression systems vary in their post-translational modification such as glycosylation. Our aim is to investigate the effect of glycosylation on the catalytic properties of the recombinant *Pe*HNLs.

[Materials and Methods**]** In this study, the full-length cDNA encoding *Pe*HNL was isolated from young leaves of passion fruit by rapid amplification of cDNA ends (RACE) and was used for cloning and expression in *E. coli* BL21 (DE3) and *P. pastoris* GS115. The enzymatic assay, periodic acid-Schiff (PAS) staining and mass spectrometry were used to investigate the glycosylation of *Pe*HNL. Stabilities of the recombinant *Pe*HNL from the two expression systems were compared with those of the wild type enzyme.

[Results**]** The cDNA of *Pe*HNL was cloned and successfully expressed in *E. coli* BL 21 and *P. pastoris* GS115. The specific activity of *Pe*HNL from *E. coli* was slightly higher than that of the wild-type. The expression in *P. pastoris* was only detected in intracellular yeast cells. The *Pe*HNL from leaves showed much better thermostability and organic solvent tolerance than both of the recombinant *Pe*HNLs from *E. coli* and *P. pastoris*. It is considered that the stabilization of *Pe*HNL from natural leaves may be due to the effect of glycosylation.

[Reference]

Y. Asano et al, *Biosci. Biotechnol. Biochem*., **69**, 2349-2357 (2005).

Passiflora edulis, Hydroxynitrile lyase, Glycosylation

講演番号：2D25p15
講演日時、会場：3 月 27 日 16:54～ D 校舎 25 会場

シロイヌナズナ由来 PGDH の活性制御ドメインにおける含硫アミノ酸結合機構の生化学的解析
Biochemical elucidation of binding mechanisms of sulfur-containing amino acids to regulatory domains on PGDH from Arabidopsis

○岡村 英治、平井 優美（理研 CSRS）
○Okamura Eiji, Yokota Hirai Masami (RIKEN CSRS)

セリンは、生命においてタンパク質の構成成分として重要である。また、核酸や硫黄の代謝、細胞膜を構成するリン脂質であるホスファチジルセリンの生合成においても重要である。セリンの生合成経路として、解糖系の中間体である 3-ホスホグリセリン酸 (3-PGA) を初発物質とするリン酸化経路が知られている。リン酸化経路の欠損は、大腸菌においては栄養要求性の形質を示すほか、シロイヌナズナ（植物）、ヒトやマウス（動物）においては胚性致死や胎生致死の形質を示す。さらに、ヒトやマウスにおいて、セリンは神経細胞の発達や神経伝達に関わるほか、腫瘍細胞の増殖因子であることが知られている。シロイヌナズナでは、高二酸化炭素濃度下での炭酸固定、及びアンモニアの固定にも重要であるほか、植物ホルモンオーキシンや二次代謝産物であるグルコシノレートの生合成にも前駆体としてかかわることが明らかにされており、リン酸化経路の制御機構を詳細に解明することは、細胞内における代謝システムの理解を解明する上で極めて重要である。

リン酸化経路は、最終産物であるセリンによる負のフィードバック制御を受ける。大腸菌では、初発反応を触媒する酵素 PGDH（3-**p**hospho**g**lycerate **d**e**h**ydrogenase）が、セリンによるアロステリックな活性制御を受け、負のフィードバック制御が成立する。このアロステリック制御は、PGDH のアミノ酸配列上 C 末端側に存在する活性制御ドメイン、ACT（**A**spartate kinase-**C**horismate mutase-**T**yrA）ドメインにセリンが結合して酵素の活性が低下する。

本研究では、シロイヌナズナのリン酸化経路制御機構の解明を目的として、3 つの PGDH アイソザイムの生化学的解析を行ってきた。これまでに、3 つの PGDH アイソザイムのうち 2 つの PGDH がセリンによる活性阻害の他、含硫アミノ酸によって酵素活性が上昇することを明らかにした。

本大会では、エフェクターアミノ酸の PGDH 活性における協奏性をヒルの式で解析した結果について発表する。また、これらアミノ酸の PGDH における結合部位を明らかにするため、各種変異導入実験を行った実験結果について発表する。以上の解析により、我々は、セリンと含硫アミノ酸が生化学的観点からエフェクターとして機能しうることを示す。また、各アミノ酸が PGDH の独立した活性制御ドメインに結合する可能性を、近年明らかにされた他生物に由来する PGDH の構造生物学的な先行研究の知見とともに提示して、植物における新しいリン酸化経路制御機構が存在する可能性、及びその生理学的な意義を議論したい。

Amino acid, Serine, Arabidopsis

講演番号：2D25p16
講演日時、会場：3 月 27 日 17:15～ D 校舎 25 会場

バイオインフォーマティカルな検索によるシロイヌナズナシグナルペプチドペプチダーゼ(AtSPP)の基質探索とその検証

Identification of substrates of AtSPP(Arabidopsis thaliana signal peptide peptidase) using bioinformatical search

○楠木 賢太[1]、星 雅子[1]、石丸 喜朗[1]、阿部 啓子[1,2]、朝倉 富子[1] ([1]東大院農生科・応生化、[2]神奈川科学技術アカデミー)
○Kenta KUSUNOKI[1], Masako HOSHI[1], Yoshiro ISHIMARU[1], Keiko ABE[1,2], Tomiko ASAKURA[1] ([1]Tokyo Univ., [2]KAST)

【目的】SPP(signal peptide peptidase)は、複数膜貫通型プロテアーゼの一種で、N 末端が小胞体内腔側に、C 末端が細胞質側に存在する 9 回膜貫通型プロテアーゼである。SPP の機能の 1 つに、シグナルペプチダーゼで切断を受けた後のシグナルペプチドを切断し、生理活性のあるペプチドを核へ放出するという機能がある。AtSPP(シロイヌナズナ SPP)は花粉における発現量が高く、AtSPP のヘテロノックアウトでは、花粉管の伸長が抑えられることが報告されている(Plant Physiol.149(3):1289-301,2009)。また、根における発現量が高いことも分かっている。しかしながら、AtSPP が花粉管の伸長を抑える分子メカニズムや、根における生理機能については未解明である。今回、その生理機能の知見を得るため、AtSPP の基質の探索を行なった。

【方法と結果】まず、花粉管の伸長に関わる基質の探索を行なった。花粉管の伸長は、細胞壁の伸長と相関することが予想されることから、TAIR(The Arabidopsis Information Resource)を用いて、cell wall と pollen を GO term に含む遺伝子を抽出した(212 個)。このうち、アミノ酸配列情報に基づいて、1 回膜貫通タンパク質であり、かつシグナル配列があると判定されたものを抽出した(33 個)。さらに、Arabidopsis eFP Browser を用いて、花粉、雄ずい、花弁に発現する遺伝子を絞り込み、最終的に 14 分子を基質候補とした。

次に、根の基質の探索を行なった。播種後 7 日目の RNAi 株と野生株の植物体で発現する遺伝子を DNA マイクロアレイを用いて解析し、発現量に有意な差がある分子(FDR 値 0.05 未満)を抽出した。これらの分子のうち 1 回膜貫通タンパク質でありかつシグナル配列がある 9 分子を基質候補とした。

これらの基質候補の推定シグナルペプチド配列を、前回大会の方法の酵母のレポーターアッセイの系で検証した。この系は、AtSPP によって酵母内で同時に発現させた基質の切断が行われると、基質の N 末端に連結された転写因子 GAL4 が放出されて核に移行し、レポーター遺伝子が発現することを利用したものである。その結果、花粉管の伸長に関わる基質候補 14 個のうち、切断を受けたものが 10 個あった。また、根における基質候補 9 個のうち切断を受けたものは 6 個あった。AtSPP が切断された基質には共通の配列がみられないことから、AtSPP は基質特異性が低いこと、および基質選択性には一次構造以外の因子が存在することが示唆された。

Hoshi.M *et al* BMC Biochem,2013,14:16

signal peptide peptidase, Arabidopsis, reporter assay

講演番号：2D25p17
講演日時、会場：3 月 27 日 17:26～ D 校舎 25 会場

イネにおけるジベレリン代謝酵素の構造と機能解析
Structural and functional analysis of gibberellin 2-oxidase in rice
○竹原 清日 [1]、三上 文三 [2]、樫尾 徹 [1]、松岡 信 [1]、上口（田中） 美弥子 [1] ([1]名大・生物機能セ、[2]京大院・農)
○ Sayaka TAKEHARA[1], Bunzo MIKAMI[2], Toru KASHIO[1], Makoto MATSUOKA[1], Miyako UEGUCHI (TANAKA)[1] ([1]Nagoya Univ., [2]Kyoto Univ.)

【背景】植物ホルモンのひとつであるジベレリン（GA）は、草丈の伸長促進や発芽促進、花芽形成促進などさまざまな生理作用をもつ。 ジベレリン生合成経路の後半段階においては GA20-oxidase (GA20ox)および GA3-oxidase (GA3ox)が、代謝経路では GA2-oxidase (GA2ox)が働いており、いずれも 2-オキソグルタル酸要求性酸化酵素に属する酵素である。我々は、これら酵素の構造解析に取り組み、イネの GA 不活化酵素である GA2ox3 の構造を明らかにした。 全体構造は、S−S 結合で結合したダイマー同士が相互作用した 4 量体を形成しており、基質である GA_4 が活性中心以外にもダイマー分子の間に結合して糊づけの役割を果たすことにより、4 量体を形成していることが明らかとなった。そこで本研究は、この多量体構造の形成と酵素活性との関係ならびに、植物における多量体構造形成の意義を明らかにすることを目的とした。
【方法と結果】GA2ox3 の溶液中での分子状態を調べるため、多量体形成に必要と考えられる GA 存在化でゲル濾過を行った。 その結果、溶液中でも 4 量体構造をとることが明らかとなり、4 量体および単量体の単離にも成功した。 そこで、得られた各分子の酵素活性をガスクロマトグラフ質量分析計で測定し、比較したところ、4 量体が単量体に比べ酵素反応速度がはるかに速いことが分かった。また、GA_4 の有無により可逆的に 4 量体を形成することも明らかになった。
さらに、植物細胞内における多量体形成能および細胞内での局在場所を調べるため、イネのプロトプラストを用いた BiFC 解析を行った。 その結果、*in vitro* と同様に *in planta* でも多量体構造をとっており、その多量体形成は細胞質で行われることも分かった。
以上の結果から、GA2ox3 は以前から知られているような遺伝子発現調節だけでなく、タンパク質レベルでの調節も行うことが示唆された。 さらにその調節は、GA 濃度が高くなると活性ポケットの入り口付近に次の反応に必要な基質を待機させて反応速度を上昇させるような、非常にユニークなやり方であることが予想された。

gibberellin biosynthesis, plant hormone, dioxygenase

講演番号：2D25p18
講演日時、会場：3 月 27 日 17:37～ D 校舎 25 会場

傷害によって誘導される（3*Z*):(2*E*)- ヘキセナールイソメラーゼの同定と機能解析

Identification and functional analysis of (3*Z*):(2*E*)-hexenal isomerase induced by wounding

○國嶋 幹子、山内 靖雄、水谷 正治、杉本 幸裕（神戸大院農）
○Mikiko KUNISHIMA, Yasuo YAMAUCHI, Masaharu MIZUTANI, Yukihiro SUGIMOTO (Grad. Sch. Agric. Sci., Kobe Univ.)

植物が傷害を受けた時 3-ヘキセナールと 2-ヘキセナールに代表される C6 化合物群の生成量が急激に増加する。これらは、二次代謝産物生合成遺伝子などの傷害に対する防御応答遺伝子の発現誘導、天敵の誘引、抗菌性などの生理的役割を担っていると考えられている。なかでも、分子内にα, β-不飽和カルボニル基を持つ 2-ヘキセナールは高い反応性を示し、タンパク質の安定化や抗酸化系に関わる遺伝子の発現を誘導することから、植物自身の恒常性を維持するシグナル物質として機能している可能性が示されている。2-ヘキセナールは、チラコイド膜を構成するリノレン酸を出発物質とし、リポキシゲナーゼ、ヒドロペルオキシリアーゼによって生じた 3-ヘキセナールの異性化によって生合成されると考えられているが、異性化に関わる酵素は未同定であった。本研究は、2-ヘキセナールの生合成に関わるヘキセナールイソメラーゼ遺伝子の同定およびその機能解析を目的としている。

2-ヘキセナールは果実の成熟に伴って増加することが報告されている。この知見に基づいて、さまざまな果実の活性を調べ最も高いヘキセナールイソメラーゼ活性を有したパプリカを材料として選抜した。パプリカ果実より酵素精製を行い、分子量 35 kDa の単一のバンドを得た。キネティクス解析の結果、3-ヘキセナールに対する K_m 値は 0.73 mM で k_{cat} 値は 760 であった。NMR 解析を行い、酵素変換された 2-ヘキセナールは trans 体であることがわかった。部分アミノ酸配列を得て、それに基づいて酵素遺伝子を同定した。Blue-Native PAGE を行った結果、110 kDa を示したことからパプリカ由来ヘキセナールイソメラーゼは三量体を形成し機能していることがわかった。点変異を導入した組換え酵素を用いて酵素反応を行った結果、54 番目のヒスチジンが重要であることがわかった。系統樹を作製し、相同性を示した遺伝子について組換え酵素を作製し活性を測定した結果、ナス科のトマトとジャガイモ由来の遺伝子も活性を有する酵素をコードしていることが明らかとなった。ナス科のモデル植物であるトマトとパプリカに対して傷害ストレスを与えたところヘキセナールイソメラーゼ遺伝子の発現量の増加が認められたことから、本酵素が傷害ストレスに対する防御応答に関与していることが支持された。

Wound response, hexenal isomerase, Solanaceae

講演番号：2D25p19
講演日時、会場：3 月 27 日 17:48～ D 校舎 25 会場

ウリ科植物における残留性有機汚染物質の地上部移行メカニズム
Transport mechanisms of persintent organic pollutants in Cucurbitaceae family
○岩渕 彩[1]、後藤 純弥[1]、吉原 亮平[2]、池田 健一[1]、井上 加奈子[1]、乾 秀之[1,2] ([1]神戸大院農、[2]神戸大遺伝子)
○Aya IWABUCHI[1], Jyunya GOTO[1], Ryouhei YOSHIHARA[2], Kenichi IKEDA[1], Kanako INOUE[1], Hideyuki INUI[1,2] ([1]Kobe Univ., [2]Kobe Univ. RCEG)

＜背景＞
残留性有機汚染物質（POPs）は、難分解性、高脂溶性であるため環境中に残留し、食物連鎖によって野生生物体内に蓄積されることにより毒性を発現する。POPs は、通常植物に取り込まれ、地上部に蓄積されにくいにも関わらず、キュウリやカボチャ、ズッキーニ（*Cucurbita pepo*）などのウリ科植物は他の植物に比べて高い蓄積能を持つことがわかっている。我々のこれまでの研究により、ウリ科植物による POPs の蓄積には、メジャーラテックスライクプロテイン（MLP）が POPs の輸送因子として関与していることが明らかとなった。したがって、この MLP の体内動態がウリ科植物による POPs の蓄積に重要であると考えられる。*C. pepo* の中でも Patty Green (PG) 品種は POPs 蓄積能が低く、Magda (MG) 品種は高い。これは、PG では MLP が導管へ移行しないのに対し、MG では移行するためであると考えられる。この動態の違いの原因を調べるため、根における MLP の局在を比較した。
＜方法＞
播種後 3 週間栽培した PG 品種及び MG 品種の根からタンパク質を抽出した。その際、3 種類の抽出バッファーを用いて順に抽出を行い、可溶性画分、膜タンパク質画分、膜タンパク質不溶性画分に分画した。検出には、MLP に対する抗体によるウエスタンブロット分析を用いた。
また、MLP に対する抗体を用いた免疫染色法により、MLP の根における局在を調べた。播種後 1 週間培養した PG 品種及び MG 品種の根を、4%パラホルムアルデヒドを用いて一晩固定した。洗浄後、5%のゲルに包埋し、切片を作製した。その後ブロッキングを経て一次抗体による反応を一晩行った。洗浄後、蛍光標識された二次抗体を添加し、一晩反応させた。洗浄後、蛍光顕微鏡で根の切片を観察した。
＜結果と考察＞
MLP の分画の結果、導管へ移行する MLP は可溶性画分に、移行しない MLP は膜タンパク質画分に含まれることが明らかとなった。このことから、細胞膜ではなく細胞質に存在することと導管への移行に何らかの関連があることが示唆された。
また、PG 品種と MG 品種の根における 2 種の MLP-PG1、MLP-GR3 は中心柱に存在していることが判明し、現在詳細な組織特異的局在性を調査している。

Persistant organic pollutant, Major latex like protein, Cucubitceae family

講演番号：2D34a06
講演日時、会場：3 月 27 日 10:05～ D 校舎 34 会場

エンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼを用いた B 型肝炎ウィルス様粒子の糖鎖構造改変

Glycan modification of Hepatitis B Virus-pseudotype particles using Endo-β-N-acetylglucosaminidase

○岡本 雄太[1]、三崎 亮[1]、飯嶋 益巳[2]、大橋 貴生[1]、黒田 俊一[2]、藤山 和仁[1] ([1]大阪大生国セ、[2]名古屋大農)
○Yuta OKAMOTO[1], Ryo MISAKI[1], Masumi IIJIMA[2], Takao OHASHI[1], Shun'ichi KURODA[2], Kazuhito FUJIYAMA[1] ([1]Osaka Univ. ICBiotech, [2]Nagoya Univ.)

[背景及び目的]

B 型肝炎ウィルス（HBV)は、肝硬変などの症状を引き起こし、世界には数多くの感染者が存在する。しかも完治に至る有効な治療薬がない。その理由として HBV の病態発症メカニズムが明らかになっていないことや、実験室レベルで培養細胞を用いた正確な感染実験系の構築が困難であることが挙げられる。近年では、HBV の感染に必要な表面抗原タンパク質を発現した二次感染の危険性の無い HBV 様粒子が主に実験に用いられている。一方、複数のウィルスの感染には糖鎖が深く関わることが分かってきた。こうしたことを踏まえ、本研究では、HBV が持つ糖鎖構造と感染効率の関連を出芽酵母由来 HBV 様粒子（Bio-nano capsule：BNC）を用いて検証する。BNC の糖鎖構造を任意の糖鎖に改変・均一化することを目指し、BNC の酵母型糖鎖を除去し、変異型エンド-β-*N*-アセチルグコサミニダーゼ M（Endo M N175Q）を用いて任意の糖鎖を転移するための条件検討を行った。

[実験方法及び結果]

マンノース（Man）および N-アセチルグルコサミン（GlcNAc）から成る糖鎖 $Man_{5-9}GlcNAc_2$ を持つリボヌクレアーゼ B（RNase B）をモデル糖タンパク質として用い、糖鎖改変の条件検討を行った。エンド-β-*N*-アセチルグコサミニダーゼ H（Endo H)を用いて、RNase B の糖鎖を切断し、糖鎖付加部位に mono-GlcNAc 残基を持つ RNase B を作成した。次に、mono-GlcNAc 残基に対して糖転移活性を持つ Endo M N175Q を用い、シアル酸（Sia）、ガラクトース（Gal）、Man、GlcNAc から成る糖鎖 $Sia_2Gal_2GlcNAc_2Man_3GlcNAc_2$ を保持するシアリルグライコペプチド（SGP）より $Sia_2Gal_2GlcNAc_2Man_3GlcNAc$ を転移した。その結果、過剰の SGP 存在下において RNase B への糖転移に成功した。さらに、この条件を BNC へ応用することで、BNC が持つ酵母型糖鎖を $Sia_2Gal_2GlcNAc_2Man_3GlcNAc_2$ に均一化できた。

Endo M, Bio-nano capsule, Hepatitis B Virus

講演番号：2D34a07
講演日時、会場：3 月 27 日 10:16～ D 校舎 34 会場

Structural Characterization of Neutral *N*-Glycans of Representative Basidiomycetous Yeasts in the Class Agaricostilbomycetes, Subphylum Pucciniomycotina

○ Johnry MALOLES[1], Takao OHASHI[1], Hiroko KAWASAKI[2], Kazuhito FUJIYAMA[1] ([1]International Center for Biotechnology, Osaka University, Osaka, Japan, [2]NITE Biological Resource Center (NBRC), National Institute of Technology and Evaluation (NITE), Chiba, Japan)

N-glycosylation is the most common post-translational modification of proteins that is critical for a wide range of essential biological processes. It is known that the early stage of *N*-glycosylation is well conserved in eukaryotes, however, later glycan processing results on the diversity of *N*-glycan structures, even among the yeast species. In basidiomycetous yeasts, diversity of *N*-glycan structures may provide additional information on how yeasts can be systematically classified, as current classification schemes are quite unstable. Furthermore, the glycan structural information of basidiomycetous yeasts has been poorly investigated unlike ascomycetous yeasts. Therefore, the aim of this study is to analyze *N*-glycan structures in three basidiomycetous yeasts belonging to the class Agaricostilbomycetes (Subphylum Pucciniomycotina), and subsequently, to relate glycan structure diversity with yeast diversity. These representative yeasts were *Kondoa malvinella, Bensingtonia ingoldii,* and *Kurtzmanomyces nectairei*. *N*-glycans were prepared from yeasts by extraction using citrate-NaOH buffer with autoclaving, hydrazinolysis, and finally labeling with fluorescent tag 2-aminopyridine. The labeled *N*-glycans were then purified using phenol-chloroform, and structurally analyzed by the two-dimensional HPLC mapping method, and further analyzed by glycosidase digestions and mass spectrometry. Neutral *N*-glycans were detected and collected in anion-exchange DEAE-HPLC, and different-sized neutral *N*-glycans were successively separated in size-fractionation HPLC. Presence of various *N*-glycans with different sizes were observed based on the prepared $Man_{1->9}GlcNAc_2$-PA-sized *N*-glycan standards. In addition, most of the neutral *N*-glycan structures were of the oligomannose-type, which is a distinct characteristic of all basidiomycetous and ascomycetous yeasts. Reversed-phase HPLC revealed the presence of different isomeric forms of neutral *N*-glycans. Lastly, enzymatic analyses, combined with LC-MS, were used to elucidate the possible structural linkages of the sugar moieties constituting the neutral *N*-glycans.

N-glycans, Basidiomycetous Yeasts, Class Agaricostilbomycetes

講演番号：2D34a08
講演日時、会場：3 月 27 日 10:27～ D 校舎 34 会場

ウォンバット新規ミルクオリゴ糖の構造解析
Charactarization of a novel Wombat milk oligosaccharide.
○平山 賢太郎[1]、福田 健二[1]、齋藤 忠夫[2]、メッサー マイケル[3]、浦島 匡[1] ([1]帯畜大畜産衛生、[2]東北大農、[3]シドニー大)
○ Kentaro HIRAYAMA[1], Kenji FUKUDA[1], Tadao SAITO[2], Michael MESSER[3], Tadasu URASHIMA[1] ([1]Obihiro Univ., [2]Tohoku Univ., [3]Sydney Univ.)

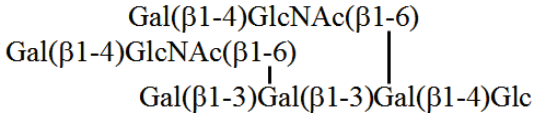
【目的】哺乳動物の乳は数%の糖質を含み、多くの真獣類種の主要糖質はラクトース；Gal(β1-4)Glc である。一方、有袋類や単孔類の乳ではミルクオリゴ糖の方がラクトースよりも優占的である。有袋類の中で、これまでにタマーワラビーの中性オリゴ糖、アカカンガルーの酸性オリゴ糖、およびコアラ、ブラッシュテイルポッサム、ウォンバットの中性、酸性オリゴ糖の化学構造が決定されている。有袋類のミルクオリゴ糖は還元末端のラクトース単位に対して、直鎖の Gal(β1-3)が 1～5 単位付加された特徴的な構造を有していて、この直鎖構造に Gal(β1-4)GlcNAc(β1-6)や硫酸基が付加した構造がある。これまでに発見されたウォンバットのミルクオリゴ糖の構造は以下の通りである。

Gal(β1-3)Gal(β1-4)Glc
Gal(β1-3)Gal(β1-3)Gal(β1-4)Glc
Gal(β1-3)Gal(β1-3)Gal(β1-3)Gal(β1-4)Glc
Gal(β1-3)Gal(β1-3)[Gal(β1-4)GlcNAc(β1-6)]Gal(β1-4)Glc
Neu5Ac(α2-3)Gal(β1-3)Gal(β1-4)Glc
Neu5Ac(α2-3)Gal(β1-3)Gal(β1-3)Gal(β1-4)Glc
Neu5Ac(α2-3)Gal(β1-3)Gal(β1-3)Gal(β1-3)Gal(β1-4)Glc
SO_3-3Gal(β1-3)Gal(β1-3)Gal(β1-3)Gal(β1-3)Gal(β1-4)Glc
Gal(β1-3)[Neu5Ac(α2-3)Gal(β1-4)GlcNAc(β1-6)]Gal(β1-4)Glc
Neu5Ac(α2-3)Gal(β1-3)[Gal(β1-4)GlcNAc(β1-6)]Gal(β1-4)Glc

本研究では、ウォンバットに新規のミルクオリゴ糖を発見したので報告する。

【方法】ウォンバットの乳から抽出された糖質画分を Biogel P-2 によるゲル濾過クロマトグラフィーに供して、分子量分画を行った。複数のオリゴ糖の存在が示された中性オリゴ糖画分は、グラファイトカーボンカラムを使用した高速液体クロマトグラフィーによって分離・精製した。精製されたオリゴ糖は ^{1}H-NMR と MALDI-TOF/MS に供して構造決定した。

【結果・考察】新規に構造決定された中性オリゴ糖は以下のような構造であった。



Gal(β1-3)直鎖に対して２ヶ所Gal(β1-4)GlcNAc(β1-6)が付加した構造は新規であり、注目される。

Milk oligosaccharide, Wombat, Mursupial

講演番号：2D34a09
講演日時、会場：3 月 27 日 10:38～ D 校舎 34 会場

コケイバラからピルヴィン酸を置換するガラクタン硫酸の同定

Identification of a pyruvated galactan sulfate from Kokeibara (*Hypnea pannosa*)

○田幸 正邦[1,2]、大利 麟太郎[1]、金城 和隆[1]、小西 照子[1]、上地 俊徳[1] ([1]琉球大生資科、[2]健康長寿科研)

○Masakuni Tako[1,2], Rintaro Ohtoshi[1], Kazutaka Kinjyo[1], Teruko Konishi[1], Shuntoku Uechi[1] ([1]Univ. Ryukyus, [2]Health Longevity Res. Lab.)

目的. 演者らはこれまで、沖縄県で自生または養殖により生産している海藻類（紅藻、褐藻および緑藻）から機能性多糖類（寒天、κ-カラギーナン、ι-カラギーナン、メチル寒天、フコイダン、アセチルフコイダン、アルギン酸、ラムナン硫酸およびウルヴァン等を分離同定し、これらの諸特性を明らかにした[1-6]。ここでは、紅藻の一種のコケイバラ（*Hypnea pannosa*）からピルヴィン酸を置換するガラクタン硫酸を同定した結果を報告する。

実験方法. コケイバラは沖縄県うるま市具志川で採取した。多糖の分離精製は常法によった。硫酸の定量はドジソン法で行った。比旋光度は自動旋光計（P-1010; JASCO）、赤外吸収スペクトルは FTS-3000（バイオラッド）で測定した。また、NMR (^{1}H および ^{13}C)スペクトルの測定は JNM α 500 (日本電子)で行った。

実験結果. 精製多糖を 17.2%の収率（対乾燥藻体）で得た。本多糖の全糖および硫酸含量は 53.4%および 34.1%であった。本多糖のメタノリシスの後に薄層クロマトグラフィーを行った結果、3,6-anhydro-α-D-galactoside とβ-およびα-D-galactoside を同定した。本多糖の ^{1}H-および ^{13}C-NMR の結果はι-カラギーナンのそれらと類似した。また、NMR スペクトルからピルヴィン酸を同定した。本多糖の比旋光度は+0.42° （25℃）であった。以上の結果から、コケイバラから分離した多糖はピルヴィン酸を置換し、ι-カラギーナンに類似するガラクタン硫酸であった。本多糖は U-937（ヒトリンパ腫）細胞の増殖を阻害した。

文献

[1] 田幸, 上原, 川島, 知念, 本郷. 応用糖質科学, **43**, 143-148(1996).

[2] Tako, Higa, Medoruma, Nakasone. *Botanica Marina*, **42**, 513-517(1999).

[3] Tako, Nakada, Hongo. *Biosci. Biotechnol. Biochem*., **53**, 1813-1815 (1999).

[4] Teruya, Konishi, Uechi, Tamaki, Tako. *Int. J. Biol. Macromol*., **41**, 221-226 (2007).

[5] Teruya, Tatemoto, Konishi, Tako. *Glycoconj. J*., **26**, 1019-1028 (2009).

[6] 中村, 山城, 小西, 花城, 田幸. 日本食品科学工学会誌, **58**, 245-251(2011).

Hypnea pannosa, Pyruvated galactan sulfate, Kokeibara

講演番号：2D34a10
講演日時、会場：3 月 27 日 10:49～ D 校舎 34 会場

生育環境の異なる魚種のコンドロイチン硫酸含有量と組成分析

Contents and compositional analysis of chondroitin sulfates derived from grown in different environments

○上田 健人[1]、石田 祐太[1]、高浜 佐季[1]、片山 優助[1]、今井 利映[1]、武田 尚子[2]、田村 純一[1]([1]鳥取大地域環境、[2]学振特研 PD)
○Kento UEDA[1], Yuta ISHIDA[1], Saki TAKAHAMA[1], Yusuke KATAYAMA[1], Rie IMAI[1], Naoko TAKEDA[2], Jun-ichi TAMURA[1] ([1]Dep. Regional Environ., Tottori Univ., [2]JSPS Research Fellow)

【目的】コンドロイチン硫酸(CS)はグリコサミノグリカンの一種であり、D-グルクロン酸と N-アセチル-D-ガラクトサミンの二糖単位の繰返し構造をもつ直鎖多糖である。また、硫酸基の数や配置により、A 型や E 型のような型に分類される。CS は動物に普遍的に存在しており、生物や部位によって CS の硫酸化パターンや含有量が異なることが知られている。しかし、同じ動物種であっても、棲息環境の違いによる CS の組成や含有量の影響は明らかでない。本研究では、魚介類に含まれるコンドロイチン硫酸の含有量と硫酸化パターンが、養殖と天然で育った魚種について、その棲息環境の違いや食環境の違いが CS の含有量や硫酸化パターンに差違を与えるかに注目した。ここでは、ヒラメ、イシダイ、マグロの養殖魚と天然魚に含まれる CS をそれぞれ単離し、その含有量と硫酸化パターンについて部位ごとに解析したので報告する。

【方法と結果】対象となる魚類を部位別に粉砕し、脱脂、タンパク質分解とエタノールによる粗糖鎖の沈殿形成を行った。得られた粗糖鎖は、イオン交換樹脂と透析、ゲルろ過を用いて精製した。得られた精製糖鎖をコンドロイチナーゼ ABC により二糖単位まで分解し、得られた不飽和二糖の組成分析を HPLC を用いて行った。

chondroitin sulfate, compositional analysis, fish

講演番号：2D34a11
講演日時、会場：3 月 27 日 11:10～ D 校舎 34 会場

サケ鼻軟骨由来プロテオグリカンの酵素消化と生理機能評価

The biological function of enzyme degradation proteoglycan derived from salmon nasal cartilage

○商 怡[1]、安保 亜衣子[2]、岩間 直子[1]、平山 智代[1]、五十嵐 恵[1]、初山 慶道[1]、内沢 秀光[1]、工藤 謙一[1] ([1]青森県産技セ・弘前研、[2]青森県産技セ・工総研)
○Yi Shang[1], Aiko Anbo[2], Naoko Iwama[1], Tomoyo Hirayama[1], Megumi Igarashi[1], Yoshimichi Hatsuyama[1], Hidemitsu Uchisawa[1], Kenichi Kudo[1] ([1]Aomori Pref. Ind. Tech. Res. Ctr. Hirosaki Ind. Res. Inst., [2]Aomori Pref. Ind. Tech. Res. Ctr. Ind. Res. Inst.)

【目的】

プロテオグリカン（PG）は、コアタンパク質にコンドロイチン硫酸などが共有結合した化合物である。PG は、細胞外マトリックスを構成する成分の一つであり、多様な生理活性を有する生体内多機能分子として注目されている。しかしながら、PG は糖とタンパク質からなる複雑な高分子であるため、構造と機能の関係はまだ解明されていない。そこで本研究では、タンパク質分解酵素及び糖分解酵素を用いたサケ鼻軟骨由来 PG の低分子化を試み、得られた分解生成物について培養細胞等により生理機能を評価することで、PG の構造と生理機能の関係を明らかにすることを目的として行った。

【方法】

PG は糖とタンパク質の複合体であるため、糖分解酵素としてコンドロイチナーゼ ABC、タンパク質分解酵素としてアクチナーゼ E 及びトリプシンを用いて、サケ鼻軟骨由来精製 PG（角弘プロテオグリカン研究所）の分解を試みた。酵素の処理温度（30°C、40°C、50°C）や処理時間（0、0.5h、1h、2h、4h、8h、24h、32h、48h、72h）を変化させ、ゲルろ過カラムを用いた HPLC により得られた PG 分解生成物の分子量を求めた。また、分解生成物を Sephacryl S-500HR ゲルろ過カラムを用いて分画し、高分子側と低分子側の画分について細胞の増殖活性を評価した。細胞には正常ヒト皮膚線維芽細胞を用い、96 ウェールプレートに 4×10^3cells/well の密度で播種し、得られた PG 分解生成物を DMEM/0.25％FBS 培地に添加（最終添加濃度 200μg/ml）して、培養 3 日後にセルカウンティングキット（同仁化学）を用いて細胞の増殖性を測定した。

【結果】

タンパク質分解酵素（アクチナーゼ E とトリプシン）及び糖分解酵素（コンドロイチナーゼ ABC）により PG の低分子化が確認され、各温度における酵素処理時間と分子量の関係が明らかになった。ゲルろ過により得られたPG分解生成物を高分子側と低分子側に分画し、正常ヒト皮膚線維芽細胞の増殖性を評価した。その結果、高分子側の画分に未分解PGより高い細胞増殖活性が認められた。

Proteoglycan, Enzyme degradation, Biological function

講演番号：2D34a12
講演日時、会場：3 月 27 日 11:21～ D 校舎 34 会場

ヘパラン硫酸糖鎖の硫酸化構造変化がもたらす生理機能の検証

Verification of physiological function madiated by structural alteration of heparan sulfate

○小堺 健生[1]、西田 光貴[2]、北口 公司[3]、矢部 富雄[3]([1]岐阜大院・応生科・応用生命、[2]岐阜大院・連農・生物資源、[3]岐阜大・応生科・応用生命)
○Takeru KOZAKAI[1], Mitsutaka NISHIDA[2], Kohji KITAGUCHI[3], Tomio YABE[3] ([1]Grad. Sch. of Appl. Biol. Sci., Gifu Univ., [2]Unit. Grad. Sch. of Agric. Sci., Gifu Univ., [3]Fac. of Appl. Biol. Sci., Gifu Univ.)

【目的】動物細胞表面に普遍的に存在するヘパラン硫酸（HS）糖鎖は，構成糖の様々な位置に硫酸基が付加された多様な硫酸化構造をもち、生体内ではこの硫酸化構造の制御が生理機能の調節に関与していると考えられている。しかし，HS の硫酸化構造の制御機構の解明は進んでいない。これまでに我々は，マウス線維芽細胞（L-M 細胞）をアドレナリンで刺激することにより細胞表面 HS の硫酸化構造が変化すること，また，アドレナリンによるこの硫酸化構造変化で HS と線維芽細胞増殖因子（FGF-2）の結合量が減少することを報告している。そこで本発表においては，アドレナリンで L-M 細胞を刺激した際の FGF-2 に対する細胞応答の変化を検討することで，HS の硫酸化構造変化がもたらす生理機能への影響を解析することを目的とした。【方法】L-M 細胞をアドレナリン含有培地にて培養し，その後，FGF-2 含有培地に交換してさらに培養した。FGF-2 含有培地での培養後，WST-8 法によって細胞増殖試験を行い，アドレナリン，FGF-2 添加による L-M 細胞の細胞増殖率への影響を測定した。コントロールには，アドレナリン・FGF-2 非添加群を用いた。【結果】細胞増殖試験の結果，FGF-2 添加群は，コントロールに対して有意な細胞増殖率の上昇を示した。このことから，FGF-2 が L-M 細胞において細胞増殖活性を示すことを確認した。一方，アドレナリン・FGF-2 添加群は，FGF-2 添加群に対して有意な細胞増殖率の低下を示した。コントロールとアドレナリン添加群との間に細胞増殖率の有意な変化はなかったため，アドレナリンによる細胞増殖率の低下は L-M 細胞への毒性によるものではないことが示された。これらのことから，アドレナリンによる FGF-2 の細胞増殖活性の阻害が示唆された。これは，L-M 細胞表面の HS がアドレナリン刺激により FGF-2 に結合しにくい硫酸化構造へ変化し，それによって FGF-2 に対する L-M 細胞の応答が十分に発揮できなかったためであると考えられる。これまでに我々は，アドレナリンによる HS 硫酸化構造の変化が，シグナル伝達系の ERK1/2 を介していることを明らかにしていることから，この経路を阻害してアドレナリンが誘導する HS の硫酸化構造を阻止し，FGF-2 に対する L-M 細胞の応答を現在検討している。これによって，アドレナリンによる FGF-2 の細胞増殖活性の阻害が，細胞表面 HS の硫酸化構造変化によってもたらされているかどうかをさらに詳しく検証する。

Heparan sulfate, Fgf, Fibroblast

講演番号：2D34a13
講演日時、会場：3 月 27 日 11:32～ D 校舎 34 会場

Comparison of enzyme properties of three insect CMP-sialic acid synthetases
○di wu[1,2,3], Akiko Fujita[1], Chihiro Sato[1,2,3], Ken Kitajima[1,2,3] ([1]Bioscience & Biotechnology Center, Nagoya University, [2]Program for Leading Graduate Schools IGER, Nagoya University, [3]Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University)

The CMP-sialic acid synthetase (CSS) catalyzes the synthesis of CMP-sialic acid (CMP-Sia), which is an only donor substrate of sialyltransferases. Thus, CSS is indispensable for the *de novo* synthesis of sialoglycoconjugates. The CSSs from vertebrates have the interesting features: (i) nuclear localization; (ii) the presence of the additional C-terminal domain with no catalytic activity. Recently, *Drosophila melanogaster* (fruit fly) CSS was shown to exhibit the Golgi-localization and to be devoid of the C-terminal domain. To ask if these features are common to insect CSSs, two CSSs from *Aedes aegypti* (yellow fever mosquito) and *Tribolium castaneum* (red flour beetle) were cloned and characterized. First, *Aedes* and *Tribolium* CSSs were shown to share the common structural features with *Drosophila* CSS including the C-terminal deletion. Second, in *in vitro* assays, no activity was detected for any of the bacterially expressed recombinant insect CSSs. In contrast, the *in vivo* activity was detected with these insect CSSs using a CSS-impaired CHO mutant cell line LEC29.Lec32, which is negative in the surface Sia expression. The transfectant cells with the insect CSS cDNA became Sia-positive. In addition, the insect CSSs expressed in LEC29.Lec32 cells also had *in vitro* activity to Neu5Ac. These results indicate that the insect CSSs are functional in the expression of Sia in mammalian cells, although some modification on the insect CSSs may be important for the insect CSS activities. Third, the intracellular localization was determined using the insect CSS-expressed CHO cells. Surprisingly, *Aedes* and *Tribolium* CSSs were localized in ER, differently than *Drosophila* CSS which was localized in the Golgi. Thus, the intracellular localization of CSS is not the same between the insect species. Two potential intracellular localization signals that are found in the insect CSSs may be involved in the unique localization.

insect, CMP-Sia synthetase, localization

講演番号：2D34a14
講演日時、会場：3 月 27 日 11:43～ D 校舎 34 会場

α2,6-シアル酸残基のメダカ初期胚における重要性

Critical importance of the α2,6-sialosides during early development of medaka

○北島 健[1,2]、呉 迪[1,2]、田嶋 克枝[1,2]、丸山 恵実[1,2]、足立 朋子[1]、橋本 寿史[1]、日比 正彦[1]、藤田 明子[1,2]、佐藤 ちひろ[1,2] ([1]名大生物機能セ、[2]名大生命農学)
○Ken KITAJIMA[1,2], Di WU[1,2], Katsue TAJIMA[1,2], Emi MARUYAMA[1,2], Tomoko ADACHI[1], Hisashi HASHIMOTO[1], Masahiko HIBI[1], Akiko FUJITA[1,2], Chihiro SATO[1,2] ([1]Nagoya Univ. BBC, [2]Nagoya Univ. Grad. Sch. Bioagr. Sci.)

シアル酸（Sia）は脊椎動物の複合糖質に存在し、様々な生物学的現象において重要な役割を担う。シアル酸前駆体合成に関わる酵素 UDP-GlcNAc 2-epimerase/ ManNAc kinase（GNE）の欠損細胞は生存するが、その欠損個体が胎生致死であることから、シアル酸はマウスの初期発生において必須であることが知られている。我々は哺乳類以外の脊椎動物でもシアル酸が必須であるか否かを調べるために、発生学における優れたモデル脊椎動物であるメダカ（*Oryzias latipes*）を用いて、シアル酸転移酵素の基質合成に関わる CMP-Sia 合成酵素（CSS）の欠損メダカを TALEN（transcription activator-like effector nucleases）技術を用いて作製した。その結果、CSS 欠損胚は発生ごく初期において致死であり、シアル酸が普遍的に初期胚に必須成分であることが証明された。それではどうしてシアル酸が必要なのか？本研究はこの課題の解明を目的として、以下の実験に取り組んだ。まず、SSA および MAA レクチンを、胚を取り囲む囲卵腔内に注入した結果、SSA 注入胚において原腸胚期までに発生異常が観察された。次に、SSA が認識する Neu5Acα2,6Gal 残基の形成に与るシアル酸転移酵素 ST6Gal I と II の発現抑制をモルフォリノオリゴヌクレオチド法によって行った結果、原腸胚以前において発生異常が観察された。一方、この異常はそれぞれの遺伝子の RNA 注入によって回復傾向を示した。以上の結果から、α2,6-シアル酸残基の発現が、少なくとも原腸胚以前の発生過程に必須であることが明らかになった。

sialic acid, sialyltransferase, medaka

講演番号：2D34a15
講演日時、会場：3 月 27 日 11:54～ D 校舎 34 会場

植物抗原性糖鎖ポリマーによる樹状細胞分化活性の解析
Analysis of dendritic cell proliferation by glycopolymer having plant actigenic *N*-glycans
○竹田 直人、前田 恵、木村 吉伸（岡大院・環境生命）
○Naoto TAKEDA, Megumi MAEDA, Yoshinobu KIMURA (Grad. Sch., Environ. Life Sci., Okayama Univ.)

【背景】花粉アレルゲンの多くは，β1-2 キシロース（Xyl）残基とα1-3 フコース（Fuc）残基を有する植物抗原性 *N*-グリカンが結合した糖タンパク質である。当研究室では，植物抗原性糖鎖の骨格構造（$Man_3Fuc_1Xyl_1GlcNAc_2$）がスギ花粉アレルゲン Cry j1 刺激によるスギ花粉症患者由来 Th2 細胞の細胞増殖と IL-4 産生を抑制することを明らかにした。そこで本研究では，機能性糖鎖を利用した抗花粉症（抗アレルギー）薬剤開発の一端として，植物抗原性糖鎖を多価に結合した新規糖鎖ポリマーを作製し，糖鎖認識タンパク質を発現している樹状細胞への活性を明らかにすることを目的とした。
【方法及び結果】糖鎖ポリマーの骨格には，生物分解性ポリマーとして，好塩古細菌が生産する L 体γポリグルタミン酸（L-γPGA，平均分子量 75 万，TOYOBO 社製）を用いた。また，糖鎖構造によって生じる免疫活性の違いを解析するため，動物および植物細胞で共通に発現されるハイマンノース型糖鎖（$Man_{5\text{-}9}GlcNAc_2$），ほ乳動物に発現されるバイアンテナ型複合型糖鎖（$NeuAc_2Gal_2GlcNAc_2Man_3GlcNAc_2$）についても糖鎖ポリマーの作製を試みた。(1) L-γPGA にカップリングさせる糖鎖は糖ペプチド（Asn-糖鎖）として精製し，植物抗原性糖鎖は銀杏種子貯蔵糖タンパク質から，ハイマンノース型糖鎖はトラマメ貯蔵糖タンパク質から，そしてバイアンテナ型動物複合型糖鎖は卵黄からそれぞれ調製・精製した。(2) L-γPGA と Asn-糖鎖を水に溶解後，縮合剤 DMT-MM を添加し，Glu 残基のカルボキシル基と Asn 残基のアミノ基間でアミド結合を形成させることで糖鎖ポリマーを合成した。反応終了後，ゲルろ過と逆相 HPLC を組み合わせることで合成糖鎖ポリマーを精製した。γPGA に対する Asn-糖鎖の結合率は，糖鎖ポリマー中のアスパラギン酸（Asp）とグルタミン酸（Glu）のモル比から算出した。その結果，本手法によりγPGA1 分子に対して約 890 分子の植物抗原性糖鎖を結合した（約 15%のカルボキシル基が糖鎖修飾された）糖鎖ポリマーを作製することに成功した。ハイマンノース型糖鎖，動物複合型糖鎖を含有する糖鎖ポリマーについても同様な方法で合成を行い，数百分子の糖鎖を結合させた糖鎖ポリマーを調製した。(3) 糖鎖ポリマーの免疫活性解析にはヒト末梢血から単離した $CD14^+$単球を IL-4 と GM-CSF 存在下で 6 日間培養し誘導した未熟樹状細胞を用いた。得られた未熟樹状細胞を糖鎖ポリマーで 2 日間刺激を行い，樹状細胞の分化マーカーである（CD80，CD86）の発現をフローサイトメーターにより解析した。その結果，植物抗原性糖鎖ポリマーは樹状細胞の CD86 発現を亢進し，T 細胞活性化に関与すると推察された。現在，T 細胞分化に関わる樹状細胞からのサイトカイン産生について解析を進めている。

N-glycans, γPGA, dendritic cell

講演番号：2D34p01
講演日時、会場：3 月 27 日 14:00～ D 校舎 34 会場

小胞体グルコース転移酵素(UGGT)の非触媒ドメインが糖転移に与える影響
Effect of the noncatalytic domain of UGGT on glucosyltransferase activity.
○武田 陽一 [1]、瀬古 玲 [1]、八須 匡和 [1]、和泉 雅之 [2]、藤川 紘樹 [1]、梶原 康宏 [1,2]、伊藤 幸成 [1,3]
([1]JST-ERATO、[2]阪大院理、[3]理研 細胞制御化学)
○Yoichi TAKEDA[1], Akira SEKO[1], Masakazu HACHISU[1], Masayuki IZUMI[2], Kohki FUJIKAWA[1], Yasuhiro KAJIHARA[1,2], Yukishige ITO[1,3] ([1]JST-ERATO, [2]Osaka Univ., [3]RIKEN)

「目的」
UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase (UGGT)はミスフォールドした糖タンパク質上の糖鎖に対してのみグルコースを 1 残基転移する酵素である[1]。モノグルコシル化された基質糖タンパク質は小胞体レクチンシャペロンである calnexin、calreticulin に対する親和性を獲得し、これらの働きによってフォールディングが促進されることから、UGGT はフォールディングセンサーとして機能していると考えられている。これまでに我々はアグリコンに蛍光分子を導入した人工基質を用いた評価系[2]を用いて、ヒト UGGT1 のアイソフォームである UGGT2 に弱いながらもグルコース転移活性があることを見出している[3]。UGGT1、UGGT2 ともに C 末端側に活性部位があり、そのアミノ酸相動性は 80%以上であるにもかかわらず糖転移活性が大きく異なることから、その活性の差は全長の 80%を占める N 末端側の領域の構造的な差異に起因すると考えた。そこで本研究ではヒト UGGT1 および UGGT2 のトランケート組み換えタンパク質および UGGT1 と UGGT2 のキメラタンパク質を用い、人工基質に対する糖転移活性を比較することで UGGT1 と UGGT2 の N 末端側非触媒ドメインが糖転移に与える影響を検討した。
「方法および結果」
蛍光官能基をアグリコンに導入した糖鎖 M9-Gly-BODIPY を基質に用いて、293T 細胞で発現させたヒト UGGT1 および UGGT2 のトランケート組み換えタンパク質、UGGT1 と UGGT2 のキメラタンパク質のグルコース転移活性を比較した。活性中心を含む C 末端側 20%を占めるドメインのみを発現したトランケート UGGT1 と UGGT2 は同等の糖転移活性を示したことから、両者の触媒能に差がないことが明らかになった。さらに、このドメインは糖ヌクレオチド供与体および糖受容体である高マンノース型糖鎖構造の認識も担っていることを明らかにした。本発表では UGGT1 と UGGT2 の各ドメインを入れ替えたキメラタンパク質を種々調製し、そのグルコース転移活性の比較から UGGT1 と UGGT2 の活性に大きく影響するドメインについて検討した結果もあわせて報告する。

[1] Parodi et al., Annu. Rev. Biochem., 2000, 69, 69.
[2] Totani et al., Biochemistry, 2009, 48, 2933.
[3] Takeda et al., Glycobiology, 2014, 24, 344.

high-mannose-type glycan, UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase

講演番号：2D34p02
講演日時、会場：3 月 27 日 14:11～ D 校舎 34 会場

ピレンを提示した糖タンパク質モデルに対する UGGT のグルコース転移活性
Characteristics of transglucosylation activity of UGGT by using pyren modified proteins
○八須 匡和[1]、瀬古 玲[1]、武田 陽一[1]、藤川 紘樹[1]、伊藤 幸成[1,2] ([1]JST・ERATO、[2]理研・細胞制御化学)
○Masakazu HACHISU[1], Akira Seko[1], Yoichi Takeda[1], Kohki Fujikawa[1], Yukishige Ito[1,2] ([1]JST・ERATO, [2]RIKEN Synthetic Cellular Chemistry Laboratory)

【目的】新生糖タンパク質は小胞体内で種々のレクチン様シャペロンやプロセシング酵素の働きにより、正しいフォールディングへと導かれる。小胞体内在性の糖転移酵素である UGGT (UDP-glucose: glycoprotein glucosyltransferase) はフォールディングセンサーとして機能している。UGGT はミスフォールドした糖タンパク質を認識し、その表面に存在する高マンノース型糖鎖の非還元末端にグルコースを転移する。小胞体内のレクチン様分子シャペロンは UGGT によってモノグルコシル化された高マンノース型糖鎖と高い親和性を有するため、これらシャペロンの作用によりミスフォールドした糖タンパク質のフォールディングが促進される。UGGT がミスフォールドした糖タンパク質のみを認識する分子メカニズムは未だ解明されていない [1]。今回、我々はヒト由来の UGGT を HEK293T 細胞よりリコンビナントタンパク質として調製することに成功した。そこで、UGGT の基質となる糖タンパク質を人工的に種々調製し、その基質認識に関する構造-活性相関について検討を行う。

【方法及び結果】UGGT のグルコシルアクセプターとなるためには、基質となるタンパク質表面に高マンノース型糖鎖を有し、且つミスフォールドした状態のタンパク質でなければならない。一般的にミスフォールドしたタンパク質は、疎水性アミノ酸残基がタンパク質表面に露出していることから、本研究では“高マンノース (M9) ‐メトトレキセート (MTX) -ジヒドロ葉酸還元酵素 (DHFR)” 複合体を人工糖タンパク質モデルとして利用し、その表面に疎水性小分子を提示することとした。まずタンパク質表面にシステイン残基を一つのみ有する DHFR の変異体を各種調製し、システインの遊離チオール基を N -(1-pyrene) iodoacetamide を用いて化学修飾した。このようにして系統的に得られた DHFR のピレン化誘導体は、疑似ミスフォールドタンパク質であるといえる。MTX の DHFR に対する強い親和性 (KD < 1nM) を利用し、種々の DHFR 誘導体に対して M9-MTX を複合化させ、UGGT の基質を調製した。これらの基質に対する UGGT のグルコース転移活性を測定し、基質上の高マンノース型糖鎖と疎水性分子との空間的な位置関係を調べることにより、UGGT の基質認識機構に関する考察を行った。

[1] Ito Y.; Takeda Y. *Proc. Jpn. Acad., Ser. B*. **2012**, *88*, 31.
[2] Totani, K; et al. *Angew. Chem. Int. Ed*. **2005**, *44*, 7950.

ER quality control, UGGT, N-glycan

講演番号：2D34p03
講演日時、会場：3 月 27 日 14:22～ D 校舎 34 会場

粗面小胞体マンノシダーゼの構造と機能の解析

Analysis of structure and function of ER alpha-mannosidase

○相川 順一[1]、武田 陽一[2]、瀬古 玲[2]、松尾 一郎[3]、伊藤 幸成[1,2] ([1]理研、[2]JST ERATO、[3]群馬大院工)
○Junichi Aikawa[1], Yoichi Takeda[2], Akira Seko[2], Ichiro Matsuo[3], Yukishige Ito[1,2] ([1]RIKEN, [2]JST ERATO, [3]Grad. Sch. Eng., Gunma Univ.)

「目的」

ER α-1,2 mannosidase I(ERManI)は細胞内小器官に局在し[1,2]、アスパラギン結合型糖鎖 $Man_9GlcNAc_2$ から、主に B 鎖のα-1,2 結合したマンノース(Man)を遊離させる酵素である。一方、ER で最終的に正しく折り畳まれなかった糖蛋白質は、その糖鎖のマンノースがより多く刈り込まれ、ER-associated degradation へと導かれる。我々は１）ヒト ERManI(hERManI)が化学合成した $Man_9GlcNAc_2$-PA 及び $GlcMan_9GlcNAc_2$-PA から複数の Man を 1 時間以内に刈り込むこと、及び２）hERManI が変性条件にさらされた $Man_9GlcNAc_2$ 及び $GlcMan_9GlcNAc_2$ を有する糖蛋白質から、より多くの Man を刈り込むことを示すことにより、ER-associated degradation(ERAD)に寄与していることを明らかにしてきた[3,4]。今回、hERManI の表面に局在し、糖鎖と相互作用することが予想されているアミノ酸の置換を行い、hERManI が糖鎖及び糖蛋白質をどのように認識するかを探求することを目指した。

「方法」

組換え型 hERManI[3] を用い、１）蛍光糖鎖を基質とした反応、及び、２）変性処理した糖蛋白質を基質とした反応を行った。

「結果」

Asn327, Ser375, Thr394, Asp523 の部位に置換を有する変異型酵素 Asn327Ser、Ser375Ala、Thr394Ile、Asp523Gly を得た。Asn327Ser 以外の変異型酵素と糖蛋白質との反応を行ったところ、Thr394Ile、Asp523Gly ではウシリボヌクレアーゼ B への反応性は無変異型と同等であるのに対し、ウシラクトフェリンに対しては活性が低下していた。以上の結果から、hERManI の基質と相互作用する部位のうち、活性に影響を及ぼす残基が明らかになった。hERManI の基質認識を解析するため、他の糖蛋白質に対する作用も報告する。

1) S. Pan *et al.* Mol. BIol. Cell **22**, 2810 (2011)
2) R. Benyair *et al.* Mol. BIol. Cell mbc.E14-06-1152
3) J. Aikawa, I. Matsuo & Y. Ito *Glycoconj. J.* **29**, 35-45 (2012)
4) J. Aikawa, Y. Takeda, I. Matsuo & Y. Ito *J. Biochem.* **155**, 375-384 (2014)

mannosidase, ERAD, glycoprotein

講演番号：2D34p04
講演日時、会場：3 月 27 日 14:33～ D 校舎 34 会場

タンパク質の安定性におけるN結合型糖鎖が付加したアスパラギン残基の役割の解析
Analysis of the role of N-glycosylated asparagine residue for protein stability
宮崎 剛亜、矢代 浩之、西河 淳、○殿塚 隆史（東京農工大院農）
Takatsugu Miyazaki, Hiroyuki Yashiro, Atsushi Nishikawa, ○Takashi Tonozuka (Tokyo Univ. of Agriculture and Technology)

【目的と方法】*N*結合型糖鎖の付加は、真核生物の代表的な翻訳後修飾である。*N*結合型糖鎖はCNX/CRT タンパク質と協同してタンパク質のフォールディングに対して機能しているほかに、*N*結合型糖鎖の存在自体がタンパク質の安定性に寄与しているという報告が多くなされている。しかしながら、タンパク質の立体構造に対してどのように安定性に寄与しているのか、具体的な報告はあまりなされていない。我々が材料としたイソプルラナーゼという酵素は糖タンパク質で、活性中心近傍のAsn448 に*N*結合型糖鎖が付加する。今回、Asn448 およびその近傍に変異を導入し、*N*結合型糖鎖が付加しなくなった変異酵素 N448A および S450A、*N*結合型糖鎖と相互作用している残基に変異を導入した酵素 Y440A を構築した。これらの変異酵素を酵母 *Pichia pastoris* で生産させ、温度安定性を測定した。さらに N448A の立体構造を決定し、*N*結合型糖鎖の機能について考察した。

【結果と考察】温度安定性を測定したところ、残存活性が 50%となる温度は、野生型 55.0℃、N448A 49.3℃、Y440A、46.6℃、S450A 54.5℃であった。このことから、*N*結合型糖鎖は付加しないが Asn448 の側鎖は存在する酵素である S450A は、野生型とほぼ同じ温度安定性を示すことが分かった。N448A の立体構造解析を行ったところ、448 番目の存在するループの構造は N448A では結晶学的非対称単位に存在する 4 分子の間で異なっていた。これらの結果から、Asn448 に付加する*N*結合型糖鎖というよりは Asn448 の側鎖そのものがタンパク質の立体構造に最も重要であり、Asn448 に付加する*N*結合型糖鎖は、Asn448 の側鎖の機能を補強するような役割であると考えられた。本研究より、*N*結合型糖鎖の役割を検証する実験で Asn に変異を導入するのみでは、誤った結果を導く恐れがあることが示された。

*N*結合型糖鎖の付加する配列（Sequon）である Asn-X-Ser/Thr には多様なコンフィギュレーションがあることが明らかになっており、Packed、Intermediate、Extended の 3 つに分類されている。Packed および Extended のコンフィギュレーションは 22%、61%であるのに対し、Intermediate は 17%と少ない。今回の Asn448 の Sequon は Intermediate に分類され、Sequon としては特異なコンフィギュレーションであることが判明した。今後、Sequon のコンフィギュレーションと*N*結合型糖鎖の役割の関係が、より明らかになることが望まれる。

【参考文献 】Miyazaki, T. *et. al., J. Biochem.,* in press, DOI: 10.1093/jb/mvu065

N-glycosylation, thermostability, sequon

講演番号：2D34p05
講演日時、会場：3 月 27 日 14:44～ D 校舎 34 会場

遊離 N-グリカンのタンパク質リフォールディング促進活性

Promotion of protein refolding by free N-glycans

○田中 達也[1]、藤崎 尚樹[2]、前田 恵[1]、二見 淳一郎[3]、阿部 義人[2]、植田 正[2]、木村 吉伸[1]([1]岡大院・環境生命、[2]九大院・薬学府、[3]岡大院・自然科学)
○Tatsuya TANAKA[1], Naoki FUJISAKI[2], Megumi MAEDA[1], jun-ichiro FUTAMI[3], Yoshito ABE[2], Tadashi UEDA[2], Yoshinobu KIMURA[1] ([1]Grad. Sch., Environ. Life Sci., Okayama Univ., [2]Dept. of Pharm. Kyushu Univ, [3]Grad. Schl.Natl.Sci.Tech., Okayama Univ.)

【背景と目的】分化・成長中の植物組織には遊離型 *N*-グリカン (FNGs) がμM 濃度で存在する。それら FNGs の生理機能を明らかにする目的で（1）構造特性解析，(2)FNGs 生成機構に関与する酵素遺伝子の同定及び発現制御植物の構築が進められてきている。一方，我々は FNGs の *in vitro* におけるタンパク質リフォールディング促進活性を報告しているが[1,2]，*in vivo* 機能として捉えることができていなかった。最近，我々はこれまでの FNGs 生成機構では説明できない構造の植物複合型 FNGs (GN1-FNGs)を見出し [3]，FNGs がタンパク質フォールディングの場である小胞体中に FNGs が存在する可能性を示唆した。そこで，本研究では 2 つのモデルタンパク質を用いて，FNGs のタンパク質フォールディング誘導活性を生化学的及び物理化学的側面から解析した。

【方法】ハイマンノース型 (Man8GlcNAc2) 遊離糖鎖はインゲン豆貯蔵糖タンパク質から，植物複合型糖鎖(Man3Xyl1Fuc1GlcNAc2)は銀杏種子貯蔵糖タンパク質から，バイアンテナ型の動物複合型糖鎖(Asn-糖鎖)はニワトリ卵黄からそれぞれ調製した。FNGs のタンパク質リフォールディング誘導活性は以下の２つの方法で解析した。(1) RNase B （糖タンパク質）から Endo-H 処理によりハイマンノース型糖鎖を遊離させた後，ハイマンノース型 FNGs 添加によるリフォールディング誘導を Trp 蛍光強度変化と RNase 活性を指標として解析した。 (2) アミロイドーシスを惹起する変異抗体分子（L 鎖可変領域ドメイン変異タンパク質，3Hmut Wil）を用いて，ハイマンノース型及び動物複合型 FNGs によるフォールディング促進活性を ①Trp 蛍光強度変化追跡，②^{1}H-^{15}N NMR (HSQC-NMR) を用いたタンパク質構造解析に基づき測定した。

【結果・考察】 (1) Endo-H 処理 RNase B は，ハイマンノース型 FNGs（5mM）添加により，有意な酵素活性の回復と Trp 蛍光強度の低下が観察された。(2) 3Hmut Wil については，それぞれの FNGs 濃度依存的に Trp 蛍光強度が低下するとともに，アミロイド形成が 5 mM FNGs 添加により 80%程度 ，10mM FNGs 添加により 90%程度阻害された。また，HSQC-NMR 解析から，FNG 添加により 3Hmut Wil が正常なフォールディングへと誘導され，アミロイド形成が阻害されることが確認された。

[1] 木村ら 第 22 回日本糖質学会講演要旨 p57 静岡(2001), [2] Tanaka, T. *et al. Glycobiology* 23,1376 (2013), [3] Maeda, M., Kimura, M., and Kimura, Y. *J. Biochem*.148, 681-692(2010)

Free N-Glycans, Protein folding stimulation activity, HSQC-NMR

講演番号：2D34p06
講演日時、会場：3 月 27 日 15:05～ D 校舎 34 会場

新規植物複合型遊離 *N*-グリカン生成機構の解明

Analysis of novel production mechanism for plant complex type free *N*-glycan

前田 恵[1,2]、○江原 菜津紀[1]、木村 吉伸[1,2] ([1]岡大・農、[2]岡大院・環境生命)
Megumi MAEDA[1,2], ○Natsuki EBARA[1], Yoshinobu KIMURA[1,2] ([1]Fac. Agr., Okayama Univ., [2]Grad. Sch., Environ. Life Sci., Okayama Univ.)

【背景と目的】小胞体（ER）内でミスフォールドした新生糖タンパク質は，細胞質へと逆輸送されプロテアソーム分解に先立ち糖鎖の切り離しを受ける。糖鎖 (*N*-グリカン) の切り出しには，Peptide:*N*-glycansase (PNGase) と Endo-β-*N*-acetylglucosaminidase (ENGase) が連続的に働き，還元末端側に 1 残基の GlcNAc を有するハイマンノース型の遊離 *N*-グリカン（FNGs）が生成する。FNGs は成長・分化中の植物組織には μM 濃度で遍在するが，その生理的機能はいまだ解明されていない。我々は，FNGs の生理機能解明の一環として，植物 FNGs の構造特性を把握するため様々な植物を対象として FNGs の網羅的な構造解析を行ってきた。その過程で，イネ培養細胞の培養液中から，植物複合型 (plant complex, PC) 構造を持つ GN1 型 FNGs（GN1-PC-FNGs）を発見した。GN1 型 FNGs は，ER 中でミスフォールドした新生糖タンパク質に由来するため，それらの殆どはハイマンノース型構造である。一方，α1,3-Fuc/β1,2-Xyl 残基含有の植物複合型糖鎖に作用する植物 ENGase は，これまで知られていない。従って, GN1-PC-FNGs の存在は既知の代謝機構からは説明がつかないため, 我々は FNGs の新たなプロセシング経路を提唱した [1]。しかしながら，GN1-PC-FNGs はイネ培養細胞の培養液から報告されているのみであり，分化した植物体における存在が不明である。そこで本研究では，その仮説経路を立証するために，分化した植物体における GN1-PC-FNGs の存在の確認と植物ミクロゾーム画分に含まれる FNGs の構造解析を行った。

【方法・結果】

(1) オオカナダモ中の FNGs 構造解析

複合型糖鎖へのプロセシング系が昂進しているオオカナダをモデル植物として，FNGs の構造解析を行った。その結果，分化した植物体中からも PC-GN1-FNGs ($GlcNAc_2Man_3Xyl_1GlcNAc_1$) が初めて検出され，PC-GN1-FNGs の生成が培養細胞系に特異的ではないことが証明された。

(2) 小胞体あるいはゴルジ装置中の FNGs 検索

小胞体あるいはゴルジ装置中に GN1-FNGs が存在することを証明するために，タバコ培養細胞を用いて，ミクロゾーム画分を調製後，界面活性剤 (Triton X-100，SDS) により内在する糖鎖を調製後，解析を行っているので合わせて報告する。

[1] Maeda, M., Kimura, M., and Kimura, Y. *J. Biochem.,* **148**, 681-692 (2010)

free *N*-glycans, ENGase, ERAD

講演番号：2D34p07
講演日時、会場：3 月 27 日 15:16～ D 校舎 34 会場

糖タンパク質からアスパラギン結合型糖鎖を容易に遊離する酵素生産菌と産生酵素の性質

Isolation of microorganisms producing endo-β-*N*-acetylglcucosaminidases acting on native glycoproteins and the properties of the enzymes

高谷 尚弥、竹内 朋史、○伊藤 和央（阪市大院・理）
Naoyo TAKATANI, Tomohumi TAKEUCHI, ○Kazuo ITO (Grad. Sch. of Sci., Osaka City Univ.)

【目的】エンド-β-*N*-アセチルグルコサミニダーゼは、糖タンパク質のアスパラギン残基に結合する*N*-グリコシド結合型糖鎖のジアセチルキトビオース部分に作用し、糖鎖を遊離するエンド型グリコシダーゼである。本酵素は糖鎖の構造や機能解析あるいは糖鎖付加に極めて有用である。我々は、nativeな糖タンパク質から直接アスパラギン結合型糖鎖を遊離する新規な酵素生産菌を、ヒトをはじめとする各種動物から探索し、その性質の解析と開発研究を行っている。本研究では、ヒトより分離、取得した菌の産生する酵素の性質について調べた。

【方法】糖タンパク質を基質として、糖鎖の遊離を電気泳動で調べた。遊離糖鎖および糖鎖転移生成物は、TLC によって分離・検出するとともに MALDI-TOF MS によって分析した。酵素の精製は各種カラムクロマトグラフィーによって行った。菌の同定は、16s rRNA 遺伝子の塩基配列を比較することによって行った。

【結果】複数の糖タンパク質糖鎖遊離酵素生産菌を分離した。そのうち、*Prevotella* 属菌と同定された菌株がエンド-β-*N*-アセチルグルコサミニダーゼを産生した。これらは *Prevotella bivia* と同定された。また、もう 1 つは既知種に該当せず *Prevotella sp.* とした。さらに、*P. bivia* と近縁の *Prevotella melaninogenica* も同酵素活性を示すことを見出した。これらの産生する酵素をそれぞれエンド PB、エンド Psp. およびエンド PM とした。いずれの酵素もヒトトランスフェリン、ウシフェツインおよびヒトα1 酸性糖タンパク質に作用し、非還元末端側の Sia や biscecting GlcNAc あるいは還元末端側の GlcNAc に結合する Fuc の存在に関わらず、様々な native な糖タンパク質から 2、3 および 4 本鎖コンプレックス型糖鎖を容易に遊離した。また、コンプレックス型糖鎖を他の糖に転移する活性を示した。一方、糖タンパク質からのハイマンノースやハイブリッド型糖鎖の遊離活性は認められなかった。いずれの酵素も菌体に結合しており、エンド PB はエンド Psp. やエンド PM とは異なる条件で可溶化された。さらに、エンド Psp. には培養液中に遊離型の酵素が存在した。これら酵素は糖タンパク質に結合しているアスパラギン結合型糖鎖のうち、多様な構造を示すコンプレックス型糖鎖の遊離および転移導入に有用な酵素と考えられた。これら酵素の精製と遺伝子のクローニングを行い、精製酵素と遺伝子発現酵素の性質を解析している。

endo-β-*N*-acetylglucosaminidase PM, endo-β-*N*-acetylglucosaminidase PB, *Prevotella*

講演番号：2D34p08
講演日時、会場：3 月 27 日 15:27～ D 校舎 34 会場

β-1,3-1,6-グルカンによる難水溶性物質の分散（1） ―Renature-β-1,3-1,6-グルカンをホストとする中性条件での難水溶性物質の分散法の開発―
Dispersion of water-insoluble molecules utilizing beta-1,3-1,6-glucans -Investigation of dispersion method of water-insoluble molecules utilizing Renature-beta-1,3-1,6-glucan as a host-
○中川 暁史[1]、鈴木 利雄[2]、甲元 一也[1]([1]甲南大 FIRST、[2]阪市大院工)
○Akifumi NAKAGAWA[1], Toshio SUZUKI[2], Kazuya KOUMOTO[1] ([1]Konan Univ., [2]Osaka City Univ.)

【研究背景】
医薬品、食品、化粧品の薬効成分や有効成分の多くは水溶性に乏しく、このような難水溶性物質を水に高濃度で分散させる技術は年々必要性を増している。分散技術の中でも、分散後の安定性に優れた包接分散技術は実用性も高く、さかんに研究が行われている。包接分散剤としてシクロデキストリンが使用される中、最近、幅広い大きさの難水溶性物質を包接、分散できるβ－１，３－１，６－グルカンに注目が集まってきた。β－１，３－１，６－グルカンは自然界ではβ－１，３－グルカン主鎖が形成する水素結合により三重らせん構造をとる。この三重らせん構造はアルカリ条件で一本鎖に融解するが、中和すると三重らせん構造へと巻き戻る。新海らはこの巻き戻り過程に難水溶性物質を共存させることで、難水溶性物質をらせん内部の疎水空間に包接できることを報告している。しかし、難水溶性物質がアルカリに曝されるため、不安定化合物には使えないことが問題であった。本研究では、ゲスト不在下でアルカリ融解後、巻き戻らせた「Ｒｅｎａｔｕｒｅ－β－１，３－１，６－グルカン」が一部に二重らせんや一本鎖からなるランダム領域を含むことに着目し、このランダム領域をもつβ－１，３－１，６－グルカンの難水溶性物質の包接・分散について検討したので報告する。
【実験方法】
β－１，３－１，６－グルカンとして黒酵母菌由来のβ－１，３－１，６－グルカンを、難水溶性物質としてアゾ色素を用いた。このアゾ色素は水中で沈殿を生ずるため、β－１，３－１，６－グルカンによるアゾ色素の分散性は、上清のアゾ色素の吸光度から評価した。
【実験結果】
Ｒｅｎａｔｕｒｅ－β－１，３－１，６－グルカンと非融解β－１，３－１，６－グルカンを用いて、難水溶性アゾ色素の分散を検討したところ、グルカン非存在下の分散性と比較してＲｅｎａｔｕｒｅ－β－１，３－１，６－グルカンは１．７倍アゾ色素を分散させることが明らかとなった。一方、非融解β－１，３－１，６－グルカンでは分散性は上昇するものの、１．３倍にとどまった。この結果から、Ｒｅｎａｔｕｒｅ－β－１，３－１，６－グルカンがもつランダム領域が色素の分散性を向上することが示唆された。また、再生過程の水素結合の形成 - 解離を促進する水素結合性化合物を共存させると、アゾ色素の分散性がさらに高まることも明らかとなった。講演では、包接複合体の安定性や化学量論比、推定される難水溶性物質の包接・分散メカニズムについても報告する予定である。

β-1,3-glucan, dispersion, inclusion

講演番号：2D34p09
講演日時、会場：3 月 27 日 15:38～ D 校舎 34 会場

β-1,3-1,6-グルカンにおける難水溶性物質の分散（2）―β-1,3-1,6-グルカンに包接された薬理活性物質シコニンの安定性―

Dispersion of water-insoluble molecules unilizing beta-1,3-1,6-glucans(2) -Stability of bioactive molecule, shikonin complex with beta-1,3-1,6-glucan-

○児玉 歩夢[1]、中川 暁史[1]、鈴木 利雄[2]、谷口 泰三[3]、甲元 一也[1]([1]甲南大ＦＩＲＳＴ、[2]阪市大院工、[3]姫路獨大薬)

○Ayumu KODAMA[1], Akihumi NAKAGAWA[1], Toshio SUZUKI[2], Taizo TANIGUSHI[3], Kazuya KOUMOTO[1] ([1]Konan Univ., [2]Osaka city Univ., [3]Himeji dokkyo Univ.)

【研究背景】

ムラサキの根である紫根は、古くから生薬や染料として利用されてきた。この有効成分はナフトキノンの誘導体であるシコニンであることが同定され、その後、シコニンには抗菌作用、抗炎症作用、抗腫瘍作用のような薬理活性があることが次々と見つかっている。しかし、シコニンは水溶性が乏しく、単独で水に溶解しない。そのため、利用するにはＤＭＳＯのような有機溶媒や多量の界面活性剤の添加などの可溶化法が必要となり、様々な効能があるにもかかわらず積極的に使用されるには至っていない。また、薬理活性の発現に比較的高濃度で水に分散させることも不可欠となる。

我々の研究室では、幅広い大きさの難水溶性物質を包接、分散できるβ－１，３－１，６－グルカンの簡便、且つ、汎用的な難水溶性物質の包接、分散方法について研究を行ってきた。その結果、前演者が報告したように、中性条件下で簡便に行える難水溶性物質の分散法の開発に成功した。本講演では、高い薬理活性を有するシコニンの分散に対して開発したβ－１，３－１，６－グルカンによる分散法が適用できるか否かを検討する。また、包接によってシコニンの安定性がどのように変化するかについてもシコニンの光退色実験から検討したので合わせて報告する。

【実験方法・結果】

分散剤となるβ－１，３－１，６－グルカンには、黒酵母由来のβ－１，３－１，６－グルカンを用い、アルカリ融解後に中和したＲｅｎａｔｕｒｅβ－１，３－１，６－グルカンを難水溶性物質のホストとして用いた。またコントロ－ルとしてアルカリ融解していない非融解β－１，３－１，６－グルカンも用いた。シコニンは光退色しやすいため、安定性の評価には紫外線を照射に伴う光退色速度を比較した。

Ｒｅｎａｔｕｒｅβ－１，３－１，６－グルカン、非融解β－１，３－１，６－グルカンを溶解させた水溶液に、難水溶性のシコニンのメタノ－ル溶液を添加すると、シコニンを水に溶解分散させることができた。包接されたシコニンは、数日間水溶液中に静置しても沈殿を生ずることはなく、高い安定性を保持していることが示された。包接されたシコニンに高圧水銀灯を用いて紫外線を照射し、光退色速度を調べたところ、非融解β－１，３－１，６－グルカンに包接されたシコニンと比較してＲｅｎａｔｕｒｅβ－１，３－１，６－グルカンに包接されたシコニンでは光退色速度が半分になることが明らかとなった。講演では、これらの実験の詳細について報告する。

β-1,3-glucan, Shikonin, dispersion

講演番号：2D34p10
講演日時、会場：3 月 27 日 15:49～ D 校舎 34 会場

β-1,3-1,6-グルカンによる難水溶性物質の分散（3） ―Renature-β-1,3-1,6-グルカンと水素結合性化合物を利用する酸化チタン粒子の分散法の開発―

Dispersion of water-insoluble molecules utilizing beta-1,3-1,6-glucans -Investigation of dispersion method of TiO2 nano particles via molecular interaction using Renature-beta-1,3-1,6-glucan and hydrogen-bonding reagents-

○小坂 美恵[1]、中川 暁史[1]、鈴木 利雄[2]、井戸垣 秀聡[3]、甲元 一也[1]（[1]甲南大 FIRST、[2]阪市大院工、[3]ダイソー（株））

○ Mie KOSAKA[1], Akifumi NAKAGAWA[1], Toshio SUZUKI[2], Hideaki IDOGAKI[3], Kazuya KOUMOTO[1] ([1]Konan Univ., [2]Osaka City Univ., [3]DAISO Co. LTD.)

【研究背景】

チタンホワイトと呼ばれる独特の白色を呈す酸化チタンは、古くから化粧品に用いられてきた。化粧品に使用する酸化チタンは微粒子状であり、活性酸素の発生を抑えるために、その表面はアルミナやシリカにより被覆されている。最近は、より自然な白色を出せる１００ｎｍ程度の酸化チタン微粒子が用いられるようになったが、微粒子状の酸化チタンは凝集力が強く、水溶液中で凝集、沈降してしまう。我々の研究室では、幅広い大きさの難水溶性物質を包接、分散できるβ－１，３－１，６－グルカンの簡便、且つ、汎用的な難水溶性物質の包接、分散方法について実験を行ってきた。その結果、前演者が報告したように、中性条件下で簡便に行える難水溶性物質の分散法の開発に成功した。本発表講演では、水分散性の乏しいアルミナ被覆酸化チタン微粒子に対して開発したβ－１，３－１，６－グルカンが水分散性を向上できるか否かを検討したのでその結果について報告する。

【実験方法】

分散剤となるβ－１，３－１，６－グルカンには、黒酵母菌由来のβ－１，３－１，６－グルカンを用い、アルカリ融解後に中和した再生β−１，３－１，６－グルカンを難水溶性物質のホストとして用いた。また、コントロールとしてアルカリ融解していない非融解β－１，３－１，６－グルカンも用いた。アルミナ処理被覆酸化チタン微粒子の分散性は、動的光散乱測定やゼータ電位測定を用いて評価した。

【実験結果】

低分子の難水溶性物質に対して、再生β－１，３－１，６－グルカンを添加すると難水溶性物質の水分散性が向上し、水素結合性化合物を添加すると水分散性がさらに大きく向上することが明らかとなっている。しかし、酸化チタン微粒子の場合は水素結合性化合物の添加が微粒子の分散に不可欠であることがわかった。この結果を説明するために、酸化チタン、水素結合性化合物、β－１，３－１，６－グルカンの混合順を検討したところ、酸化チタンと水素結合性化合物を混合後にβ－１，３－１，６－グルカンを添加することで分散性が高まることが示された。この条件下、酸化チタン微粒子の動的光散乱、ゼータ電位測定をしたところ、水素結合性化合物は酸化チタン表面に吸着し、β－１，３－１，６－グルカンの吸着を促すことが示唆された。今回は、このβ－１，３－１，６－グルカンによる低分散性酸化チタン微粒子の分散メカニズムについて報告する。

β-1,3-glucan, TiO2, nano perticles

講演番号：2D34p11
講演日時、会場：3 月 27 日 16:10～ D 校舎 34 会場

バイオ医薬品創出に向けた Endo-M 基質特異性の改変

Alteration of the substrate specificity of Endo-M towards biomedicine production

○加藤 紀彦[1]、坂口 広大[1]、片山 高嶺[1]、熊田 純一[2]、松崎 祐二[2]、山本 憲二[1] ([1]石川県大、[2]東京化成工業)
○Toshihiko KATOH[1], Kouta SAKAGUCHI[1], Takane KATAYAMA[1], Jyunichi KUMADA[2], Yuji MATSUZAKI[2], Kenji YAMAMOTO[1] ([1]Ishikawa Pref. Univ., [2]TCI)

糸状菌 *Mucor hiemalis* 由来の endo-β-*N*-acetylglucosaminidase（Endo-M）は、糖タンパク質や糖ペプチドのアスパラギン結合型糖鎖のキトビオース部分に作用し、タンパク質やペプチドに１残基の *N*-acetylglucosamine を残して糖鎖を遊離するエンド型酵素である。本酵素は加水分解活性のみならず、糖やアルコールといった水酸基を持つ化合物に糖ペプチド、糖タンパク質より遊離した糖鎖を転移付加する糖転移活性をも有するユニークな酵素である。

本酵素あるいは本酵素変異体（N175Q: グライコシンターゼ）は、その特異な糖転移活性を利用して、均質な糖鎖構造を持つバイオ医薬品を創出するツールとして期待され応用が試みられている。Endo-M は高マンノース型糖鎖だけでなくシアル酸残基を持つ２本鎖複合型糖鎖にも作用するが、抗体医薬など動物の培養細胞由来の糖タンパク質に普遍的に見られるコアフコースを持つ複合型糖鎖に対しては加水分解活性、糖転移活性ともにほとんど示さない。本酵素の汎用性という観点から、コアフコースの有無に関わらず作用するより広い基質特異性を有する酵素の取得が望まれている。

そこで我々は Endo-M 酵素に部位特異的変異導入を行うことによって、コアフコースを持つ糖鎖に対する活性の向上を試みた。Endo-M は Glycoside hydrolase family 85 (GH85) に分類されるが、同じく GH85 に分類される Endo-D はコアフコースを持つトリミングされた糖鎖に対して加水分解活性を有する。一方、同じく GH85 に分類される Endo-A は Endo-M と同様にコアフコースを持つ糖鎖に対しては作用しない。Endo-D と Endo-A のタンパク質立体構造を比較すると、活性中心付近のアミノ酸残基の保存性にいくつかの相違点が見出された。そこで Endo-M、 Endo-A に共通し、Endo-D に特異なアミノ酸残基に着目して、部位特異的変異導入を Endo-M について行った。６つの Endo-M 変異体を作製し、コアフコースを有する人工基質 $Man_3GlcNAc_2Fuc_1$-biotin に対する加水分解活性を調べたところ、W251N 変異型酵素は WT と比べ約 350 倍の上昇が見出された。さらに Fucα1-6GlcNAc-biotin を受容体とした糖転移反応を、シアル酸含有２本鎖複合糖鎖のオキサゾリン中間体を糖鎖供与体として行ったところ、MALDI-TOF MS 分析によって WT では見られなかった糖転移生成物のピークが検出され、さらに MS/MS 分析によって糖転移反応産物であることが確かめられた。本研究をさらに進めることにより、Endo-M に新たな基質特異性を付与することが可能で本酵素の汎用性が拡大し、糖鎖の均一性が求められるバイオ医薬品の創出のツールとしての応用が期待できる。

Endo-β-*N*-acetylglucosaminidase, Core-fucose, Endo-M

講演番号：2D34p12
講演日時、会場：3 月 27 日 16:21～ D 校舎 34 会場

酵母を用いたヒト *O*-結合型糖鎖 Core3 構造の生産
Production of human Core3 *O*-glycan in yeast cells

○齋藤 扶美恵[1,2]、千葉 靖典[1]、金谷 章生[2] ([1]産総研・糖鎖創薬、[2]（株）グライコジーン)
○Fumie SAITO[1,2], Yasunori CHIBA[1], Akio KANATANI[2] ([1]GTRC, AIST, [2]GlycoGene, Inc.)

ムチンは哺乳動物の粘液分泌物中や糖鎖を外部環境にさらしている細胞表面中の膜貫通型糖タンパク質であり、高度に *O*-グリコシル化されている。ムチン型 *O*-グリカンの糖鎖構造はセリンまたはスレオニンに *N*-アセチルガラクトサミンがα結合することから伸張が始まり、*N*-アセチルグルコサミンやガラクトース、シアル酸等によって多様な構造を形成する。Core3 構造（GlcNAcβ1-3GalNAcα-Ser/Thr）は、ムチン型 *O*-グリカンのコア型の１つであり、消化管や粘膜上皮に存在し、特に大腸のムチンには Core3 構造が主要に発現している。しかし、培養がん細胞中では Core3 合成酵素の１つであるβ3GnT6 の発現が著しく低下し、他の Core 構造が増加する事が知られているが、Core 構造の機能については未知の部分が多い。Core3 構造は、ムチン型 *O*-グリカンの機能の解明や、有用タンパク質の生産のために必要とされている。

本研究では、出芽酵母において「Three enzymatic steps」を用いた Core3 構造の *in vivo* 生産を試みた。まず、Core3 合成に必要な糖ヌクレオチド供与体は *Bacillus subtilis* UDP-Gal/GalNAc 4 epimerase（GalE）を細胞質に発現させ、内在性の UDP-GlcNAc から UDP-GalNAc に変換させた。次に、UDP-GalNAc 及び UDP-GlcNAc をゴルジ体へ輸送するため、human UDP-Gal/GalNAc transpoter（UGT2）及び *Kluyveromyces lactis* UDP-GlcNAc（MNN2-2）遺伝子を導入した。最後に、糖転移酵素 human ppGalNAcT-1 及び human βGnT6 は、ゴルジ体局在性の酵母由来糖転移酵素の膜貫通領域を N 末側に配置し、融合タンパク質として発現させた。この酵母細胞でのペプチドまたはタンパク質への Core3 糖鎖修飾を確認するため、アクセプターペプチドとして MUC1ap ペプチドを細胞外へ分泌発現させ、付加している糖鎖構造の解析を行った。その結果、主要な構造は *O*-GalNAc であり、Core3 は微量であった。そこで、β3GnT6 の発現と活性の増加を試みた。発現の確認のために挿入していた 3xFLAG tag を除き発現させた所、発現量と *in vitro* β3GnT6 活性の増加が確認できたが、Core3 の付加量に変化は見られなかった。糖転移酵素の多くはその反応において、Mn^{2+}を必要とするため、β3GnT6 の *in vitro* assay 系において Mn^{2+}の要求量を調べたところ、10 mM で最も高い活性を示す事が解った。この結果から、細胞内の Mn^{2+}濃度が不十分であることが示唆されたため、培地に $MnCl_2$ を添加して培養を行ったところ、Core3 が付加した MUC1ap ペプチドの増加を確認する事ができた。

yeast, Core3 *O*-glycan, biosynthesis

講演番号：2D34p13
講演日時、会場：3 月 27 日 16:32～ D 校舎 34 会場

蛍光標識化スフィンゴ糖脂質による細胞内オルガネラの動態解析

Analysis of organella dynamics by using fluorescently tagged glycosphingolipid

○新井 健太[1]、吉原 央[2]、蟹江 善美[3]、樺山 一哉[4]、蟹江 治[1,3] ([1]東海大院 工、[2]東海大 工、[3]東海大 糖鎖研、[4]大阪大院 理)
○Kenta Arai[1], Hisashi Yoshihara[2], Yoshimi Kanie[3], Kazuya Kabayama[4], Osamu Kanie[1,3] ([1]Tokai Univ., Grad. Eng., [2]Tokai Univ., Dept. Eng., [3]Tokai Univ., Inst. Glycosci., [4]Osaka Univ., Grad. Sci.)

糖脂質は細胞内での様々な現象に関与しており、がんや糖尿病などの疾病マーカーとしても期待されている。しかしながら、糖脂質合成に関する詳細なメカニズムは未解明である。細胞内の糖鎖修飾の制御機構を理解することは糖脂質の変異を解析する方法の確立に繋がり、その変異による病気の診断等に役立つと考えられる。最近、蛍光標識化糖脂質を培養細胞内に導入し、糖脂質の変換過程を解析する方法が報告された。しかし、時間分解能の問題から細胞内の局在変化の解析が曖昧であった。そこで我々は、蛍光標識化糖脂質の添加濃度の調節及びパルスチェイスにおけるパルス幅の検討を行った。時間分解能を向上させることにより、蛍光糖脂質の細胞内での局在変化、および、挙動を詳細に解析する方法を確立した。これにより時間分解能が向上し細胞内オルガネラの成熟速度を求められる可能性も示唆された。

始めに CHO-K1 細胞に 2.5 μM の LacCerBODIPY を 1 分間のパルスで取り込ませ、LacCerBODIPY の挙動を追跡観察したところエンドサイトーシスにより取り込まれ、ゴルジ体に移行していき、最終的に膜に再局在する様子を観察することができた。

次に PC12D 細胞に対して同様の蛍光糖脂質を取り込ませ、細胞内での局在の変化の速度について光退色後蛍光回復（FRAP）法を用いて観察した。上記と同様の実験より得られた蛍光糖脂質の細胞内局在の情報をもとに、細胞膜、ゴルジ体、リサイクリングエンドソーム領域にて FRAP 解析を行った結果、細胞の分化状態によりゴルジ体の成熟速度に差異が見られた。また、細胞膜及びリサイクリングエンドソームにおいても分化前後の細胞において特徴的な傾向が見られた。

今後は、細胞内の様々な蛍光糖脂質の局在を解析し、細胞膜上の微細構造の解析とともにオルガネラの動態について詳細に検討する。

glycosphingolipids, organella localization, FRAP

講演番号：2D34p14
講演日時、会場：3 月 27 日 16:43～ D 校舎 34 会場

ミルレクチン CFL-I と CFL-II の糖鎖アレイ解析とタンパク質構造解析
Analysis of glycoarray and protein structure of lectins from *condium fragile*, CFL-I and CFL-II
前田 恵[1,2]、○縄田 苑子[1]、谷 美里[2]、木村 吉伸[1,2]([1]岡大・農、[2]岡大院・環境生命)
Megumi MAEDA[1,2], ○ Sonoko NAWATA[1], Misato TANI[2], Yoshinobu KIMURA[1,2]
([1]Fac.Agr.,Okayama Univ., [2]Grad.Sch.,Environ.Life Sci.,Okayama Univ.)

【目的】多くの海藻は未利用バイオマスとして捉えることができる。我々はこれまでに，瀬戸内海に生育する海藻からの (1) 免疫活性糖鎖スクリーニング，(2) 腫瘍抗原糖鎖認識レクチンの探索と機能解析を進めてきた。その結果，(1) アマモ (*Zostera marina*)，ホンダワラ (*Sargassum fulvellum*) には，HIV 抗体作成に利用可能なハイマンノース型糖鎖 ($Man_9GlcNAc_2$) が特異的に多量発現されていることを明らかにした。一方，海藻レクチンについてはこれまでに多くの報告があるものの，糖鎖アレイ分析による詳細な糖鎖結合解析を行っている例はそれほど多くはない。そこで本研究では，瀬戸内海に生育する海藻として，緑藻ミル (*Codium fragile*) に着目し，ミルが発現しているレクチンの精製，タンパク質構造解析，糖鎖結合解析，遺伝子クローニングを行った。
【方法・結果】ミル (*Codium fragile*) は岡山県瀬戸内市牛窓町沿岸部で採取した。ミル (2.2 kg) をアセトン脱脂後，0.5 M NaCl を含む 20 mM Tris-HCl 緩衝液（pH 8.5）でタンパク質の抽出を行った。粗レクチン画分から疎水クロマトとゲルろ過を組み合わせることで 2 種のレクチン (CFL-I, CFL-II) を精製した。CFL-I と CFL-II の分子量は，還元条件下の SDS-PAGE で，それぞれ 40 kDa および 12kDa であった。また，CFL-I の N 末端配列が A-P-T-K-L-であるのに対して，CFL-II のそれは F-Q-T-G-I-V-であり，ゲルろ過と SDS-PAGE との結果から，CFL-I，CFL-II は異なるタンパク質であることが明らかとなった。CFL-I はヒト A 型，AB 型赤血球とニワトリ赤血球を特異的に凝集させたが，B 型および O 型赤血球に対しては凝集活性を示さなかった。それに対して，CFL-II はヒト A 型，B 型，AB 型，O 型全ての血液型の赤血球を凝集させたが，ニワトリ赤血球に対しては凝集活性を示さなかった。2 種レクチンは異なる凝集活性を示したことから，糖鎖アレイ分析により詳細な糖鎖結合特異性を解析した。その結果，予想と反して，2 種レクチンはいずれも A 型抗原糖鎖のみに特異的に結合活性を示すことが明らかとなった。従って，CFL-II が引き起こす ABO 全ての血液型の赤血球凝集には，A 型抗原糖鎖とは異なるリガンドが関与していると推察された。CFL-II は Lys を 3~4 残基有していることから，還元 CM 化後，リジルエンドペプチダーゼ消化によるペプチド調製と精製を試みている。また，CFL-II の遺伝子解析については，ミルから RNA を抽出し，3’-RACE 法により cDNA を合成後，N 末端アミノ酸配列を利用した PCR により TA クローニングを行っている。

Lectin, Green algae, A antigen

講演番号：2F11a02
講演日時、会場：3 月 27 日 09:11～ F 校舎 11 会場

中枢性 Sirt1 による食餌嗜好性制御機構の解析

Sirt1 in the central nervous system regulates food preference

○松居 翔、佐々木 努、橋本 博美、小林 雅樹、北村 忠弘 (群馬大生調研)
○Syo MATHUI, Tsutomu SASAKI, Hiromi HASHIMOTO, Masaki KOBAYAASHI, Tadahiro KITAMURA (Gunma Univ.)

【目的】
我が国では、肥満の増加とそれに伴ったメタボリックシンドロームとその関連疾患の増加が大きな社会問題となっている。肥満の原因の一つに過食が挙げられる。過食は、摂食調節機構が破綻することで引き起こされる。摂食には、生命機能を維持するための摂食と、食事の美味しさに主に誘導される嗜好性に基づく摂食がある。これまでに当研究室では、視床下部のSirt1が、摂食抑制、エネルギー消費増加により体重を減らす作用、レプチン感受性やインスリン感受性を改善する作用を有することを明らかにしている。他方、食嗜好性とSirt1の関連性については不明である。そこで本研究では、中枢性Sirt1による食餌嗜好性制御機構を検討した。
【方法】
神経特異的 Tau-Cre マウスと Rosa26-Sirt1 マウスもしくは、Sirt1-flox マウスを交配し、神経特異的 Sirt1 過剰発現マウス(NS-KI)およびノックアウトマウス(NS-KO)を作製した。野生型マウス(WT)、NS-KI、NS-KO で食餌選択試験[普通食(NC) vs. 高脂肪食(HFD)、NC vs. 高ショ糖食(HSD)]を行った。さらに、WT と NS-KI を NC もしくは HFD で 3 日間飼育後に、食餌嗜好性関連因子の脳内発現を解析した。また、視床下部細胞株で Sirt1 の過剰発現・ノックダウンを行い、in vivo で変動した因子の発現への影響を検討した。
【結果・考察】
食餌選択試験では、NS-KI は、HFD 摂食量の増加と HSD 摂食量の減少傾向を示した。他方、NS-KO は、HSD 摂食量の増加傾向を示した。食餌嗜好性関連因子の発現解析では、NS-KI の視床下部で、ドパミンの合成に関わる Tyrosine hydroxylase(Th)と、ドパミンの再取り込みに関わる Dopamine transporter(Dat)の発現が抑制され、Oxytocin(Oxt)の発現が増加していた。また、細胞株でも Sirt1 過剰発現により Th、Dat 発現の抑制、Oxt 発現の増加を、ノックダウンではその逆の結果が得られた。これまでに、ドパミンシグナルは脂質嗜好性を促進させ、オキシトシンシグナルはショ糖嗜好性を抑制することが知られている。すなわち、中枢性の Sirt1 は、ドパミンとオキシトシンシグナルを介して食餌嗜好性を調節している可能性が示唆された。

Sirt1, Dopamine, Oxytocin

講演番号：2F11a03
講演日時、会場：3 月 27 日 09:22～ F 校舎 11 会場

摂食行動における LGR4 の機能解析

The function of LGR4 in feeding behavior

○大塚 彩乃[1]、平岡 優一[1]、下村 健寿[2]、西森 克彦[1] ([1]東北大農、[2]福島医大)
○AYANO OTSUKA[1], YUICHI HIRAOKA[1], KENJU SHIMOMURA[2], KATSUHIKO NISHIMORI[1]
([1]Tohoku Univ., [2]Fukushima med Univ.)

Lgr4(leucine-rich repeat containing G protein coupled receptor 4)は 7 回膜貫通型 GPCR と共通の構造を持つ膜受容体であり、様々な器官に発現している。R-spondin をリガンドとし、Wnt/β-catenin シグナルを増強する機能を持つ。近年、Lgr4 がラットの脳視床下部において、摂食行動に関わる領域である弓状核、腹内側核、正中隆起に発現し、摂食抑制やエネルギー代謝制御に関与する可能性が示された。この報告における、インスリンの脳室内投与により R-spondin の発現量が増加したという結果から、我々は、Lgr4 がインスリンからの制御を受け活性化し、Wnt シグナルを介して摂食抑制やエネルギー代謝制御に関与していると考え、解析を行った。

Lgr4 欠損マウス(Lgr4-/-)は胎生致死または新生児致死を示す。そのため、Lgr4 をヘテロで欠損させた Lgr4 flox/-マウスを用いた。このマウスの弓状核または腹内側核に AAV-Cre ベクターを導入することにより、弓状核特異的 Lgr4 ノックダウンマウスおよび腹内側核特異的 Lgr4 ノックダウンマウスを作成した。これらのマウスについて摂食量および運動量を測定した。

弓状核特異的 Lgr4 ノックダウンマウスでは、摂食量の増加に伴う体重の増加が見られた。腹内側核特異的 Lgr4 ノックダウンマウスでは、摂食量は変化せず体重のみ増加した。また、Lgr4-EGFP マウスを用いて、通常時、絶食時、再摂食時について神経活性化マーカーである c-Fos の発現量を比較した。その結果、再摂食時に弓状核において Lgr4 発現ニューロンの活性化が観察された。

これらの結果から、弓状核の Lgr4 は摂食抑制を、腹内側核の Lgr4 はエネルギー代謝制御を担っていることが示唆された。この結果は、Lgr4/Wnt 経路の新たな役割を示したものである。

Lgr4

講演番号：2F11a04
講演日時、会場：3 月 27 日 09:33～ F 校舎 11 会場

持久運動時の脳報酬系機能に関する研究

Studies on mechanism of reward system during endurance exercise

○石井 仁、横山 小夜香、井上 和生、伏木 亨（京都大農）
○Hitoshi ISHII, Sayaka YOKOYAMA, Kazuo INOUE, Tohru FUSHIKI (Kyoto Univ.)

【目的】　近年の研究により、持久運動時に側坐核（NAc）においてドーパミン（DA）レベルが上昇することが報告されており、持久運動によって報酬系が活性化することが示唆された（Wilson WM. Et al. 1995, 横山 日本栄養・食糧学会発表 2014)。報酬系における DA は報酬を得ようとする動機付けに深く関与しているとされている。持久運動時の NAc DA レベル上昇について、その生理的意義は明らかになっていないが、走行する動機付けもしくはその維持に関与している可能性がある。そこで本研究では持久運動時の NAc shell における神経活動を検討し、運動意欲がどのように形成されるのかを神経科学的に明らかにする。

【方法】　7 週齢の雄性 SD ラットの NAc shell または腹側被蓋野（VTA）にカニューレ設置手術を行った。15 m/min、傾斜 3°、60 分間のトレッドミル走行を課した時の NAc shell における神経活動の動態を In vivo microdialysis 法を用いて測定した。

報酬系は VTA のμオピオイド受容体によって脱抑制を受けることが報告されている。μオピオイド受容体のアンタゴニスト、naloxonazine(0, 1, 10μg/side)を VTA 両側に投与し上記の条件で走行させ、NAc shell における神経活動の動態を調べた。これにより、持久運動時の NAc shell における DA レベル上昇と報酬系の関与の検討を行った。

また強度を変えて走行を負荷し（10, 15, 20 m/min)、走行強度と DA レベル変化の関係を調べた。これにより、DA レベルが上昇する生理的意義の解明を行った。

【結果と考察】　持久運動時、NAc shell における DA レベルは有意に上昇したが、VTA におけるμオピオイド受容体を阻害した時、抑制される傾向にあった。また、走行を忌避するラットが増加した(10μg/side 投与時、n=17 中走行を完了したもの n=5)。これより、持久運動時に報酬系が活性化していることが示唆された。

10 m/min の走行強度を一定負荷した時、DA レベルの動態は 15 m/min 一定負荷時と同様の傾向を示した。また、20 m/min の走行強度を一定負荷した時、DA レベルの動態は 15 m/min 一定負荷時に比して高く維持される傾向が示された。これより走行強度依存的に DA レベルが上昇することが示され、報酬系の DA 神経活性化が走行する動機の維持に関与していることが示唆された。

reward system, endurance exercise, in vivo microdialysis

講演番号：2F11a05
講演日時、会場：3 月 27 日 09:44～ F 校舎 11 会場

脳内自己刺激を用いた中枢性疲労の新規測定法確立とその応用

Development of a new method for determination of central fatigue with Intracranial self-stimulation(ICSS)

○井樋 聡美、井上 和生、伏木 亨（京大農）
○Satomi IHI, Kazuo INOUE, Tohru FUSHIKI (Kyoto Univ.)

【背景と目的】運動や精神的ストレスなど身体の恒常性を乱すような負荷がかかると、肉体的な疲労と共に脳で疲労感、すなわち中枢性疲労が発生する。疲労は様々な要素が複合して発生するため、中枢性疲労のみの疲労度を定量的に測定することは困難とされていた。中枢性疲労発生時の主な症状として「行動する意欲の低下」が挙げられる。当研究室ではこの意欲の低下に着目し、Intracranial self-stimulation(ICSS, 脳内自己刺激)を用いて定量的な中枢性疲労の疲労度測定系構築を試みてきた。ICSS はオペラント行動の一種であり、ラットがレバーを叩くと脳内報酬系に設置した電極を通して電流が流れる。これにより脳内報酬系が活性化、ラットはこの電気刺激を快感として捉え刺激を求め自発的にレバーを叩くようになる。このレバー叩き行動を快感を得ようとする意欲の表れとみなし、疲労負荷前後での意欲の変化を測定するものである。その結果、トレッドミル走行により肉体的負荷を課したときとコミュニケーションボックスにより精神的ストレスを課した時の両方で ICSS が中枢性疲労の測定法として応用できることが示唆された(2013 年度本学会において報告)。よって、本研究ではこの ICSS を新たな疲労度の指標として用い、中枢性疲労の発生メカニズムを解明すると共に、中枢性疲労の軽減作用を有する食品成分の探索を行った。
【方法】雄性 Wistar ラットの内側前脳束に電極設置手術を行い、ICSS 試験に供した。ICSS 試験においてはレバー叩き回数と与えた電気刺激強度から算出される脳報酬閾値の変化をみることで中枢性疲労の疲労度を測定した。傾斜角 3°、15m/min で 30 分間トレッドミル走行を課すことにより肉体的消耗を引き起こし、その前後での脳報酬閾値を算出、比較した。また、各種神経伝達物質の再取り込み阻害剤および受容体遮断薬を走行前に腹腔内投与し、これらの物質の作動性神経が中枢性疲労に及ぼす影響について検討した。投与物質と投与量は以下の通りである ; nomifensine 2mg/kg, imipramine 10mg/kg, diazepam 2mg/kg, citaropram 20mg/kg, haloperidol 0.5mg/kg, nor-binaltorphimine 10mg/kg。食品成分については、強制胃内投与により単回摂取させた。
【結果と考察】トレッドミル走行により肉体的消耗を引き起こすと、走行負荷前に比して負荷後で有意に脳報酬閾値が上昇し、行動する意欲が低下していることが示された。また、各薬品については自発行動量に及ぼす効果が既に報告されているが、ICSS においてもそれを支持するような結果が得られ、疲労様行動の発生に関与する作動性神経が明らかとなった。食品成分については各種ビタミンや有機酸等を用いて検討中である。

Intractranial self-stimulation, central fatigue, exercise

講演番号：2F11a06
講演日時、会場：3 月 27 日 10:05～ F 校舎 11 会場

カプサイシンがマウスの行動量へ与える影響

Effect of capsaicin on activity of mice

○天明 裕介[1]、今井 真介[1]、池田 祐子[2]、栗城 大輔[2]、鎌形 真世[2]、三澤 憲一郎[2]、柴田 重信[2] ([1]ハウス食品グループ本社、[2]早稲田大・先進理工)
○ YUSUKE TEMMEI[1], SHINSUKE IMAI[1], YUKO IKEDA[2], DAISUKE KURIKI[2], MAYO KAMAGATA[2], KENICHIRO MISAWA[2], SHIGENOBU SHIBATA[2] ([1]House Foods Group Inc., [2]Waseda Univ.)

【目的】

我々は「動物を活動的にする食品」を探索しており、今回その候補として、マウスの持久力を向上する報告がなされているカプサイシンの効果を確認した。近年、「時間栄養学」の概念が提唱され、同じ食品を摂取しても、タイミングが適切でないと、それが代謝異常や肥満の原因になる事が報告されている。そこで、投与タイミングの影響も調べた。投与したサンプルがマウスの行動量に及ぼす効果を評価する実験系の構築も含めて報告する。

【方法】

●評価系の構築及びカプサイシンの行動量増加効果確認

① ICR マウスと C57BL/6 マウス（12 週齢・オス）の 2 系統のマウスをそれぞれ 6 匹ずつ、7 日間飼育した。その間の行動量を輪回しにて測定し、1 日の行動量のバラつきを評価した。マウスの飼育は L:D=12:12 の明暗条件下、自由摂食にて行った。

② サンプル投与時の行動量の測定方法は、輪回しと赤外線センサーの 2 方法を検討した。投与前の行動量を 7 日間測定した後、7 日間連続でカプサイシン溶液（10 mg/kg body weight）またはコントロール（溶媒）を、活動期である暗期の開始直前に強制経口投与した。輪回しは全 10 匹、赤外線センサーは全 8 匹のクロスオーバー試験で評価した。

●カプサイシンの投与タイミングが行動量へ与える影響の評価

③ 安静期である明期の開始直後にカプサイシン溶液またはコントロールを強制経口投与し、行動量に及ぼす影響を調べた。これを、活動期直前にカプサイシンを投与した場合と比較した。

【結果】

① C57BL/6 マウスの方が ICR マウスより 1 日の総行動量が安定していたので、C57BL/6 マウスを評価系の構築に用いることにした。

② 輪回しでの測定では、カプサイシンを暗期の開始直前に投与した時に有意な行動量増加が検出できた。赤外線センサーでは有意な行動量増加は確認できなかったため、カプサイシンは「自発的な活動」を増加させる効果があると示唆された。

③ 安静期である明期の開始直後にカプサイシンを投与しても、行動量は増加しなかった。カプサイシンは投与するタイミングによって行動量への効果が異なることが示唆された。

capsaicin, activity, mice

講演番号：2F11a07
講演日時、会場：3 月 27 日 10:16～ F 校舎 11 会場

内側扁桃体 GABA ニューロンにおけるオキシトシン受容体欠損は、社会性認知とシナプス構造に異常を引き起こす

Oxtr expressed in GABA neurons at the MeA are suspected to control social memory.

○宮崎 慎至、平岡 優一、日出間 志寿、西森 克彦（東北大農）
○shinji MIYAZAKI, yuichi HIRAOKA, shizu HIDEMA, katsuhiko NISHIMORI (Tohoku Univ.)

OXT/OXTR システムは哺乳類脳内において社会記憶などの社会行動を支持することが知られている。Oxtr 欠損マウスは社会記憶をコントロールする神経回路メカニズムを明らかとするための有用なモデルとして考えられており、我々はどの領域のニューロンにおける OXTR の欠損が社会記憶障害に関わっているのか解析を行ってきた。免疫組織科学的解析により、社会記憶誘発時に内側扁桃体において Oxtr 発現ニューロンの活性化が確認された。この結果は社会記憶には内側扁桃体での Oxtr 発現が重要であることを示唆している。次にどのニューロン種に発現する Oxtr が社会記憶に重要であるか解析を行った。過去の報告によって、GABA ニューロンの機能不全が OXTR 欠損と同様の社会認知欠損を引き起こすという報告がなされていたことから、GABA ニューロンに発現する OXTR が社会記憶に重要な役割を果たしていると仮定した。そこで内側扁桃体において GABA 合成酵素である GAD67 と OXTR の共発現を確認したところ、GABA ニューロンの約 30%で OXTR が発現していることが示された。次に GABA ニューロン特異的に Cre を発現する Vgat-IRES-cre マウスを導入し、我々の作製した Oxtr fx/fx マウスと交配させて GABA ニューロン特異的に OXTR を欠損させたマウス(Vgat-IRES-cre;Oxtr fx/fx マウス)を作出し、社会行動試験を行った。その結果、野生型マウスと比較してこのマウスでは社会記憶の異常が確認された。これは GABA ニューロンに発現する OXTR が社会記憶制御に必要であることを示した結果である。

oxytocin, GABA, social behavior

講演番号：2F11a08
講演日時、会場：3 月 27 日 10:27～ F 校舎 11 会場

単独隔離ストレス負荷は睡眠期の血中コルチコステロン分泌を高める

Social isolation stress enhanced corticosterone secretion during inactive phase in mice

○下位 香代子[1,2]、青島 良輝[2]、榊原 啓之[3] ([1]静岡県大食品栄養、[2]静岡県大大学院生活健康、[3]宮崎大農)
○Kayoko Shimoi[1,2], Yoshiki Aoshima[2], Hiroyuki Sakakibara[3] ([1]Univ. Shizuoka, Sch. Food Nutri. Sci., [2]Univ. Shizuoka, Grad. Sch. Food Nutri. Sci, [3]Univ. Miyazaki, Sch. Agric.)

【目的】現代人は多様な社会的ストレス要因が氾濫した環境中で生活しており、多様なストレス負荷により生命現象がかく乱され続けると、精神疾患のみならず肥満などの生活習慣病が惹起されると考えられている。その予防策を確立するためには、ストレス負荷時の生体応答についての詳細な情報の集積が必要不可欠である。我々は先行研究において、床敷を減らした単独隔離条件下でマウスを飼育すると、急性期（2 日間）では代表的なストレス応答ホルモンであるコルチコステロンの血中への分泌量が増加し、30 日後には肝臓の脂質代謝系がかく乱され、さらに 90 日後には内臓脂肪蓄積型の肥満が惹起されることから、本モデルが慢性的なストレス負荷時の生体応答を追跡できるモデルとして有効であることを報告している。本研究では、ストレス負荷とは無関係に血中への分泌量が明確な日周リズムを刻んでいるコルチコステロンを指標として、単独隔離ストレスに対するストレス応答が時間帯により異なるか否かについて追跡した。

【方法】雄性 C57BL/6 マウスに対し、単独隔離ストレスを 2 日間負荷した。ZT6（明期の中間）、ZT12（暗期の初期）、ZT18（暗期の中間）、ZT0（明期の初期）、ZT6 の 5 地点で血漿および肝臓を採取し、血漿コルチコステロンと肝臓中時計遺伝子の発現量を測定した。

【結果】1 群 5 匹で飼育したコントロール群の血漿コルチコステロンが ZT12 に高まり、ZT0 に低下する明確な日周リズムを刻んでいることを確認した。単独隔離ストレス群の血漿コルチコステロンも同様のリズムを示した。また、生命現象が刻む様々な日周リズムを制御している時計遺伝子（*Bmal1*、*Clock*、*Per1*）の肝臓における発現リズムにも、両群間で明確な差異は認められなかった。一方、ストレス負荷群のコルチコステロン量はコントロール群と比較して睡眠期（ZT6 および ZT12）に顕著に増加するが、覚醒期（ZT18 と ZT24）ではむしろ低下傾向を示した。これらの結果より、単独隔離ストレス負荷はストレス応答性ホルモンであるコルチコステロン分泌の日周リズムの周期には作用しないが、睡眠期における振幅を上昇させることが明らかとなった。

isolation stress, cortisol, circadian rhythm

講演番号：2F11a09
講演日時、会場：3 月 27 日 10:38～ F 校舎 11 会場

オオカミ尿中のピラジン化合物はエゾシカの警戒行動誘発因子である

Pyrazine analogs are active components of wolf urine that induce vigilance behaviors in Hokkaido deer

○長田 和実[1]、宮園 貞治[2]、柏柳 誠[2]([1]北海道医療大、[2]旭川医大)
○Kazumi OSADA[1], Sadaharu Miyazono[2], Makoto Kashiwayanagi[2] ([1]Health Sciences Univ. of Hokkaido, [2]Asahikawa Medical College)

以前の研究より、オオカミ尿中より見出された一群のピラジン化合物はマウスに対して忌避、警戒行動を引き起こすことを報告した。これらピラジン化合物の混合物（P-mix）がエゾシカ（Cervus nippon yesoensis）に及ぼす影響を確かめるために、西興部（北緯 44° 12′ 東経 142° 48′）にあるシカ牧場（総面積 9 ha）にてフィールド行動実験を行った。一連の行動実験は 2013 年 8 月と 9 月に 2 度にわたり実施した。エゾシカの食餌エリアへの接近は、P-mix のにおい発生器を設置することにより未設置の食餌エリアに比べ効果的に抑制された。それに加え P-mix のにおいは、尾を立てる、餌場から飛び退く、等のシカ特有の警戒行動を有意に多く誘発した。本実験結果は、オオカミ尿中より見いだされた P-mix のにおいが、マウスの場合と同様にエゾシカに対しても警戒行動を誘発することを示しており、偶蹄類による森林、農地への侵襲を防ぐ有効な手段となる可能性を示唆している。

Wolf urine, Pyrazine, Deer

講演番号：2F11a10
講演日時、会場：3 月 27 日 10:49～ F 校舎 11 会場

変形性膝関節症動物モデルの歩行解析

Development of evaluation method of Osteoarthritis state in STR/Ort mice

○野村 義宏[1]、中島 正博[1]、上濱 春佳[1]、渡部 睦人[1]、松田 研史郎[2]、田中 あかね[2]、松田 浩珍[2]([1]農工大農・硬蛋研、[2]農工大農・共同獣医)
○Yoshihiro NOMURA[1], Masahiro NAKASHIMA[1], Haruka KAMIHAMA[1], Mutsuto WATANABE[1], Kenshirou MATSUDA[2], Akane TANAKA[2], Hiroshi MATSUDA[2] ([1]Tokyo Unv. Agri. and Technol., [2]Tokyo Univ. Agri. and Technol.)

【目的】　変形性膝関節症（knee osteoarthritis: 膝 OA）は、運動機能低下をきたす代表的な疾患の一つであり、筋力低下、加齢、肥満などのきっかけにより膝関節の機能が低下し、関節軟骨の摩耗と変性、関節辺縁にみられる増殖性変化(骨棘形成)を起こし炎症による痛みを伴う病気である。４０歳以上の男女の６割が罹患しているという報告もあり、患者数は約７００万人にのぼる関節疾患の中で頻繁に見られる疾患である。膝 OA に対しては運動療法が主であり、種々の機能性食品素材の評価に対して、症状の改善を指標とする適切な病態動物モデルの標準化が望まれている。そこで本研究では、自然発症型膝 OA 病態モデル動物である STR/Ort マウスを用いて、歩行解析と OA 病態評価を行った。

【実験方法】　「GAIT 歩行解析システム®」を用いて STR/Ort マウスの歩行分析を行った。本システムは、モーターで回転するランニングホイール内を歩行するマウスを高速カメラにより撮影し、左右後肢をトラッキングして swing time（足がホイールから離れている時間）を測定し、1 完歩ごとの swing time の左右比から歩行の異常を数値化する方法である。STR/Ort マウスは両側性の膝 OA モデル動物であるため、歩行解析では swing time index(STI)の標準偏差を用いることにより歩行のばらつきを評価した。膝 OA 発症群として雄 STR/Ort マウスを、非発症群として雌 STR/Ort マウスおよび BALB/c マウスを用いて、12 週齢から 40 週齢まで測定を行った。それと合わせて後肢膝関節の軟 X 線像の撮影を行った。

40 週齢時において歩行分析後に解剖を行い、両後肢を採取した。また、膝関節組織標本作製のため、両後肢膝関節を固定し組織切片を作製した。組織標本は、ヘマトキシリン・エオシン染色およびサフラニン-O 染色を行い、Mankin 法および OARSI 法に従ってスコア化した。

【結果および考察】　歩行分析により、STR/Ort マウスの膝 OA 発症週齢とされる 28 週齢～40 週齢において、非発症群と比較して膝 OA 発症群で STI の標準偏差に有意差が認められたことにより、歩行のばらつきが確認された。また、軟 X 線画像においても非発症群と比較して、膝 OA 発症群において膝関節の異常(石灰化)が観察された。以上の結果から、STR/Ort マウスにおける GAIT 歩行解析システムにより、食品素材がもつ膝 OA に対する予防効果を判断できる可能性が示唆された。

Osteoarthritis, STR/Ort mice, GAIT alalysis

講演番号：2F11a11
講演日時、会場：3 月 27 日 11:10～ F 校舎 11 会場

エストロゲン受容体βアゴニストであるダイゼインはエストロゲンによる筋重量減少を抑制する

The estrogen receptor ß agonist daidzein attenuates estrogen-induced decrease in skeletal muscle mass in female mice.

○小川 真弘、原田 直樹、山地 亮一（大阪府大院・生命環境）
○Masahiro OGAWA, Naoki HARADA, Ryoichi YAMAJI (Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Life Environ., Osaka Pref. Univ.)

【目的】骨格筋は運動器としての役割以外に糖質あるいは脂質の代謝も担い、生命活動に重要な機能を果たしている。座骨神経切除やグルココルチコイド投与によって骨格筋が萎縮するとき、脱ユビキチン化酵素 USP19 の発現が亢進することから、USP19 は筋萎縮関連遺伝子と位置づけられている。我々はこれまでにメスマウスにおいて女性ホルモンである 17β-エストラジオール（E2）がエストロゲン受容体（ER）αを介して脱ユビキチン化酵素 USP19 の発現を増加させ、筋重量を減少させることを見いだしている。E2 のゲノミックな作用は、E2 が結合して活性化した ER が標的遺伝子のプロモーター/エンハンサー領域に存在するエストロゲン応答配列（ERE）に結合し、標的遺伝子の発現を調節することによって顕現化する。ER には２つのアイソフォーム（ERαと ERβ）が存在し、ERαと ERβは拮抗的に作用する。そこで本研究では、ERβアゴニストであるダイゼインを用いて、ERβが USP19 の発現を抑制して骨格筋量調節に寄与するのかについて評価した。
【方法・結果】筋芽細胞株 C2C12 細胞を筋管細胞に分化させた後、E2 とダイゼインによる USP19 発現に及ぼす影響を検討した。E2 は USP19 の発現を上昇させ、ダイゼインはその発現を抑制した。USP19 遺伝子を解析したところ、USP19 のイントロン 1 に ERE の半分の領域を持つ half-ERE が存在していたので、E2 またはダイゼインの存在下で培養した筋管細胞から DNA を抽出し、クロマチン免疫沈降法で解析した。その結果、USP19 遺伝子の half-ERE 上で、E2 により増加した ERα の結合量はダイゼインの濃度に依存して減少したのに対して、ERβの結合量がダイゼインに依存して増加したことから、half-ERE 上で ERβと ERαは競合的に結合することが判明した。卵巣摘出（OVX）マウスに E2 を投与すると USP19 の発現は上昇するが、OVX マウスに 1 週間ダイゼインを 0.1%含む餌を摂取させると E2 による USP19 の発現上昇と筋量の減少が抑制された。クロマチン免疫沈降法により、骨格筋においてもダイゼインは E2 によって亢進した ERαと half-ERE の結合を減少させ、ERβと half-ERE との結合量を増加させることがわかった。生理的条件下でメスマウスに 1 週間ダイゼインを 0.1%含む餌を摂取させたところ、USP19 の発現量が減少し、筋量が増加したが、オスマウスでは筋量に及ぼすダイゼイン摂取の影響はなかった。さらにメスマウスの骨格筋での ERβをノックダウンさせることで、ダイゼインによる USP19 の発現量減少と筋量の増加は消失した。以上より、メスマウスにおいてダイゼインのような ERβアゴニストは E2 による USP19 の発現亢進を抑えることで、骨格筋量を維持・亢進することが判明した。

skeletal muscle, daidzein, ubiquitin-specific peptidase 19

講演番号：2F11a12
講演日時、会場：3 月 27 日 11:21～ F 校舎 11 会場

間葉系幹細胞から骨芽細胞への Wnt シグナルによる分化制御

Differentiation of mesenchymal stem cells into osteoblasts by Wnt-mediated pathway

○田中 牧[1]、谷口 実由紀[1]、鬼丸 祐二[1]、鋳方 綾香[1]、細田 明美[2]、金 東浩[1]、佐伯 茂[1] ([1]大阪市大・院生活科学・生体情報、[2]東京医療保健大・医療栄養)
○Maki TANAKA[1], Miyuki TANIGUCHI[1], Yuji ONIMARU[1], Ayaka IKATA[1], Akemi HOSODA[2], Dong-Ho KIM[1], Shigeru SAEKI[1] ([1]Lab.of Mol. Biochem. Nutr.,Osaka City Univ., [2]Faculty of Healthcare, Tokyo Healthcare Univ.)

【目的】骨髄に存在する間葉系幹細胞は，骨芽細胞や脂肪細胞など多様な細胞種に分化する能力を有する。しかし，糖尿病，肥満症，骨粗鬆症などの病態では分化のバランスが破綻し，骨芽細胞の分化が抑制され，脂肪細胞の分化が亢進する。分泌性糖タンパク質 Wnt は間葉系幹細胞の分化に大きく関与し，骨芽細胞への分化を誘導し，脂肪細胞への分化を抑制する。Wnt ファミリーには 19 種が知られ，線虫やショウジョウバエから哺乳類に至るまで生物種を超えて広く保存されている。Wnt によって活性化されるシグナル経路は，canonical 経路と non-canonical 経路に大別される。canonical 経路は，Wnt が Wnt の受容体 Frizzled と共受容体 LRP5/6 に結合すると，β-catenin が GSK3β によるユビキチン化を受けずに核内に移行して TCF を活性化する経路である。一方，non-canonical 経路は，Wnt が Wnt の受容体 Frizzled に結合するシグナル経路であり，この経路はβ-catenin 非依存的な経路であると考えられている。本研究では，間葉系幹細胞の骨芽細胞への分化機構に果たす canonical 経路と non-canonical 経路の役割について検討した。
【結果と考察】マウス骨髄由来間葉系細胞である ST2 細胞は，canonical 経路を活性化する Wnt3a で培養すると，TCF 活性が亢進し，骨芽細胞に分化した。一方，ST2 細胞は，non-canonical 経路を活性化する Wnt5a で培養しても骨芽細胞に分化しなかった。Wnt3a による骨芽細胞への分化は，細胞質でのβ-catenin のユビキチン化を誘導する GSK3β の阻害剤，核内でのβ-catenin/TCF 結合の阻害剤，およびβ-catenin siRNA によって抑制された。これらの結果は，Wnt3a による骨分化は，canonical 経路を介する TCF の活性化によって誘導すると考えられた。しかし，Wnt3a 非存在下で，GSK3β によるユビキチン化を受けない活性型β-catenin をトランスフェクションすると TCF 活性は亢進したが，ST2 細胞は骨芽細胞に分化しなかった。以上のことから，ST2 細胞から骨芽細胞への分化には，canonical 経路を介する TCF の活性化以外の因子が関与すると推定された。

Wnt, Osteoblast

講演番号：2F11a13
講演日時、会場：3 月 27 日 11:32～ F 校舎 11 会場

Pd ナノコロイドは酸化劣化による Pt ナノコロイドの SOD/カタラーゼ活性減少を抑制する

Pd nanoparticles suppress oxidative deterioration of SOD and catalase activity of Pt nanoparticles

○澁谷 修一[1]、小澤 裕介[1]、横手 幸太郎[2]、清水 孝彦[1]([1]千葉大院医 先進加齢医学、[2]千葉大院医 細胞治療内科学)
○Shuichi Shibuya[1], Yusuke Ozawa[1], Koutaro Yokote[2], Takahiko Shimuzu[1] ([1]Dept. of Adv. Aging Med., Chiba Univ. Grad. Sch. of Med., Japan, [2]Dept. of Clinic. Biol. and Med., Chiba Univ. Grad. Schi. of Med., Japan)

活性酸素制御は生体機能の維持に重要であり、酸化ストレスは加齢性疾患の発症に強く関与する。安全性が高く活性酸素消去活性を持つ物質は加齢性疾患の予防や治療への応用に期待できる。貴金属ナノコロイドは水素付加、水和作用、酸化活性があり、その表面積の大きさにより強い触媒作用を有する。日本において、白金(Pt)およびパラジウム(Pd)ナノコロイド混合溶液(PAPLAL)が火傷、凍傷、蕁麻疹、肺炎などの様々な疾患に対する治療薬として 60 年以上もの間使用されてきた。Pt および Pd ナノコロイドの平均粒径はそれぞれ約 1.9 nm、3.6 nm とごく小さい粒径を呈する。特に Pt ナノコロイドは強い抗酸化活性を有するが、Pd ナノコロイドの抗酸化活性については報告例がない。本研究では PAPLAL の抗酸化活性を調べ、さらに酸化障害に起因する皮膚萎縮改善効果を調べた。まず PAPLAL に含まれる Pd および Pt ナノコロイドの抗酸化活性を調べた。結果、Pt ナノコロイドの SOD 活性は 1 mM あたり 2,142 ± 423 U、カタラーゼ活性は 69 ± 16 U であり、SOD/カタラーゼ模倣物質であることが示された。一方、Pd ナノコロイドの SOD 活性は 1 mM あたり 77 ± 12 U、カタラーゼ活性は 6 ± 3 U であり、僅かな活性のみ有していた。Pt ナノコロイドの抗酸化活性は常温での空気酸化により有意に減少したが、Pt ナノコロイドに 3 倍モル量の Pd ナノコロイドを加えた混合液は抗酸化活性が有意に保持された。次に、加齢様の皮膚萎縮を呈する SOD1 欠損マウス背面皮膚へ 4 週間 PAPLAL を経皮投与し、皮膚厚を調べた。その結果、SOD1 欠損マウスの表皮および真皮層の厚さが有意に正常化し、かつ皮膚中の過酸化脂質も有意に減少した。さらに PAPLAL 投与は皮膚での *Col1a1* および *Has2* 遺伝子発現が有意に増加し、細胞外基質増加が示唆され、*Tnf-α*、*Il-6*、*p53* 遺伝子発現も正常化した。また、老齢 C57BL/6 マウス皮膚の創傷に PAPLAL を 12 日間経皮処理したところ、有意に治癒速度が速まった。以上の結果から、Pd ナノコロイドは Pt ナノコロイドの SOD/カタラーゼ活性の酸化劣化を防ぎ、PAPLAL は安定した抗酸化活性により酸化障害と皮膚病態を改善することが明らかになった。

nanoparticles, antioxidant, skin atrophy

講演番号：2F11a14
講演日時、会場：3 月 27 日 11:43～ F 校舎 11 会場

アルツハイマー認知症患者の血液における脂質レベルの変化
Changes of lipid levels in Plasma and Red Blood Cells of alzheimer's Disease Patients
○山下 慎司[1,2]、喜古 健敬[2]、仲川 清隆[2]、荒井 啓行[3]、宮澤 陽夫[2,4]([1]帯畜大、[2]東北大院農、[3]東北大医、[4]東北大未来技セ)
○Shinji Yamashita[1,2], Takehiro Kiko[2], Kiyotaka Nakagawa[2], Hiroyuki Arai[3], Teruo Miyazawa[2,4]([1]Obihiro Univ. of Agriculture and Veterinary Medicine, [2]Graduate School of Agricultural Science, Tohoku Univ., [3]Institure of Development, Aging and Cancer, Tohoku Univ., [4]NICHe, Tohoku Univ.)

背景

高齢化の進む日本においてアルツハイマー型認知症（AD）の罹患率の増加は大きな社会問題となっている。その病理学的特徴として神経の欠落による脳の委縮が挙げられる。そのため、不可逆的であり、AD の早期発見・早期治療が重要となる。当研究室ではこれまでに AD 患者の赤血球中で過酸化リン脂質が増加すること[1)]、また AD の原因と考えられるアミロイドβが赤血球に蓄積しリン脂質の過酸化を誘導すること[2) 3)]を明らかにした。一方、エーテル型のリン脂質であるプラズマローゲンが AD の脳で特異的に減少することが報告されている。本研究では、AD 患者の血液における過酸化リン脂質、プラズマローゲンおよび脂肪酸を分析し、健常者との比較を行った。

方法

対象はボランティアである AD 患者とその健常配偶者（control）とした。AD 患者はミニメンタルテスト(MMSE)によりその進行度合を判断した。採取した血液から遠心分離により血漿と赤血球を得た。血漿は Folch 法に従い、赤血球はゴーストを作製したのちクロロホルムとイソプロパノールを用い脂質抽出を行った。過酸化脂質は化学発光 - HPLC、プラズマローゲン分子種は LC-MS/MS の multiple reaction monitoring モードにより定量した。脂肪酸およびプラズマローゲンの一位由来のアルデヒドは酸性条件下でメチル化後ガスクロマトグラフィーにより定量した。

結果

AD 患者では control に比べ、血漿中のプラズマローゲンレベルが有意に減少した。赤血球中では、過酸化リン脂質が有意に増加し、プラズマローゲンレベルが減少した。AD 患者を MMSE で重・中度と軽度に分け、control との３群で比較をした。血漿では AD の進行により DHA をもつプラズマローゲンの減少がみられた。赤血球では過酸化リン脂質の増加とプラズマローゲンレベルの減少がみられた。

1) Miyazawa T et al. Oxygen Radicals (1992)
2) Nakagawa K et al. FEBS Lett (2011)
3) Nakagawa K et al. Biosci Biotechnol Biochem (2011)

Alzheimer's disease, phospholipid hydroperoxides, plasmalogen

講演番号：2F11p01
講演日時、会場：3 月 27 日 14:00～ F 校舎 11 会場

食餌誘導性肥満モデルマウスにおける系統間の比較

Comparison of diet-induced obesity in the different mice strain.

○江口 輝[1]、船戸 里香[1]、大村 妃[2]、小林 裕[2]、中永 真樹[2]、林 浩和[2]、本山 陽菜[2]、細野 崇[1,2]、関 泰一郎[1,2] ([1]日本大院生資科、[2]日本大生資科)
○Akira Eguchi[1], Rika Funado[1], Hisaki Omura[2], Yu Kobayashi[2], Maki Nakanaga[2], Hirokazu Hayashi[2], Haruna Motoyama[2], Takashi Hosono[1,2], Taiichiro Seki[1,2] ([1]Nihon Univ. Grad. School, [2]Nihon Univ.)

【背景】

肥満は、動脈硬化を基盤とした血栓塞栓性疾患の危険因子の一つであり、近年、ライフスタイルの変化により我が国においても肥満人口が増加している。高脂肪食をラットやマウスに給餌すると、高脂肪食と通常食間で摂取カロリー量に大きな差は無いにも関わらず、肥満やインスリン抵抗性が誘導される。しかし、高脂肪食給餌による病態形成の詳細なメカニズムは明らかとなっていない。遊離脂肪酸は、自然免疫においてウイルス・細菌の構成成分を認識する Toll 様受容体を刺激することで炎症反応が誘導されることから、免疫応答と肥満の関係について多くの研究が行われている。本研究では、高脂肪食給餌による病態形成のメカニズムの一端を解明する目的で、肥満研究に広く用いられている Th1 免疫応答が優勢な C57BL/6J マウス、Th2 免疫応答が優勢な BALB/c マウスの両者に高脂肪食を給餌し、肥満やその病態に及ぼす Th1/Th2 バランスの影響について基礎的に検討した。

【方法】

8 週齢の雄性 C57BL/6J マウス及び BALB/c マウス（日本チャールス・リバー）を 2 週間の予備飼育後、標準固型飼料(CRF-1, オリエンタル酵母)を給餌する Control 群と高脂肪食（D12492, Research Diet 社、カロリー比で 60%脂質を含有）を給餌する HFD 群に群分けした。試験食の給餌 6 週間後に経口糖負荷試験を、7 週後にインスリン負荷試験を実施した。試験開始から 8 週後に血液ならびに各種組織を回収した。

【結果】

C57BL/6J マウスと BALB/c マウスの HFD 群及び Control 群において、摂取カロリーに有意な差は認められなかった。一方、体重の増加率は C57BL/6J マウスの HFD 群と比較して BALB/c マウスの HFD 群において高かった。これらの結果から、Th1/Th2 バランスの違いによって高脂肪食負荷に対する反応が異なることが示唆された。現在、C57BL/6J マウス、BALB/c マウスの各種組織における炎症状態を中心に解析を行っている。

High fat diet, C57BL/6j, BALB/c

講演番号：2F11p02
講演日時、会場：3 月 27 日 14:11～ F 校舎 11 会場

摂食時間制限による肥満改善効果に関する研究

Studies on the ameriolation of obesity by time-restrictied feeding.

○久宮 彩乃[1]、浅井 成美[2]、香門 里菜[2]、佐々木 佳奈[2]、林 安津馬[2]、関 泰一郎[2]、細野 崇[2]([1]日本大院生資科、[2]日本大生資科)
○AYANO KUGU[1], NARUMI ASAI[2], RINA KAMON[2], KANA SASAKI[2], AZUMA HAYASHI[2], TAICHIRO SEKI[2], TAKASHI HOSONO[2] ([1]Nihon Univ. Grad. School, [2]Nihon Univ.)

【目的】

標準食給餌マウスの呼吸商は暗期(活動期)に 0.9～1.0, 明期に 0.7～0.8 を示し、暗期では主に糖質を、明期で主に脂質を燃焼していると考えられる。これに対して、高脂肪食給餌マウスの呼吸商は、明期、暗期ともに 0.7～0.8 を示し、明暗サイクルに関係なく主に脂質を代謝している。これまでに演者らは、高脂肪食給餌マウスに摂食時間制限を行うと呼吸代謝の日周リズムを改善し、肥満を抑制することを明らかにした。本研究では、一定期間高脂肪食を給餌し肥満を誘導したマウスに対して摂餌時間を制限し、その肥満改善効果について基礎的な検討を行った。

【方法】

C57BL/6J マウス 4 週齢（オス）を 2 週間予備飼育後、高脂肪食を 10 週間摂餌させて肥満を誘導した（肥満誘導期間)。10 週目以降これらのマウスを、高脂肪食を自由摂食させる群（Free access 群）と、暗期開始 8 時間だけ高脂肪食を摂食させる群（暗期 8h 群）に分け、さらに 10 週間飼育した（摂食時間制限実験)。試験期間中、摂食量と体重の測定、呼気ガス分析、経口糖負荷試験（OGTT）を行った。試験終了時に解剖し、心臓より採血後、肝臓、腎臓、膵臓、白色脂肪組織を摘出した。

【結果・考察】

摂食時間制限期間の暗期 8h 群の体重は Free access 群と比較して、有意に低値を示した。呼気ガス分析の結果、Free access 群の RER（呼吸商）は常時 0.75～0.8 であり、主に脂質を代謝していることが示された。一方、摂食時間を制限した直後の暗期 8h 群の RER は、暗期に 0.8、明期に 0.75 となり、明期において脂質燃焼量が増加することが示唆された。Free access 群と暗期 8h 群の VO_2(酸素消費量)、Heat(燃焼量)、活動量には差がなかった。OGTT より、肥満誘導期間において軽度の耐糖能異常が確認されたが、摂食時間制限期間では、Free access 群より暗期 8h 群の耐糖能は有意に向上した。各種臓器、組織の各種遺伝子発現などについて現在検討中である。

以上の結果から、肥満マウスの摂食時間を制限すると、明期における脂質燃焼量が増加し、明暗サイクルに伴って燃焼基質が変化することが示唆された。摂食時間の制限により RER の日周リズムが形成され、肥満が改善する可能性が明らかとなった。

obesity, respiration quotient, circadian rhythm

講演番号：2F11p03
講演日時、会場：3 月 27 日 14:22～ F 校舎 11 会場

味噌と運動が高脂肪食誘導性肥満に与える影響
The effect of interaction between miso and exercise on diet induced obesity
○北野 泰奈[1]、亀井 康富[2]、都築 毅[1] ([1]東北大院農、[2]京都府立大)
○Yasuna KITANO[1], Yasutomi KAMEI[2], Tsuyoshi TSUDUKI[1] ([1]Tohoku Univ., [2]Kyoto Pref. Univ.)

【背景】日本を長寿国に導いた要因の 1 つとして、日本食が考えられている。我々はこれまでに日本食まるごとの有益性を評価し、日本食は米国食に比べて健康有益性が高いことを明らかとした [1]。さらに、時代とともに変化した日本食の中で 1975 年頃の日本食に抗肥満効果を見出した [2]。1975 年の食事で多く摂取されていた食材の 1 つに味噌がある。味噌は、これまでに様々な有益な効果が見出されている一方で、食塩の含有量が多いために健康に悪影響をもたらす可能性が危惧されている。そのため、日本食に含まれる程度の味噌の摂取が健康に有益であるか否かは定かではない。さらに健康維持のためには食事の改善以外にも、適度な運動が有効であることが知られている。そこで本研究では、肥満に対する味噌の摂取と中程度の運動の併用効果を検討することとした。
【方法・結果】肥満に対する味噌の影響を検討するため、ICR mice（5 週齢、雄性）に普通食、高脂肪食、高脂肪食＋1.6%味噌添加食（現代型）、高脂肪食＋2.6%味噌添加食（1975 年型）を 8 週間自由摂食させた。尚、味噌の一般栄養組成を精製飼料のみを用いて再現した mimic 味噌を用いることで、高脂肪食と味噌添加高脂肪食のカロリーを等しくした。普通食摂取群で他の 3 群に対して摂食量が増加したが、エネルギー摂取量に有意な差は認められなかった。肥満の指標である白色脂肪組織重量は高脂肪食＋1.6%味噌添加食（現代型）を摂取したマウスで最も高値であった。よって、現代型の味噌の摂取では内臓脂肪の蓄積が促進されることが示唆された。次に、肥満に対する味噌と運動の併用効果を検討するため、ICR mice（5 週齢、雄性）を高脂肪食、高脂肪食＋運動、高脂肪＋味噌、高脂肪食＋味噌＋運動の４つの条件に分けて８週間飼育した(運動条件は5 time/week、50 min/day、18 m/min)。終体重、体重増加量は運動により有意に減少した。また、運動により白色脂肪組織重量が有意に減少し、味噌の摂取によりその効果は増強された。以上より、運動により内臓脂肪蓄積が抑制され、その効果は味噌により増強されることが明らかとなった。
【参考文献】
[1] 都築毅, 武鹿直樹, 中村祐美子, 仲川清隆, 五十嵐美樹, 宮澤陽夫. 現代日本食と現代米国食を給与したラットの肝臓における網羅的遺伝子発現解析. 日本栄養・食糧学会誌, 2008; 61: 255-264.
[2] Y. Kitano, T. Honma, Y. Hatakeyama, Y. Jibu, Y. Kawakami, T. Tsuduki, K. Nakagawa, T. Miyazawa. Effects of Historical Differences in Components of the Japanese Diet on the Risk of Obesity in Mice. *J. Jpn. Soc. Nutr. Sci.*, 2014; 2: 73-85.

miso, exercise, obesity

講演番号：2F11p04
講演日時、会場：3 月 27 日 14:33～ F 校舎 11 会場

メタボリック症候群モデル動物のエネルギー代謝関連遺伝子発現に対する寒冷暴露の影響
Effects of cold exposure on energy metabolism-related genes expressions in rats with spontaneous metabolic syndrome

○生谷 美紗都[1]、出口 美輪子[1]、海老原 伸[1]、細田 明美[2]、山岸 あづみ[3]、金 東浩[1]、佐伯 茂[1]([1]大阪市大・院生活科学、[2]東京医療保健大・医療栄養、[3]山形大・地域教育)
○ Misato IKUTANI[1], Miwako DEGUCHI[1], Shin EBIHARA[1], Akemi HOSODA[2], Azumi YAMAGISHI[3], Dong-ho KIM[1], Shigeru SAEKI[1] ([1]Osaka city Univ., [2]Tokyo healthcare Univ., [3]Yamagata Univ.)

【目的】肥満は，限られた先進国の疾患であったが，現在では，発展途上国においても，ライフスタイルや食習慣の急速な変化によって，肥満が深刻な社会問題となっている。肥満は，エネルギー蓄積とエネルギー消費のアンバランスによって引き起こされる。ヒトを含む哺乳類には，機能が異なる 2 種類の脂肪組織，即ち，白色脂肪組織(WAT)と褐色脂肪組織(BAT)が存在する。多量の脂肪滴を蓄える WAT は，エネルギー貯蔵器官として機能する。一方，多量のミトコンドリアを含有する BAT は，そのミトコンドリア内膜に脱共役タンパク質(UCP1)が高発現し，β3 アドレナリン受容体（β3AR）を介してエネルギー消費器官として機能する。従って BAT は，肥満の発症に重要な役割を果たしていると考えられる。従来，BAT は，新生児や幼児でのみ存在し，成人では殆ど存在しないと考えられていた。しかし近年，成人にも充分量の BAT が存在することが明らかとなり，エネルギー代謝に果たす BAT の役割に注目が集まっている。Otuka Long-Evans Tokushima Fatty(OLETF)ラットは，自然発症的に肥満，脂質異常症，2 型糖尿病を発症し，メタボリック症候群の解析に適したモデル動物として知られている。本研究は，肥満の発症機構を明らかにすることを目的に，BAT のエネルギー代謝関連遺伝子の発現量に対する寒冷曝露の影響を，OLETF ラットと正常系統 Long-Evans Tokushima Otsuka(LETO)ラットとで比較検討した。
【方法】4 週齢の♂OLETF ラットと♂LETO ラット(各 n=12)を，室温(24℃)で 40 日間飼育した。その後，各ラットを 2 群(n=6)に分け，室温または寒冷環境(15℃,10℃,5℃の順に各 5 日間)で 15 日間飼育し，血液と臓器を採取した。血液は血漿脂質濃度の測定に，臓器は Real time PCR 法によるエネルギー代謝関連遺伝子の発現量の測定に用いた。
【結果・考察】BAT の UCP1 遺伝子発現量は，室温環境下では LETO ラットに比べ OLETF ラットで有意に低かったが，寒冷環境下では LETO ラット，OLETF ラット共に有意に上昇した。BAT のβ3AR 遺伝子発現量は，室温環境下では LETO ラットと OLETF ラットで有意差が無かったが，寒冷環境下では LETO ラットでのみ有意に上昇した。以上の実験結果より，OLETF ラットでは，UCP1 の活性化に関与するβ3AR の機能が低下していることが，肥満の発症原因の 1 つと考えられた。発表では，他臓器のエネルギー代謝関連遺伝子の発現量の結果を併せて考察する。

metabolic syndrome, brown adipose tissue

講演番号：2F11p05
講演日時、会場：3 月 27 日 14:44～ F 校舎 11 会場

絶食、及び低温環境がα酸化、β酸化及びω酸化経路による脂肪酸代謝に及ぼす影響
Effects of starvation and low temperature condition on fatty acid metabolism via α-oxidation, ß-oxidation and ω-oxidation
○山本 覚、桑田 尚平、宮尾 夕子、吉崎 隆之、太田 雅也（福山大　生命工）
○ Satoru Yamamoto, Syouhei Kuwada, Yuko Miyao, Takayuki Yoshizaki, Masaya Ohta (Fukuyama Univ.)

【目的】　脂肪酸は主として脂肪酸β酸化経路で代謝され、エネルギー代謝の基質として利用される。しかし、一部の脂肪酸は脂肪酸ω酸化経路、α酸化により代謝されることを見出した。本研究では、これらの脂肪酸代謝の生理的意義を明らかにするため、絶食及び低温化での動態について検討した。
【方法】　脂肪酸ω酸化に関与するウサギ肝 Alcohol dehydrogenase（ADH）のアイソザイムである ADH Class Ⅰ、ADH Class II、ADH Class III）については、それぞれの cDNA をクローニングし大腸菌内で発現させた発現タンパク質を用いて、その基質特異性等を詳細に検討した。また、５日間絶食処理を施したウサギの肝細胞質画分の ADH アイソザイムの活性を測定し、絶食時における変化を検討した。尿中に排泄される脂肪酸代謝物の検討には、実験動物にラット（ＳＤ、8 週齢、雌）を用いた。ラットを 24 時間絶食後、24℃及び 4℃でメタボリックケージ内で 24 時間飼育し、尿を回収した。回収した尿をφ0.22μｍメンブレンフィルターでろ過した後、凍結乾燥後メタノールで溶解し、メタノール-塩酸存在下でメチルエステル化した。これを GC-MS により同定、定量を試みた。内部標準には Brassylic acid （炭素数 13 のジカルボン酸)を用いた。
【結果】脂肪酸ω酸化経路の最初の反応である脂肪酸ω位の水酸化を触媒する Fatty acid ω-hydroxylase 活性は、絶食、糖尿病、抗高脂血症剤投与により優位に増加することをこれまでに明らかにしている。脂肪酸ω位の水酸化に続くω位水酸基の脱水素反応を触媒する Alcohol dehydrogenase については、ω-ヒドロキシ脂肪酸に対する Km（27μM）が最も低く、肝に最も多量に発現している ADH ClassI が脂肪酸ω酸化に重要な役割を果たしていることが示唆された。また、絶食処理により ADH Class III が約３倍に誘導されることが明らかになった。
　一方、ラットの尿中に排泄される脂肪酸代謝生成物について検討した結果、脂肪酸がβ酸化、ω酸化、及びα酸化を受けて生成したと推定される Pimelic Acid(炭素数 7)、Suberic acid （炭素数 8)、Azeklaic acid （炭素数 9)、及び Sebacic acid （炭素数 10)のジカルボン酸がほぼ同程度量排泄されていることが示された。一方、低温下で飼育したラットの尿中には Adipic acid(炭素数 6)が検出され、さらに奇数炭素数の Pimelic Acid、Azelaic acid が優位に増加することが示された。これらの結果より、脂肪酸ω酸化及び脂肪酸α酸化経路が脂肪酸代謝において恒常的に機能しており、飢餓時や低温化では脂肪酸β酸化経路を補足する代謝経路であることが強く示唆された。
　尚、本研究は平成 24 年度～26 年度 文科省科研費（課題番号 24650508）の支援を受けて実施した。

fatty acid, omega-oxidation, alfa-oxidation

講演番号：2F11p06
講演日時、会場：3 月 27 日 15:05～ F 校舎 11 会場

プロスタグランジン D_2 に起因する脂質メディエーターの解析
Analysis of prostaglandinD_2-derived lipid mediators
柴田 貴広、○犬塚 恵美、中島 史恵、内田 浩二 (名大院生命農)
Takahiro Shibata, ○Emi Inuzuka, Fumie Nakashima, Koji Uchida (Grad.Sch. of Bioagric. Sci. Nagoya Univ.)

【背景・目的】
脂質は 3 大栄養素のひとつであり、細胞膜の主要な構成成分やエネルギー源であるだけでなく、外界からの刺激に応答して『脂質メディエーター』と呼ばれる生理活性脂質が産生されることで、生体防御や神経伝達などに関与するという重要な機能を有している。中でもプロスタグランジン (PG) 類は、遊離アラキドン酸からシクロオキシゲナーゼ (COX) の触媒によって生成される主要な脂質メディエーターである。PG の一種である PGD_2 は睡眠の誘発やアレルギー性炎症に関与する一方、PPARγ のリガンドになるなどユニークな生理活性を有する J_2 型 PG へと代謝されることも知られている。本研究では LC-MS/MS を用いて、変換経路の更なる検討および細胞応答における PG 類の経時的変化について解析し、PG 類の生理活性の更なる解明を目的として研究を進めている。

【方法・結果】
PGD_2 およびその変換産物を LC-MS/MS のプロダクトイオンスキャンモードで解析したところ、検討したすべての PG において共通のプロダクトイオンが検出された。このことから共通のプロダクトイオンを利用することにより、PGD_2 の変換産物を解析することとした。*in vivo* における PGD_2 の変換について LC-MS/MS を用いて検討を行ったところ、15d-PGJ_2 は PGJ_2 からだけではなく、15d-PGD_2 からも産生されうることが確認された。また、血清アルブミンはこれまでに知られている Δ^{12}-PGJ_2 だけでなく、その他の PG 類の産生にも関与することが示唆された。以上のことより PGD_2 について新たな変換経路が存在していると予想し、更なる検討を進めている。また、炎症応答に関与するマクロファージ細胞や、アレルギー応答に関与するマスト細胞に着目し、LC-MS/MS を用いて細胞応答の誘導時における培養上清中の PG 類を経時的に検出することを試みている。

prostaglandin, lipid mediator, LC-MS/MS

講演番号：2F11p07
講演日時、会場：3 月 27 日 15:16～ F 校舎 11 会場

肥満に伴い脂肪組織に浸潤したマクロファージがベージュ脂肪細胞発現を抑制する

Infiltrated macrophages into obese adipose tissues suppress the induction of beige adipocytes

○新田 貴大[1]、坂本 智弥[1]、丸野 晃嗣[1]、後藤 剛[1,2]、高橋 信之[1,2]、河田 照雄[1,2] ([1]京大院農・食品生物、[2]京大 生理化学研究ユニット)
○ Takahiro NITTA[1], Tomoya SAKAMOTO[1], Koji MARUNO[1], Tsuyoshi GOTO[1,2], Nobuyuki TAKAHASHI[1,2], Teruo KAWADA[1,2] ([1]Div. Food Sci. Biotechnol., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]Research Unit for Physiological Chemistry, Kyoto Univ.)

【背景・目的】脂肪細胞には白色脂肪細胞と褐色脂肪細胞の 2 種類が存在する。白色脂肪細胞はエネルギーを貯蔵する一方で、褐色脂肪細胞は脱共役タンパク質 1（ UCP1：uncoupling protein 1 ）によってエネルギーを熱として放散する。また、UCP1 は交感神経系刺激に伴い白色脂肪細胞にも発現する(このような細胞はベージュ脂肪細胞と呼ばれる)。近年、こうした細胞がヒト成人においても発現し、全身のエネルギー代謝、糖・脂質代謝に寄与していることが明らかとなってきた。

しかし、ベージュ脂肪細胞の発現や活性は、加齢や肥満に伴って低下してしまう。これによるエネルギー消費量低下が所謂「中年太り」に関与すると推察されているが、そのメカニズムの全貌は明らかとなっていない。一方で、肥満状態の脂肪組織においては、マクロファージ(Mϕ)の浸潤が起こり、炎症が惹起されている。本研究では Mϕ 浸潤がベージュ脂肪細胞発現にどのような影響を与えるのか、動物個体レベルで検討した。

【方法・結果】

(1) 3 週間高脂肪食負荷 KK-Ay マウス(肥満モデルマウス) に対して、クロドロネートリポソーム(Clo-Lip)を腹腔内投与 (30 mg/kg body weight) し、Mϕ を除去した肥満モデルマウスの作成を試みた。投与 48 時間後、鼠径部白色脂肪(IWAT) における Mϕ マーカー遺伝子(*F4/80, Mcp-1*)、炎症性マクロファージ M1Mϕ のマーカー遺伝子(*Il6, TNFα*)遺伝子発現が Clo-Lip 投与群において有意に減少した。一方で、抗炎症性マクロファージ M2Mϕ のマーカー遺伝子(*Arg1, Ym1*)発現に変化はなかった。また、病理切片解析においても IWAT における Crown-like structures の減少、Mϕ 表面抗原(F4/80)および M1Mϕ 表面抗原(CD11c)陽性細胞数の減少が観察された。

(2) (1)の Mϕ 除去マウスに対して寒冷曝露（ 24 時間, 4℃)を行い、ベージュ脂肪細胞の発現を誘導した。その結果、IWAT において、Clo-Lip 投与群では *Ucp1 m*RNA および UCP1 タンパク発現誘導が有意に回復した。更に、Mϕ 除去マウスにおいてのみ、ベージュ脂肪細胞マーカー遺伝子(*Tbx1, Tmem26*)の発現が寒冷曝露に伴い有意に上昇し、これらマウスでは血漿 TG, 血漿グルコース濃度が PBS-Lip 投与群と比較して有意に低下した。

【考察】

肥満状態に伴い脂肪組織に浸潤した M1Mϕ によってベージュ脂肪細胞発現が抑制され、これが全身のエネルギー代謝に影響を及ぼす、という新たなメカニズムが示唆された。

Brown adipocyte, Macrophage, obesity

講演番号：2F11p08
講演日時、会場：3 月 27 日 15:27～ F 校舎 11 会場

分岐鎖アミノ酸代謝亢進による糖・脂質代謝に対する影響

The effect of enhanced-BCAA catabolism on Glucose and Fatty acid metabolism

○北浦 靖之、門田 吉弘、加藤 里奈、太田 美樹、石川 卓弥、森下 由佳子、徐 旻珺、下村 吉治（名古屋大・生命農）
○YASUYUKI KITAURA, YOSHIHIRO KADOTA, RINA KATO, MIKI OTA, TAKUYA ISHIKAWA, YUKAKO MORISHITA, BINKUN JYO, YOSHIHARU SHIMOMURA (Nagoya Univ.)

肥満や２型糖尿病では、糖・脂質代謝のみならず、近年、アミノ酸代謝も影響を受けることが明らかにされつつある。特に分岐鎖アミノ酸（Branched-chain amino acid: BCAA）は、肥満や２型糖尿病でその代謝が変化することが示唆されている。当研究室では、２型糖尿病モデル動物において BCAA 代謝が抑制され、BCAA の長期投与により耐糖能が有意に改善されること、一方、高脂血漿治療薬であるクロフィブレートにより一時的に BCAA 代謝を亢進させ、血中 BCAA 濃度を低下させることにより耐糖能が低下することを見出した。しかし、長期的な BCAA 代謝の亢進または抑制により、糖・脂質代謝にどのように影響するかは不明である。また、糖・脂質の多くは体の大部分を占める筋組織でエネルギーとして利用されることから、糖・脂質代謝に対して筋組織での BCAA 代謝の変化が及ぼす影響は大きいことが考えられる。

そこで本研究では、BCAA 代謝の律速酵素である分岐鎖αケト酸脱水素酵素（branched-chain α-ketoacid dehydrogenase: BCKDH）を特異的に不活性化するリン酸化酵素（BCKDH kinase: BDK）を全身で欠損させたマウス（BDK-KO）または筋組織特異的に欠損させたマウス（BDK-mKO）を用いて、全身または筋組織での BCAA 代謝亢進による糖・脂質代謝に対する影響について検討した。BDK-KO または BDK-mKO を 20-22 週齢まで飼育し、腹腔内糖負荷試験を行った結果、BDK-KO マウスはコントロールマウスと比較して、糖負荷後の血糖値が有意に高値を示した。一方、BDK-mKO マウスでは、血糖値の変動に有意な変化は見られなかった。また、血中の遊離脂肪酸、トリグリセライド濃度は、BDK-KO および BDK-mKO において、コントロールマウスとの間に有意な差は認められなかった。BDK-KO マウスでは、コントロールマウスに比べ、血中 BCAA 濃度が約 40% まで減少していたのに対し、BDK-mKO マウスでは筋組織で約 40%、血中で約 70% 程度であった。以上の結果から、BCAA 代謝亢進による筋組織での BCAA 濃度低下よりも、全身での BCAA 代謝亢進による血中 BCAA 濃度の低下が耐糖能低下を引き起こし、血中での BCAA 濃度の維持が糖代謝を正常に保つために重要であることが示唆された。

BCAA, glucose metabolism, fat metabolism

講演番号：2F11p09
講演日時、会場：3 月 27 日 15:38～ F 校舎 11 会場

日常的な糖質飲料の摂取がマウスの肥満、耐糖能に及ぼす影響

The effect of sugar intake with drinking water on glucose tolerance and obesity in mice.

○香門 里菜[1]、久宮 彩乃[2]、江口 輝[2]、細野 崇[1]、関 泰一郎[1] ([1]日本大生資科、[2]日本大院生資科)
○Rina KAMON[1], Ayano KUGU[2], Akira EGUCHI[2], Takashi HOSONO[1], Taiichiro SEKI[1] ([1]Nihon Univ., [2]Nihon Univ. Grad. School)

【目的】

清涼飲料をはじめとした糖質を添加した飲料の日常的な摂取は、エネルギーの過剰摂取につながり、肥満を誘発し、糖尿病や心血管疾患の危険性が高くなる。しかし、糖質を含む飲料の過剰摂取による肥満、脂質異常症、耐糖能異常、インスリン抵抗性などの発症メカニズムに関しては未だに不明な点が多い。本研究では、食餌誘導性肥満になりやすい C57BL/6J マウスを用いて、糖質を含む飲料の日常的な摂取が肥満、耐糖能異常に及ぼす影響について基礎的に検討した。

【方法】

10 週齢の C57BL/6J 雄性マウス（日本チャールス・リバー）に標準固型飼料 CRF-1（オリエンタル酵母）を自由に摂取させた。15% (wt/vol)グルコースを含む水を与えるグルコース群、15% (wt/vol) スクロースを含む水を与えるスクロース群、糖質を含まない水を与えるコントロール群の 3 群に群分けした。試験開始 6 週間目に経口糖負荷試験を行った。

【結果】

コントロール群と比較して、グルコース群とスクロース群の摂水量は有意に増加した。一方、これらのマウスの摂餌量は有意に減少した。また、総エネルギー摂取量に占める糖質の割合は、グルコース群とスクロース群で有意に増加したが、体重増加には影響を及ぼさなかった。試験開始 6 週間目の経口ブドウ糖負荷試験の結果、群間で有意な差がなかったことから、糖質の日常的な過剰摂取は耐糖能に影響及ぼさないことが明らかとなった。これらの結果から、マウスに糖質を含む飲料を摂取させても飲水により摂取した糖質エネルギーの増加分は、固型飼料の摂餌量を低下させて調節するため、肥満や耐糖能異常が誘導されないことが明らかになった。

Sugar, Glucose tolerance, Obesity

講演番号：2F11p10
講演日時、会場：3 月 27 日 15:49～ F 校舎 11 会場

タンパク質低栄養条件下で誘導される線維芽細胞増殖因子（FGF）21 の脂質代謝における役割
Impact of fibroblast growth factor 21 on lipid metabolism under protein malnutrition
○尾崎 依[1]、小西 守周[2]、伊藤 信行[3]、高橋 伸一郎[4]、竹中 麻子[1]([1]明治大・農・農化、[2]神戸薬科大・薬、[3]京大・院・薬、[4]東大・院・農生化)
○Yori OZAKI[1], Morichika KONISHI[2], Nobuyuki ITOH[3], Shin-Ichiro TAKAHASHI[4], Asako TAKENAKA[1] ([1]Meiji Univ., [2]Kobe Pharma Univ., [3]Kyoto Univ., [4]Univ. of Tokyo)

【背景】低タンパク質栄養状態では ,肝臓への中性脂質蓄積が誘導されることが明らかとなっている。我々は , 低タンパク質食を給餌したラットの肝臓について DNA マイクロアレイ解析を行った結果 , 低タンパク質食摂取 1 日で fibroblast growth factor 21（FGF21）の遺伝子発現が顕著に誘導されることを見出し , 昨年度本大会で報告した。FGF21 は肝臓をはじめとする広範囲の臓器で産生される内分泌因子で , 絶食やケトン食摂取時に発現誘導され , 糖・脂質代謝を制御することが報告されている。本研究では ,低タンパク質食摂取時の FGF21 の発現誘導が肝臓における中性脂質蓄積に果たす役割を検討するため , *Fgf21* ノックアウト（KO）マウスに低タンパク質食を給餌して脂質代謝の変動を解析した。
【方法】4-5 週齢の C57BL/6J バックグラウンド野生型（WT）あるいは *Fgf21*-KO の雄マウスに , 20% のカゼインを含む対照食（20P）, あるいは 20P と等工ネルギーで 5%のカゼインを含む低タンパク質食（5P）を 1 日 16 時間 , 5 日間給餌した。5 日目に 8 時間絶食下で尾より採血し , 血漿試料を得た。さらに各飼料を 5 日間自由摂取させ , 摂食下で心臓より採血し , 肝臓 , 精巣上体周囲脂肪および腓腹筋を採取した。
【結果】絶食は FGF21 を誘導することが知られているが , WT マウスの血中 FGF21 濃度は , 実験食摂取 5 日目の 8 時間の絶食下で 5P 群において 20P 群の 30 倍以上有意に増加した。また 10 日目の自由摂食下においても , 5P 群で 20P 群の 10 倍以上有意に増加した。一方 , WT および *Fgf21*-KO の両マウスにおいて , 5P 給餌 2 日目から体重増加が有意に抑制され , 血中インスリン様成長因子（IGF）-I 濃度が低下し , 成長遅滞が観察された。腓腹筋重量はいずれの群間にも差が認められなかったが , 精巣上体周囲脂肪重量は 5P を給餌した *Fgf21*-KO マウスのみ , 他群と比較して有意に重かった。また , 血中トリグリセリド濃度および血中遊離脂肪酸濃度は 5P 食摂取により低下し , *Fgf21*-KO マウスで増加した。肝臓におけるトリグリセリドおよびコレステロール蓄積量は , WT および *Fgf21*-KO マウスともに 5P 群で増加したが , その増加量は WT と比較して *Fgf21*-KO マウスで顕著に大きかった。
【結論】これらの結果から , 低タンパク質栄養状態で血中 FGF21 濃度が上昇するが , この上昇は肝臓の脂質蓄積を誘導せず , 脂肪組織における脂質分解の亢進と肝臓脂質蓄積の抑制に寄与すると結論した。
本研究は , 農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業を活用して行った。

FGF21, fibroblast growth factor 21, protein malnutrition

講演番号：2F11p11
講演日時、会場：3 月 27 日 16:10～ F 校舎 11 会場

肝細胞の分化ステージとリポタンパク質産生能との関係

The induction of lipoprotein production in hepatic cell differentiation.

○佐々木 玲[1,3]、木村 文子[2]、三浦 瑞穂[2]、高橋 純一郎[2]、小林 正之[3]、畠 恵司[1] ([1]秋田県総食研、[2](株)スカイライト・バイオテック、[3]秋田県大院生資)
○Akira SASAKI[1,3], Fumiko KIMURA[2], Mizuho MIURA[2], Junichiro TAKAHASHI[2], Masayuki KOBAYASHI[3], Keishi HATA[1] ([1]Akita Res. Inst. Food & Brew., [2]Skylight Biotech Inc., [3]Akita Pref. Univ.)

【目的】リポタンパク質は、リン脂質、コレステロールおよびそのエステル、中性脂肪ならびにアポリポタンパク質からなる球状粒子である。肝臓は、各組織への脂質（主に中性脂肪とコレステロール）の供給ならびに余分な脂質の回収を担うために VLDL(Very Low Density Lipoprotein)、LDL(Low Density Lipoprotein)、HDL(High Density Lipoprotein)の主要 3 種のリポタンパク質を合成する。それ故、肝臓における脂質合成を制御することができる化合物は、脂質異常症改善の主な薬剤として上市されている。特に肝実質細胞は、脂質代謝以外にも薬物代謝、解毒などに関わるため、ES/iPS 細胞などの幹細胞から誘導し、これらの評価に利用する研究が活発化してきた。一方、我々は、ヒト肝癌由来 HepG2 細胞が VLDL、LDL、HDL を培養上清に分泌することや、既知の薬剤でそれらの分泌が抑制される事を見出し、新規脂質異常症薬探索系を開発した [1)]。さらに、HepG2 細胞の分化に従い、リポタンパク質産生が亢進されることを見出し、リポタンパク質自体が肝細胞の新たな分化マーカーとして応用できる可能性を示した [2)]。本研究では、分化のステージが異なる肝由来細胞のリポタンパク質産生と、リポタンパク構成分子の遺伝子発現量を調べ、肝細胞の分化ステージとリポタンパク質産生能との関係を詳細に検討した。

【方法】ヒト未分化型肝癌細胞 2 株（HLE および HLF）、高分化型肝癌細胞 3 株（HepG2、HuH-7、HepaRG®）、ならびに正常ヒト肝細胞の培養上清に産生されるリポタンパク質量を LipoSEARCH® で定量した。これら細胞の脂質代謝関連遺伝子の発現量を Real-time RT-RCR で定量した。

【結果及び考察】上記肝由来細胞株のなかで、高分化型肝癌細胞 3 株と正常肝細胞ではリポタンパク質の産生が認められた。しかしながら、未分化型肝癌細胞株である HLE および HLF は 3 種の主要リポタンパク質を産生しなかった。そこで、各細胞株間での脂質代謝関連遺伝子群の発現量を検討した結果、脂肪酸合成酵素、コレステロール合成系の律速酵素である HMG-CoA 還元酵素、あるいはそれらを制御する SREBP-1c、SREBP-2 の遺伝子発現量に大きな差は認められなかった。一方、リポタンパク質を産生しない未分化型肝癌細胞株では、リポタンパク質を産生する高分化型肝癌細胞株ならびに正常ヒト肝細胞と比較して、VLDL/LDL の主要アポリポタンパク質である ApoB-100 ならびに HDL の主要アポリポタンパク質である ApoA-1 の発現量が非常に低いことが判明した。以上の結果から、アポリポタンパク質の誘導がリポタンパク質産生の鍵となると推察される。

現在、我々は間葉系幹細胞株に、肝細胞系への分化を誘導する転写因子を遺伝子導入した細胞株を得ており、これらの遺伝子発現とリポタンパク質産生との相関について検討を行っている。

1) Itoh M. *et al.*, Biotech. Lett. 31, 953-957 (2009).
2) Takahashi J. *et al.*, In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim. 49, 554-556 (2013)

lipoprotein, hepatic cell differentiation, apolipoprotein

講演番号：2F11p12
講演日時、会場：3 月 27 日 16:21～ F 校舎 11 会場

細胞老化関連因子 SMARCD1 による肝機能制御に関する研究

Involvement of SMARCD1 in the regulation of hepatic functions.

○児崎 智美[1]、井上 千聡[1]、續 祐美[1]、鵜殿 美弥子[1]、片倉 喜範[2]([1]九大院・生資環、[2]九大院・農院)

○ Tomomi KOZAKI[1], Chisato INOUE[1], Yumi TSUDUKI[1], Miyako UDONO[1], Yoshinori KATAKURA[2] ([1]Grad. Sch. Biores. Bioenv. Sci., Unvi of Kyushu, [2]Fac.Agri., Unv of Kyushu)

【目的】

当研究室ではこれまでに、細胞老化とともに発現が低下する細胞老化関連因子として、SWI/SNF ファミリータンパク質の 1 種 SMARCD1（BAF60a）を同定している。これまでに SMARCD1 は、ミトコンドリア機能を制御する PGC1-α と複合体を形成し、肝臓の脂肪酸β酸化遺伝子の転写を活性化することが報告されている。そこで本研究では、SMARCD1 による肝機能制御の可能性について明らかにすることを目的とした。

【方法】

脂肪肝のモデル細胞としてはヒト肝がん由来細胞株である HepG2 細胞を用いた。遺伝子の発現解析は定量 RT-PCR 法により、SMARCD1 のノックダウンおよび強制発現はレトロウイルス発現系により行った。細胞老化表現型・肝細胞表現型は、各種マーカーを用いてイメージングサイトメーターにより定量的な評価を行った。

【結果と考察】

HepG2 細胞に対しパルミチン酸処理を行った結果、脂肪酸β酸化関連遺伝子の発現低下による脂肪滴合成の亢進とともに、SMARCD1 の発現低下が観察された。以上の結果から、細胞老化関連因子 SMARCD1 が脂肪肝発症に関わりうるものと考えられた。つぎに SMARCD1 の機能性を明らかにするために、SMARCD1 をノックダウンまたは強制発現した HepG2 細胞を作製した。これらの細胞の細胞老化表現型を IN Cell Analyzer1000 を用いて評価した結果、SMARCD1 をノックダウンした細胞では脂肪酸β酸化関連遺伝子の発現低下による脂肪滴の蓄積と各種細胞老化マーカーの活性・発現増強が観察された。また、SMARCD1 を強制発現した HepG2 細胞では、脂肪滴の減少と各種細胞老化マーカーの活性・発現低下が観察された。以上の結果から、SMARCD1 は HepG2 細胞に対して抗老化効果を有するとともに、その発現増強が脂肪肝抑制につながりうるものと考えられた。さらに、高脂肪食を与えたマウスの肝臓において、SMARCD1 の発現低下、老化マーカーの発現増加、脂肪酸β酸化関連遺伝子の発現低下、炎症系サイトカインの発現増加が確認された。以上の結果から、SMARCD1 は細胞老化および肝機能制御をともに規定する因子であることが示唆された。

SMARCD1, fatty liver, cellular senescence

講演番号：2F11p13
講演日時、会場：3 月 27 日 16:32～ F 校舎 11 会場

Long-Evans Cinnamon ラットをモデルとしたコーヒーによる肝炎抑制効果の肝臓分子機構の解明
Efficacy of coffee on the hepatitis of Long-Evans Cinnamon rat, and its possible molecular mechanisms detected from global gene expression

○片山 雅史[1]、榊原 啓之[2]、大友 由紀子[1]、西森 克彦[1]、福田 智一[1] ([1]東北大学大学院農学研究科、[2]宮崎大学農学部)
○ Masafumi KATAYAMA[1], Hiroyuki SAKAKIBARA[2], Yukiko OHTOMO[1], Katsuhiko NISHIMORI[1], Tomokazu FUKUDA[1] ([1]Tohoku Univ., [2]Miyazaki Univ.)

【目的】毎日コーヒー2 杯以上飲んでいる人は肝炎や肝臓がんになる可能性が低いことが疫学調査において知られている。しかしこれらの報告はヒトの臨床における研究報告であるため、多様なヒトの遺伝的背景を含んでいる。肝臓におけるコーヒーの作用の詳細な体内分子機構を明らかにするためには、遺伝的背景をそろえた動物モデルによって疫学データを実証しなければならない。Long Evans Cinnamon (以降 LEC)ラットは劇症型肝炎を自然発症し、その後、肝炎は継続的に推移または悪化することから、ヒトの肝炎-慢性肝炎-肝硬変の連続的な増悪機構を模倣する動物として知られている。LEC ラットの肝炎発症の分子機構は、肝臓内の銅の排出に関与する *ATP7β* 遺伝子の欠損により肝臓内の銅の排出が出来ず、その結果肝臓内の酸化ストレスが上昇し、肝炎および慢性肝炎、肝硬変の発症、さらには線維化にまで至ることが明らかになっている。LEC ラットを使用すれば、肝炎から肝臓がんに至る段階的な進行の予防や抑制効果を検証出来る可能性がある。そこで我々は、LEC ラットを用いて、肝炎および肝臓がんの予防、抑制効果の検討を行なった。
【材料と方法】供試動物として、LEC ラットを使用し、コーヒー投与群(水の代わりにコーヒーを給水)およびコントロール群を設定した。2 週間間隔の採血を実施し、16 週齢で解剖を実施し、肝臓サンプルを得た。肝臓サンプルからは、Total RNA を回収した。回収した RNA のマイクロアレイ解析を実施し、コーヒー投与により発現量が 0.5 倍に減少した遺伝子、2 倍以上に増加した遺伝子をリストアップした。
【結果と考察】コーヒー摂取により GPT 活性の上昇が抑制された。さらにコーヒー摂取により生存率が上昇することが示された。これらの結果は、LEC ラットはコーヒーによる肝炎抑制効果の検証に有用なモデル動物であり、コーヒーが肝炎の発症を抑制させることで LEC ラットの生存率を改善させていることを示唆している。さらに、コーヒー摂取により発現量が 0.5 倍に減少した遺伝子が 642 遺伝子、2 倍以上に増加した遺伝子が 236 遺伝子認められた。発現変動が認められた遺伝子の中には転写因子や growth factor も含まれていた。これらの結果はコーヒーの摂取が LEC ラットの肝臓の遺伝子の発現を変動させ、肝炎の抑制に寄与していることを示しており、コーヒーによる肝炎抑制効果の分子メカニズム解明につながることが期待される。
【参考文献】M. Katayama et al. Clinical nutrition. 33(2): 302-310 (2014).

experimental animal model, coffee, hepatitis

講演番号：2F11p14
講演日時、会場：3 月 27 日 16:43～ F 校舎 11 会場

アスコルビン酸欠乏による肝臓の STAT3 の活性化とその制御下遺伝子の発現解析

Ascorbic acid deficiency stimulates STAT3 phosphorylation and SOCS3 expression in liver and other tissues in ODS rats.

○川出 野絵[1]、徳田 優希[1]、辻野 祥伍[1]、小林 美里[1]、村井 篤嗣[1]、重岡 成[2]、堀尾 文彦[1]([1]名古屋大院生命農・応用生命、[2]近畿大農・バイオサイエンス)
○Noe KAWADE[1], Yuki TOKUDA[1], Syogo TSUJINO[1], Misato KOBAYASHI[1], Atsushi MURAI[1], Shigeru SHIGEOKA[2], Fumihiko HORIO[1] ([1]Nagoya Univ., [2]Kinki Univ.)

【目的】ビタミン C であるアスコルビン酸（AsA）を生合成不能の ODS ラットにおいて、AsA 欠乏時には炎症性サイトカインである IL-6 の血中濃度の上昇や肝臓での急性期タンパク質の発現上昇などの炎症様変化が起こることを我々は見出している。本研究では、今までに見出されていない AsA 欠乏により肝臓で発現変動する炎症に関連した遺伝子群を明らかにすることを目的として、AsA 欠乏時の肝臓を用いて網羅的な遺伝子発現解析を行った。
【方法】ODS ラット（雄、6 週齢）に基本飼料（AsA300mg/kg 添加）を与えるコントロール群と AsA 無添加飼料を与える欠乏群を設けて、実験開始後 8、10、12 および 14 日目に解剖した。採取した肝臓から RNA を抽出して DNA マイクロアレイ解析を行い、発現レベルに差の見られた遺伝子についてはリアルタイム PCR にて各個体の mRNA レベルの測定を行った。
【結果】肝臓の AsA 濃度は 8 日目の欠乏群ではコントロール群の 18%に低下しており、その後はさらに低下した。AsA 欠乏により発現変化が検出された遺伝子の中で炎症に関連するものの割合は高く、中でも STAT3 と SOCS3 の mRNA レベルが AsA 欠乏 12 日目以降において有意に上昇することが見出された。この 2 つの遺伝子は JAK-STAT 経路に位置しており、転写因子 STAT3 は IL-6 によって活性化（リン酸化）され SOCS3 や急性期タンパク質遺伝子の発現を上昇させる。そこで、肝臓において核内のリン酸化 STAT3 タンパク質レベルを測定した結果、AsA 欠乏 12 日目以降においてコントロール群と比べて有意に上昇していた。さらに、AsA 欠乏 14 日目の肺と脾臓の SOCS3mRNA レベルと、全血細胞の STAT3mRNA レベルも AsA 欠乏群で上昇することが明らかとなった。
【考察】ODS ラットの AsA 欠乏時の肝臓の網羅的な遺伝子発現解析の結果、AsA 欠乏により STAT3 と SOCS3 の発現が上昇することが見出され、STAT3 活性化も AsA 欠乏により亢進していることが判明した。先行研究において見出されている AsA 欠乏時の血中 IL-6 濃度の上昇と肝臓の急性期タンパク質の発現上昇との関係において、肝臓の STAT3 シグナルの促進が寄与していることが示唆された。また、脾臓と肺における SOCS3 発現レベルと全血細胞における STAT3 発現レベルが上昇していたことから血中 IL-6 濃度の上昇は肝臓以外の組織に対しても作用していると考えられ、AsA 欠乏時には全身で炎症反応が誘発されていることが推定された。

ascorbic acid, STAT3, inflammation

講演番号：2F11p15
講演日時、会場：3 月 27 日 16:54～ F 校舎 11 会場

肝臓におけるアミノ酸欠乏に応答したインスリン受容体基質（IRS）-2 量の増加とトリグリセリドの蓄積の新規分子機構

Novel mechanisms of increases in protein amounts of insulin receptor substrate (IRS)-2 followed by accumulation of triglycerides in liver in response to amino acid deprivation

○西 宏起[1]、亀井 宏泰[1]、山中 大介[1]、赤西 成美[1]、森 友美[1]、合田 祐貴[1]、豊島 由香[2]、竹中 麻子[3]、潮 秀樹[1]、加藤 久典[4]、千田 和広[1]、伯野 史彦[1]、高橋 伸一郎[1]([1]東大農、[2]日医・老人病研、[3]明大農、[4]東大・総括)

○Hiroki NISHI[1], Hiroyasu KAMEI[1], Daisuke YAMANAKA[1], Narumi AKANISHI[1], Tomomi MORI[1], Yuuki GOHDA[1], Yuka TOYOSHIMA[2], Asako TAKENAKA[3], Hideki USHIO[1], Hisanori KATO[4], Kazuhiro CHIDA[1], Fumihiko HAKUNO[1], Shin-Ichiro TAKAHASHI[1] ([1]Univ. of Tokyo, [2]Nippon Medical School, [3]Meiji Univ., [4]Univ. of Tokyo, Interdisciplinary Research Projects)

【目的】我々は、成長期のラットにタンパク量が不足した餌を給餌すると、肝臓中のインスリンシグナル伝達の重要な仲介因子であるインスリン受容体基質(IRS)-2 の量が増加し、トリグリセリド(TG)が蓄積することを明らかにした。昨年度本大会では、培地中のアミノ酸を欠乏させると培養肝細胞で IRS-2 量の増加が起こり、この増加が TG 蓄積に必要であることを報告した。そこで今回、培養肝細胞を用いて、アミノ酸欠乏に応答した IRS-2 増加とこれを介した TG 蓄積の分子機構を検討した。**【方法】**一般に IRS-2 はユビキチン化後プロテアソームで分解されることが知られているが、我々は IRS-2 と種々の脱ユビキチン化酵素が相互作用し、その分解が抑制されることを発見している。そこで IRS-2 と相互作用する脱ユビキチン化酵素 USP-7、USP-9X および USP-15 の発現を siRNA により阻害したヒト肝癌細胞 HuH7 細胞をアミノ酸不含培地で培養、IRS-2 量と細胞内 TG 量の変化を調べた。また、アミノ酸不含培地で培養時に種々のインスリンシグナル阻害剤を添加し、TG 量の増加への影響を調べた。**【結果】**HuH7 細胞をアミノ酸不含培地で 12 時間以上培養すると IRS-2 量の顕著な増加が認められた。USP-7 の発現を抑制した HuH7 細胞では、アミノ酸欠乏に応答した IRS-2 量および TG 量の増加は変化しなかったが、USP-9X および USP-15 の発現抑制でこれらの増加が抑制された。アミノ酸不含培地で培養した HuH7 細胞では、培地中にインスリンを添加しない状態で、IRS-2 の下流で活性化される phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) 経路の下流キナーゼ、Akt の活性化が観察された。しかしこの際、インスリン受容体の阻害剤（BMS754807）あるいは PI3K の阻害剤（LY294002）で処理しても、アミノ酸欠乏で誘導される TG の増加に影響しなかった。**【結論】**これまでの結果を併せると、「アミノ酸欠乏状態の肝臓では、USP9X や USP-15 などの脱ユビキチン化酵素によって、IRS-2 の脱ユビキチン化が起こり IRS-2 の分解が抑制される。増加した IRS-2 が、インスリンシグナル増強を介する機構と同時に、インスリンシグナルとは独立した何らかの機構で細胞内の TG 量を増加させる」というアミノ酸欠乏シグナルに応答した新しい脂肪蓄積機構の存在が考えられる。本研究は農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業を活用して行われた。

amino acid deprivation, fatty liver, IRS-2, USP, insulin signal

講演番号：2F11p16
講演日時、会場：3 月 27 日 17:15～ F 校舎 11 会場

コンジェニックマウスを用いた食餌誘導性脂肪肝感受性遺伝子の存在領域の解析
Fine mapping of responsible genes for high-fat diet-induced fatty liver by using congenic mice

○鈴木 京[1]、小林 美里[1]、大野 民生[2]、辻村 絢子[1]、村井 篤嗣[1]、堀尾 文彦[1]([1]名大院生命農・応用分子生命科、[2]名大院医学系)
○ Miyako SUZUKI[1], Misato KOBAYASHI[1], Tamio OHNO[2], Junko TSUJIMURA[1], Atsushi MURAI[1], Fumihiko HORIO[1] ([1]Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya Univ., [2]Graduate School of Medicine, Nagoya Univ.)

【目的】NAFLD（nonalcoholic fatty liver disease）は環境要因と複数の遺伝要因から発症する多因子疾患であり、肥満や 2 型糖尿病に高頻度で併発するが詳細な発症メカニズムは明らかでない。我々は、高脂肪食の摂取により重篤な脂肪肝を呈する SMXA-5 マウス（A/J と SM/J を両親系統とする組み換え近交系統）を用いて、NAFLD の遺伝要因の解明を目的に研究を進めてきた。そして SMXA-5 の第 12 番染色体（Chr.12）上に脂肪肝感受性遺伝子座 *Fl1sa* を同定し（*J. Lipid Res.* 48;2039:2007）、A/J アレルの *Fl1sa* が NAFLD を増悪させることを示した。そこで本研究では、脂肪肝感受性遺伝子座 *Fl1sa* の責任遺伝子の存在領域の限局とその候補遺伝子を探索することを目的とした。

【方法】実験(1)：脂肪肝感受性遺伝子の存在領域を絞り込むために、脂肪肝易発性の A/J マウスの Chr.12 の *Fl1sa* 領域（セントロメア～54.2Mb）を部分的に脂肪肝抵抗性の SM/J マウスの染色体断片に置換した 4 種類のコンジェニックマウス（R1、R2、R3、R5）を作出した。雄性の A/J マウス、A/J-12^{SM} マウス（A/J の第 12 番染色体のみを SM/J で置換したコンソミックマウス）、4 種のコンジェニックマウスを 6 週齢から固型高脂肪食で 7 週間飼育し、解剖を行った。各系統の肝臓脂質含量を比較することにより脂肪肝感受性遺伝子の存在領域を推定した。
実験(2)：A/J と A/J-12^{SM} の肝臓を用いた網羅的な遺伝子発現量解析の結果から、実験(1)で絞り込んだ領域内に存在し、2 群間で発現量が 1.5 倍以上または 0.67 倍以下に変動した遺伝子を抽出した。

【結果・考察】実験(1)：A/J-12^{SM} コンソミックマウス、R2、R3 コンジェニックマウスでは、肝臓総脂質含量と肝臓トリグリセリド含量が A/J マウスと比較して有意な低値を示した。この結果より、R2（12.3Mb～29.8Mb）と R3(29.8Mb～47.6Mb)のそれぞれの染色体領域に、*Fl1sa* の責任遺伝子が少なくとも 1 つずつ存在することが示唆された。
実験(2)：A/J と A/J-12^{SM} の肝臓におけるマイクロアレイ解析の結果から、R2 の染色体領域（12.3Mb～29.8Mb）に存在する遺伝子として *Iah1*（*Isoamyl acetate-hydrolyzing esterase 1 homolog (S. cerevisiae)*（21.3Mb））と *Rrm2*（*Ribonucleotide reductase M2*（24.7Mb））を抽出した。R3 の染色体領域（29.8Mb～47.6Mb）においては、肝臓で発現変動している遺伝子が検出されなかったことから標的臓器が肝臓ではない可能性が示された。今後は組織重量が肝臓と逆相関傾向を示す精巣上体脂肪のマイクロアレイ解析を行い、R3 の SM/J 領域に存在する候補遺伝子の抽出を目指す。

nafld, high-fat diet, congenic mice

講演番号：2F11p17
講演日時、会場：3 月 27 日 17:26～ F 校舎 11 会場

薬物誘導性急性肝障害に及ぼす線溶阻害剤の影響

The effect of anti-fibrinolytic agent on acute liver injury.

○三浦 徳[2]、鎌倉 美和子[1]、久保 美咲[1]、御子柴 直紀[1]、細野 崇[1,2]、関 泰一郎[1,2]([1]日本大生資科、[2]日本大院生資科)
○Atsushi MIURA[2], Miwako KAMAKURA[1], Misaki KUBO[1], Naoki MIKOSHIBA[1], Takashi HOSONO[1,2], Taiichiro SEKI[1,2] ([1]Nihon Univ., [2]Nihon Univ. Grad. School)

【背景・目的】血液の流動性は凝固系と線溶系のバランスにより厳密に制御されている。線溶系は、血管内における血栓の分解・除去以外にも細胞外マトリクスの分解や増殖因子の活性化、単球/マクロファージ（以下 MΦ）の機能制御などを介して、がんの浸潤・転移や創傷治癒、炎症応答をはじめとする多様な生命現象に重要な役割を担っている。肝臓は薬物やウイルスによる障害、物理的な損傷を受けても、分化機能を維持したまま著しい再生能力を発揮する。これまでに演者らは、線溶阻害酵素 Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor が肝再生に対して抑制的に働くことを 2/3 部分肝切除および四塩化炭素（以下 CCl_4）誘導性急性肝障害モデルラットを用いて明らかにした（Okumura N *et al.*, 2009, JBC)。また、薬物誘導性急性肝障害モデルマウスにおいて、線溶阻害剤トラネキサム酸（以下 TXA）の同時投与が肝障害を著しく減弱すること、線溶系因子ノックアウトマウスにおいて肝修復過程における MΦ の機能発現に線溶系因子が密接に関与することなどが明らかにされている。しかしながら、薬物誘導性の急性肝障害の回復過程における線溶系や MΦ の機能については十分に解明されていない。本研究では、CCl_4 誘導性急性肝障害マウスモデルを用いて、肝再生における線溶系機能の解明を目的として基礎的な検討を行った。【方法】C57BL/6J マウス（8-10 週齢、雄性）を 15 時間絶食後、CCl_4（1.0 ml/kg 体重）を経口投与した。その後 TXA（600 mg/kg 体重）あるいは MΦ を枯渇させる目的でクロドロン酸リポソーム（100 μL/mouse；以下 Clodronate）を腹腔内投与した。CCl_4 投与後、経時的に肝臓および血液を回収し、血漿中 ALT および AST 活性をはじめとする各種生化学的パラメーター、肝臓中単球/マクロファージおよび炎症性サイトカイン、各種線溶系因子遺伝子の発現、肝再生関連タンパク質の発現、組織化学について検討した。【結果】肝障害マーカーである血漿 ALT/AST 活性は、CCl_4 投与後 48 時間で最大となった。CCl_4 投与 48 時間後に TXA および Clodronate を投与したところ、これらの薬剤投与後 24, 48 時間後の ALT/AST 活性にはほとんど差がなかった。現在、肝臓の組織化学的な解析ならびに各種遺伝子発現について測定中である。また、TXA, Clodronate 投与後 72 時間以降の回復期の肝組織についてさらに検討を行っている。【結語】TXA, Clodronate の投与は急性期の肝障害を抑制しない可能性が明らかになった。

Fibrinolysis, Liver regeneration

講演番号：2F11p18
講演日時、会場：3 月 27 日 17:37～ F 校舎 11 会場

trans,trans-2,4-デカジエナールは、ラットにおいて腸管への作用を介して胃排出を抑制する
Luminal *trans,trans*-2,4-decadienal reduces gastric emptying in rats.
○矢萩 明日香[1]、比良 徹[1]、西村 紗希[2]、境野 眞善[2]、山下 貴稔[2]、原 博[1] ([1]北海道大・院農・応生科、[2](株)J-オイルミルズ　基盤研究所)
○ Asuka YAHAGI[1], Tohru HIRA[1], Saki NISHIMURA[2], Masayoshi SAKAINO[2], Takatoshi YAMASHITA[2], Hiroshi HARA[1] ([1]Division of Applied Biosciences, Graduate School of Agriculture, Hokkaido University, [2]J-Oil Mills, Inc.)

【背景】*trans, trans*-2,4-デカジエナール（2,4-デカジエナール）は、油脂の酸化分解によって生じる不飽和アルデヒドの一種であり、これまでにマウス小腸由来の消化管内分泌細胞株 STC-1 からのコレシストキニン分泌を強く促すことが見出され、消化管ホルモン産生細胞への直接作用が示された。消化管ホルモンは、胃排出遅延・膵酵素分泌促進・食欲抑制など様々な生理作用を持つことから、本研究では、ラットへの 2,4-デカジエナールの経口投与が、消化管での作用を介して胃排出に影響するかを検討した。
【方法】実験には 6～10 週齢の SD 系雄性ラットを用いた。胃排出能評価のため、アセトアミノフェン（吸収性マーカー）、フェノールレッド（非吸収性マーカー）、および溶解助剤としてカルボキシメチルセルロースナトリウム塩（1.5%）を含む溶液を経口投与した。まず、2,4-デカジエナール経口投与が引き起こす胃排出遅延作用の濃度依存性を検証するため、試料（10～100 mg/kg 2,4-デカジエナール）を経口投与後、120 分まで尾静脈より経時的に採血を行い、血漿中アセトアミノフェン濃度を測定した。続いて、2,4-デカジエナールの作用部位を検証するため、試料（25 mg/kg 2,4-デカジエナール）を経口または腹腔内に投与し、同様に経時的に尾静脈を採取し血中アセトアミノフェン濃度を測定した。さらに 2,4-デカジエナールを経口もしくは腹腔内投与後、15 分に麻酔下で放血致死し、回収した胃内容物に含まれるフェノールレッド量から胃排出率を算出した。
【結果と考察】試料を経口投与後、30 分までの尾静脈血中アセトアミノフェン濃度は、2,4-デカジエナール（10～100 mg/kg）の投与量に依存して有意に低値を示し、その作用の持続性も用量依存的であった。このことから、2,4-デカジエナールの経口投与は 10 mg/kg 以上の用量で胃排出を抑制することが示唆された。また、2,4-デカジエナール（25 mg/kg）腹腔内投与は、経口投与後のような明確なアセトアミノフェン濃度の上昇抑制作用を示さなかった。さらに、非吸収性マーカーのフェノールレッドを用いた試験において、高用量（100 mg/kg）の 2,4-デカジエナールの経口もしくは腹腔内投与したところ、経口投与群でのみ胃排出率の有意な低下が確認された。これらの結果から、2,4-デカジエナールは腸管への作用を介して、胃排出遅延作用を引き起こすことが明らかとなった。

trans,trans-2,4-decadienal, gastric emptying

講演番号：2F11p19
講演日時、会場：3 月 27 日 17:48～ F 校舎 11 会場

Modulation of immune-related gene expressions in mesenteric lymph nodes of the rats fed cholic acid-supplemented diet

○GA HYUN JOE[1], Misaki Tsuji[1], Reika Yoshitsugu[1], Keidai Kikuchi[1], Takuma Nose[1], Tada Koji[1], Hidehisa Shimizu[1], Jayoung Lee[1], Nanako Baba[1], Masahito Hagio[2], Satoru Fukiya[1], Atsushi Yokota[1], Hiroshi Hara[1], Satoshi Ishizuka[1] ([1]Division of Applied Bioscience, Graduate School of Agriculture, Hokkaido University, Hokkaido, Japan, [2]Faculty of Life Science, Toyo University, Gunma, Japan)

Background & aim

Ingestion of cholic acid (CA) not only increases intestinal permeability, but induces fat accumulation in the liver. These results suggest that immune system is involved in fatty liver with the attenuation of intestinal barrier function. In this study, to investigate the effect of CA on immune functions, we analyzed the immune-related gene expressions in mesenteric lymph nodes of the CA-fed rats.

Methods

WKAH/HkmSlc male rats were fed an AIN-93G-based diet with or without the CA supplementation (0.5 g/kg diet) for 13 weeks. Intestinal permeability was analyzed every 4 weeks, using Cr-EDTA as permeability marker. Also, the feces were collected every two weeks during the experiment and analyzed the bile acid (BA) composition. Mesenteric lymph nodes were collected at week 13 to analyze immune-related gene expressions with PCR array.

Results

The CA ingestion decreased expression of some immunity-related genes such as Il10, Tnfα, and Il4 in the mesenteric lymph nodes. It is possible that BA milieu affects immune response to be evoked by attenuation of intestinal barrier function induced by CA ingestion. We are now trying to confirm changes in inflammatory related gene expressions induced by the CA ingestion by using real-time PCR.

Bile acid, Cholic acid, Mesenteric lymph nodes

講演番号：2F12a02
講演日時、会場：3 月 27 日 09:11～ F 校舎 12 会場

タンパク質合成制限によるヒト細胞老化の抑制

Restriction of protein synthesis reverses cellular senescence

○高氏 裕貴[1]、和田 卓巳[1]、工藤 生[1]、三木 健輔[1,2]、藤井 道彦[1]、鮎澤 大[1,2]([1]横浜市大生命ナノシステム、[2]イチバンライフ（株））
○Yuki TAKAUJI[1], Takumi WADA[1], Ikuru KUDO[1], Kensuke MIKI[1,2], Michihiko FUJII[1], Dai AYUSAWA[1,2] ([1]Grad. Sch. of Naobiosci., Yokohama City Univ., [2]ICHIBAN　LIFE CORP.)

【背景と目的】　細胞老化はさまざまな方法によって、がん化・不死化細胞株を含め、すべての細胞種で誘導される。我々は細胞老化の分子機構の１つとして、「細胞老化の不均衡増殖理論」を提唱している。これは細胞障害による DNA 複製の遅延が高分子の不均衡増殖を引き起こし、細胞膨張と核膨張を経て、ヘテロクロマチンが崩壊する機構である。すでに、我々は高分子合成阻害剤や MAP キナーゼ阻害剤を用いて、生存率の低下を抑制できることを示している。今回、不均衡増殖を是正することにより、老化誘導剤の存在下で細胞はほぼ正常に増殖することを報告する。
【方法と結果】 HeLa細胞とヒト正常線維芽細胞系において、さまざまな老化誘導剤を用いて細胞老化を誘導した。このとき、低濃度のタンパク質合成阻害剤を投与すると、肥大化・扁平化といった細胞老化形態や老化特異的β-ガラクトシダーゼ活性が完全に抑制された。また、タンパク質合成阻害剤の最適濃度において、細胞はほぼ正常に増殖した。RNA合成阻害剤は同様な作用を示したが、タンパク質合成阻害剤より劣った。以上から、ほとんどの細胞老化誘導系において、高分子合成の不均衡が細胞老化の原因であることが示唆された。

Cellular senescence, Unbalanced growth, Cycloheximide

講演番号：2F12a03
講演日時、会場：3 月 27 日 09:22～ F 校舎 12 会場

表皮角化細胞の増殖を促進するアマラキ(Emblica officinalis)含有成分の解析

Analysis of the chemical compounds in emblica officinalis that promote the growth of epidermal keratinocytes

○森野 香子[1]、山上 義巳[1]、三木 健輔[1]、Mohammad N Hossain[2]、鮎沢 大[1,2]、藤井 道彦[1]([1]横浜市大生命ナノシステム、[2]イチバンライフ（株））
○ Kyoko MORINO[1], Yoshimi YAMAKAMI[1], Kensuke MIKI[1], Hossain Mohammad N[2], Dai AYUSAWA[1,2], Michihiko FUJII[1] ([1]Grad.Sch.of Naobiosci.,Yokohama City Univ., [2]Ichiban Life Corp.)

表皮の最も内側の基底層では、細胞分裂によって毎日新しい角化細胞（ケラチノサイト）が生まれている。角化細胞は後から分裂する細胞に徐々に押し上げられて角層に達し、角層細胞に変化する。その後約 2 週間かけて角層の一番上に達し、垢やふけとなってはがれ落ちる。このように基底層で新しい細胞が生まれてからはがれ落ちるまで、およそ 4 週間以上の周期で繰り返されている。しかしこのサイクルは加齢に伴い長くなることが知られている。そのため角化細胞の増殖を活性化し、新陳代謝を促進させることが美肌再生に重要である。我々は、インド亜大陸五千年の歴史を持つ伝承医学アーユルヴェーダで用いられるハーブに着目した。アーユルヴェーダは世界最大の植物利用学であり、現在ではインド亜大陸に留まらず欧米やアジアにも普及している。しかし、その膨大な知識はすべて経験と感性の世界にあり、その生理学的検証はほとんど行われていない。我々は、現地の専門大学と連携し、有望だと判断される 123 種類のハーブについて、ケラチノサイトの増殖促進作用を調べた。その結果、アマラキ（Emblica officinalis）は非常に顕著な細胞増殖の促進作用を示した。また、HPLC を用いてアマラキ抽出液の成分を画し、分取したフラクションの増殖促進作用を調べたので、それらの結果について報告する。

Ayurvedic herb, keratinocyte, Emblica officinalis

講演番号：2F12a04
講演日時、会場：3 月 27 日 09:33～ F 校舎 12 会場

可視単色光によるアポトーシス誘導メカニズムの解明

The mechanism of monochromatic visible light-induced apoptosis.

○中村 咲貴、西尾 貴史、寺田 千里、渡邊 博之、薬袋 裕二、佐藤 一臣（玉川大農）
○Saki NAKAMURA, Takashi Nishio, Chisato Terada, Hiroyuki Watanabe, Yuji Minai, Kazuomi Sato (Tamagawa Univ.)

【目的】動物種および細胞に与える紫外線の効果についてはこれまでに多くの報告がされている。紫外線は細胞のストレスを蓄積させることで細胞周期の停止、ゲノム DNA の損傷、細胞死を誘導することが知られている。しかしながら、可視光線が動物細胞の生理活性に与える影響についての情報は少ない。当研究グループでは、これまでに光量子束密度 150 μmol m^{-2} s^{-1} の青色光が B16F1 メラノーマ、B16F10 メラノーマの細胞内活性酸素量の増加とミトコンドリア膜電位の脱分極を顕著に誘導することを報告している [1)]。本研究ではアポトーシス誘導経路に着目し、可視光線とくに青色光の細胞死誘導メカニズムを解明することを目的とした。

【方法および結果】本研究では、マウス由来 B16F1 メラノーマ細胞株を用いて実験を行った。可視光線の照射は、LED 照射装置を CO_2 インキュベーター内に構築し、2 W m^{-2}、10 W m^{-2} の 2 群の照射強度に分けて実施した。細胞増殖能において、10 W m^{-2} の青色光を 30 分間照射した細胞で有意な増殖抑制が確認された。一方で赤色光照射群には増殖抑制効果は確認されなかった。さらに、青色光照射群において、細胞内活性酸素量の顕著な増加、ミトコンドリア膜電位の脱分極が確認された。Annexin V/PI 二重染色を行いフローサイトメトリーで解析した結果、青色光の照射によって annexin V 陽性細胞、annexin V 陽性/PI 陽性細胞の増加が認められた。また、アポトーシスの指標となる caspase-3 活性の上昇も検出された。

【考察】本研究の一連の結果から、青色光が特異的に細胞増殖の抑制、細胞死を誘導していることが明らかとなった。さらに、Phosphatidylserine の細胞膜露出、caspase-3 の活性化はアポトーシスの特徴であり、青色光がメラノーマのアポトーシスを誘導することが明らかとなった。

1) Sato K. *et al.*, *Cell Biol. Int.*, 37, 633-637 (2013)

visible light, apoptosis, blue light

講演番号：2F12a05
講演日時、会場：3 月 27 日 09:44～ F 校舎 12 会場

ブルーライトによるメラニン生成促進効果の検討

Study on blue light as a potential inducer of melanogenesis.

○西尾 貴史、佐藤 一臣（玉川大農）
○Takashi NISHIO, Kazuomi Sato (Tamagawa Univ.)

【目的】細胞は紫外線の照射を受けることによって、細胞ストレスの蓄積、ゲノム DNA の損傷誘導、過度の照射によっては細胞死も引き起こすことが知られている。さらに、紫外線は皮膚メラノサイトのメラニン生成を亢進させる効果も有する。当研究グループでは、これまでに波長 460 nm 付近の青色光がマウスメラノーマの細胞内活性酸素量を上昇させ、ミトコンドリア膜電位の脱分極を誘導することを報告している [1)]。本研究において、われわれはメラニン生成に関与するシグナル伝達系に着目し、青色光がメラニン生成を促進する可能性について調査を行った。

【方法】本研究では、マウス由来 B16F1 メラノーマ細胞株を用いて実験を行った。青色光の照射は、LED 照射装置を CO_2 インキュベーター内に構築し、2 W m^{-2}, 10 W m^{-2} の 2 群の照射強度に分けて実施した。DNA 損傷はコメットアッセイを用いて解析した。メラニン生成関連遺伝子の転写は半定量 RT-PCR 法を用いて実施した。関連タンパクの発現、リン酸化はウェスタンブロッティング法を用いて検出した。

【結果および考察】生体防御機構の一つであるメラニン生成は紫外線照射による DNA 損傷が引き金となり誘導される。本研究の結果から青色光の照射によって顕著な DNA 損傷が確認された。さらに細胞内においてメラニン生成は cAMP response element binding protein (CREB)のリン酸化、小眼球症関連転写因子(Microphthalmia-associated transcription factor; Mitf)の転写、チロシナーゼ発現などの経路を経て誘導される。ウェスタンブロッティング法、RT-PCR 法の結果から、青色光が CREB のリン酸化、Mitf の転写を誘導していることが明らかとなった。本研究の一連の結果から、メラニン生成に関与するカスケードに青色光が影響を与えていることが初めて明らかとなった。これは青色光がメラニン生成促進効果を有することを強く示唆するものであり、現在さらなる調査を進めている。

1) Sato K. *et al.*, *Cell Biol. Int.*, 37, 633-637 (2013)

blue light, melanogenesis, comet assay

講演番号：2F12a06
講演日時、会場：3 月 27 日 10:05～ F 校舎 12 会場

HT22 細胞におけるグルタミン酸誘導性細胞死の再評価

Reevaluation of glutamate-induced cell death in HT22 murine hippocampal cells

○佐藤 和典、山中 祐樹、朝倉 康晴、大谷-金子 律子、根建 拓（東洋大生命）
○ KAZUNORI SATO, YUKI YAMANAKA, YASUHARU ASAKURA, RITSUKO OHTANI-KANEKO, TAKU NEDACHI (Toyo Univ.)

脳虚血後再還流はグルタミン酸の過剰放出を伴い中枢神経系で神経細胞死を引き起こす。このグルタミン酸毒性には、少なくとも 2 種類の異なるメカニズムが関与しており、シスチン/グルタミン酸交換輸送系の抑制による酸化ストレスとグルタミン酸受容体を介した興奮毒性が知られている。マウス海馬由来神経細胞株である HT22 細胞はイオンチャネル共役型グルタミン酸受容体を持たないため、グルタミン酸誘導性酸化ストレスの研究に用いられてきたが、代謝型グルタミン酸受容体を所持していることが発見され、グルタミン酸依存的な酸化ストレスのメカニズムは単純ではない可能性が出てきた。このグルタミン酸誘導性の細胞死誘導メカニズムの詳細が明らかになれば脳虚血再還流傷害の新しい治療法へとつながる可能性が高い。そこで、本研究では HT22 細胞における酸化ストレス応答機構を精査するため、グルタミン酸と過酸化水素(H_2O_2)が HT22 細胞の細胞運命決定にどのような影響を及ぼすか、その効果の違いを調べることを目的とした。

まず、HT22 細胞に対し様々な濃度のグルタミン酸と H_2O_2 を添加し、細胞生存率を測定した結果、グルタミン酸と H_2O_2 は共に細胞死を誘導するが、MEK1/2 の特異的阻害剤である U0126 を同時添加することによって、グルタミン酸による細胞死のみが抑制できることが分かった。この結果から、グルタミン酸と H_2O_2 は HT22 細胞において異なる機構を介して細胞死を誘導している可能性が示唆された。次に、我々はグルタミン酸と H_2O_2 が HT22 細胞の細胞内シグナル伝達系にどのような影響を及ぼしているか精査するため、Erk1/2 の活性化について 0～24 時間の時間依存的な変化を調べた。その結果、細胞死に影響を及ぼさない低濃度のグルタミン酸と H_2O_2、細胞死を引き起こす高濃度の H_2O_2 添加時には添加後 1 時間以内での早い Erk1/2 活性の上昇のみが測定されたが、高濃度のグルタミン酸添加時は添加後 1 時間での早い活性化と 16～24 時間での持続的な活性化が測定された。さらに、この持続的な Erk1/2 の活性化がグルタミン酸依存的な細胞死に関与するか調べるためにグルタミン酸添加後に異なる時間で U0126 を添加した結果、グルタミン酸添加後 6 時間以内に U0126 を添加することで細胞死が抑制されることが分かった。また、代謝性グルタミン酸受容体がグルタミン酸依存的な細胞死誘導機構に関与するかどうか代謝性グルタミン酸受容体のアンタゴニストである AIDA と MPEP をグルタミン酸と同時添加したが、細胞死抑制効果は見られなかった。

これらの結果から、HT22 細胞におけるグルタミン酸誘導性細胞死には持続的な Erk1/2 活性化が関与し、この細胞死誘導機構に代謝性グルタミン酸受容体は関与しないことが示唆された。

Ht22, Glutamate, Erk1/2

講演番号：2F12a07
講演日時、会場：3 月 27 日 10:16～ F 校舎 12 会場

中枢神経系癌細胞の細胞増殖関連タンパク質に対するグリチルレチン酸の影響

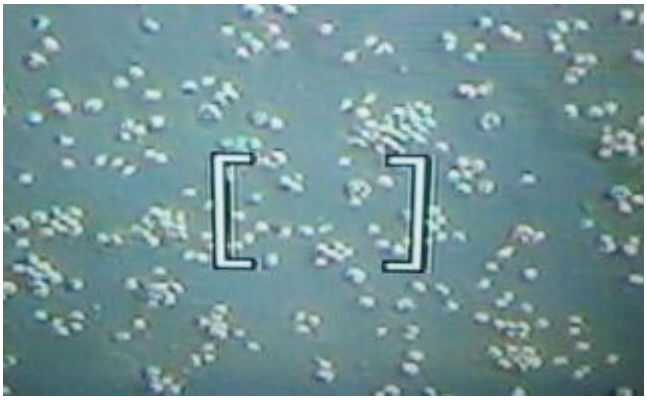
Effects of glycyrrhetinic acid on the expression of a cell proliferation-related protein in a tumorigenic CNS cell line

山口 真弘[1]、服部 孝弘[1]、野下 俊朗[2]、梅津 博紀[3]、○山口 秀明[1] ([1]名城大薬、[2]県立広島大生命、[3]岐阜聖徳学園大)
Masahiro YAMAGUCHI[1], Takahiro HATTORI[1], Toshiro NOSHITA[2], Hironori UMETSU[3], ○Hideaki YAMAGUCHI[1] ([1]Meijo Univ., [2]Pref. Univ. Horoshima, [3]Gifu Shotoku Gakuen Univ.)

【目的】我々は、これまで甘草の成分であるグリチルレチン酸（GA）が、中枢神経系の癌細胞の１つである r/m HM-SFME-1 細胞の増殖を選択的に抑制することを解明してきたが、さらに強力な癌細胞選択毒性を持つ GA 誘導体の開発が急務となっている。本研究においては、GA ベンジルアミド誘導体の選択的抗癌作用を明らかにするとともに、細胞増殖関連のタンパク質（β-カテニン）に対する影響を明らかにする。

【方法】細胞増殖は経時的位相差顕微鏡比較撮影法、タンパク質（β-カテニン）の細胞局在性は免疫蛍光染色法を使用した。

【結果】GA ベンジルアミド誘導体は r/m HM-SFME-1 細胞の増殖を選択的に抑制することが明らかとなった。さらにβ-カテニンに対し、GA ベンジルアミド誘導体がその発現量および細胞局在性に影響を及ぼすことで、癌細胞の増殖能力の低下およびアポトーシス誘導を促進し癌細胞に対する選択的毒性に関わっている可能性が示唆された。



r/m HM-SFME-1 細胞における
GA ベンジルアミド誘導体の増殖抑制

glycyrrhetinic acid, cancer, b-catenin

講演番号：2F12a08
講演日時、会場：3 月 27 日 10:27～ F 校舎 12 会場

血清アルブミンによるシクロオキシゲナーゼ－２の発現誘導

Induction of cyclooxygenase-2 expression by serum albumin

○中島 史恵、柴田 貴広、内田 浩二（名大院生命農）
○Fumie NAKASHIMA, Takahiro SHIBATA, Koji UCHIDA (Nagoya Univ.)

【背景・目的】血中の主要なタンパク質である血清アルブミンは浸透圧維持や脂肪酸、ホルモン等の保持・搬送など生体の恒常性維持に関与している。これまでに当研究室において慢性疾患であるヒトアテローム動脈硬化病巣においてアルブミンの蓄積が起きていること、血清アルブミン画分のマクロファージ細胞への投与によりシクロオキシゲナーゼ-2（COX-2）の発現を誘導することが確認されている。そこで本研究では血清アルブミンによる COX-2 発現誘導機構について解析を行うこととした。昨年度の本大会において、血清アルブミンによる COX-2 発現誘導には細胞膜コレステロールの引き抜きが関与していることを報告した。今回は主に細胞膜コレステロールの引き抜きにより活性化される細胞シグナルおよび血清アルブミンの酸化還元状態と COX-2 発現誘導の関わりについて報告する。
【方法・結果】RAW264.7 細胞にヒト血清アルブミン(HSA)を 4 時間投与し、ウエスタンブロットを行った結果、HSA の濃度依存的に COX-2 発現が誘導された。蛍光標識コレステロールである NBD-コレステロールを RAW264.7 細胞に 1 時間処理した後に HSA を 1 時間投与し、細胞を回収し蛍光を検出した結果、HSA の濃度依存的に細胞の NBD-コレステロール量が減少していた。そこで、コレステロールを豊富に含む細胞膜ドメインである脂質ラフトに着目して検討を行った。その結果、HSA の投与により脂質ラフトに変化が起きていることが明らかとなった。このことから HSA は細胞からコレステロールを引き抜くことにより脂質ラフトの構造を変化させ、下流のシグナル経路を活性化していると予想された。さらに、阻害剤を用いてシグナル経路の検討を行った結果、HSA の投与により上皮成長因子受容体（EGFR）がリン酸化されることが明らかとなった。また、アルブミンには酸化型と還元型が存在することが知られていることから、アルブミンの酸化・還元状態による COX-2 発現誘導の違いを検討した結果、酸化型アルブミンは還元型アルブミンと比較して COX-2 発現誘導能が強いことが明らかとなった。現在アルブミンの酸化・還元状態と COX-2 発現誘導の関係性について解析中である。

albumin, inflammation, cholesterol

講演番号：2F12a09
講演日時、会場：3 月 27 日 10:38～ F 校舎 12 会場

マウス小腸陰窩オルガノイドにおけるセロトニン自己分泌刺激

Autocrine secretion of serotonin in crypt organoid induced from murine small intestine

濱田 晃弘[1]、鶴田 剛司[2]、青木（吉田） 綾子[3]、○園山 慶[2]([1]北大院生命、[2]北大院農、[3]農研機構・畜草研)
Akihiro Hamada[1], Takeshi Tsuruta[2], Ayako Aoki-Yoshida[3], ○Kei Sonoyama[2] ([1]Grad. Sch. Life Science, Hokkaido Univ., [2]Res. Fac. Agr., Hokkaido Univ., [3]NARO-NILGS)

【目的】セロトニン（5-hydroxytryptamine、5-HT）は消化管の運動、分泌および知覚に関与するシグナル分子であり、精神的ストレスが発症要因と考えられている過敏性腸症候群の病態にも関わっている。消化管において 5-HT は腸上皮のクロム親和性細胞が産生・分泌し、主として神経細胞に存在する 5-HT 受容体を介して生理機能を発現するが、上皮細胞におよぼす影響は不明な部分が多い。本研究では、腸上皮細胞のみから構成される培養組織である腸管オルガノイドを、Sato *et al.* (2009) にしたがって作成し、添加した 5-HT が腸上皮細胞の 5-HT 産生・分泌に影響するか否かを解析した。
【方法】C57BL/6 マウスの小腸を摘出して 2 mM EDTA/PBS でインキュベートすることにより陰窩を分離し、増殖因子（EGF、R-spondin 1 および Noggin）添加 Advanced DMEM/F12 培地を用いて Matrigel 内で三次元培養することによりオルガノイドを誘導した。培養 5 日目に 5-HT（5 ng/mL）添加培地に交換して 24 時間培養した。培地中の 5-HT 濃度の経時変化を ELISA により追跡し、培養終了時のオルガノイドにおける 5-HT 合成律速酵素（Trp hydroxylase、TPH）遺伝子発現レベルを RT-qPCR により比較した。5-HT 分泌を刺激する陽性対照としてカルシウムイオノフォア（10 μM イオノマイシン）を用いた。また、マウス小腸粘膜組織およびオルガノイドにおける 5-HT 受容体遺伝子発現を RT-PCR により解析した。
【結果】5-HT 添加後 60 分以内に陽性対照であるイオノマイシンの添加に匹敵する 5-HT 濃度の上昇（～18 ng/mL）がみられ、その後は低下していった。24 時間後の TPH mRNA レベルにおいてイオノマイシンおよび 5-HT 添加の影響はみられなかった。先行研究より小腸粘膜での発現が想定された 5-HT 受容体遺伝子（*5-HT2A*、*2B*、*2C*、*3A*、*3B* および *4*）のうち、マウス小腸粘膜組織においてはすべての転写産物が確認できたが、オルガノイドにおいては *5-HT2A*、*2B* および *4* のみが認められたので、腸上皮細胞は *5-HT2A*、*2B* および *4* を発現するものと推察された。以上の結果は、マウス小腸粘膜上皮のクロム親和性細胞が産生・分泌する 5-HT はクロム親和性細胞自身が発現する 5-HT2A、2B および 4 受容体を介したシグナリングにより 5-HT 分泌を刺激することを示唆している。すなわち、小腸上皮のクロム親和性細胞は 5-HT のオートクリン分泌を介してストレス応答を増幅させていると推察することができる。現在、5-HT 受容体のアゴニストおよびアンタゴニストを用いてオルガノイドの 5-HT 分泌を解析するとともに、免疫染色を用いてマウス小腸粘膜組織およびオルガノイドにおいてクロム親和性細胞が 5-HT 受容体タンパクを発現するか否かを確認している。

Serotonin, Small intestine, Organoid

講演番号：2F12a10
講演日時、会場：3 月 27 日 10:49～ F 校舎 12 会場

TGF-βによるマスト細胞機能の抑制を仲介する転写因子 Ehf の機能解析
Functional analysis of the transcription factor Ehf, which mediates TGF-β-induced suppression of mast cell functions

○中野 信浩[1]、山崎 晋[1]、西山 千春[1,2]、大塚 宜一[1]、清水 俊明[1]、奥村 康[1]、小川 秀興[1] ([1]順天堂大院・医、[2]東京理科大・基礎工)
○Nobuhiro NAKANO[1], Susumu YAMAZAKI[1], Chiharu NISHIYAMA[1,2], Yoshikazu OHTSUKA[1], Toshiaki SHIMIZU[1], Ko OKUMURA[1], Hideoki OGAWA[1] ([1]Juntendo Univ., [2]Tokyo Univ. of Science)

【目的】TGF-β はマスト細胞の IgE レセプターFcεRI 及び stem cell factor (SCF) レセプターc-Kit の発現を抑制し、FcεRI 架橋刺激に伴う脱顆粒及びサイトカイン産生を抑制することが知られている。しかし、TGF-β によってこれら一連の反応が引き起こされる分子的なメカニズムは不明である。本研究において、TGF-β 存在下で培養されたマスト細胞では転写抑制因子 Ets homologous factor (Ehf) の発現が増強されることを見出したことから、Ehf の役割について詳細な解析を行った。
【方法】BALB/c マウスから採取した骨髄細胞を IL-3 と SCF 存在下で培養して得た骨髄由来培養マスト細胞を用いて、TGF-β に対する応答を解析した。また、骨髄由来培養マスト細胞にレトロウイルスベクターを用いて Ehf cDNA を導入し、Ehf を強制発現させたマスト細胞を作製した。
【結果】TGF-β 存在下で培養されたマスト細胞では、FcεRI を構成するサブユニット α, β, γ それぞれの mRNA 及び c-Kit mRNA の発現低下と Ehf mRNA の発現増加が見られた。また、FcεRI と c-Kit 発現の正の制御因子 GATA-1, GATA-2, PU.1 の mRNA 発現が低下していた。Ehf 遺伝子を強制発現させると細胞表面の FcεRI と c-Kit 発現量が低下し、FcεRIα, FcεRIβ, c-Kit 及び GATA-1, GATA-2 の mRNA 発現がそれぞれ低下した。さらに、Ehf の強制発現は FcεRI 架橋刺激に伴う脱顆粒とサイトカイン産生を有意に抑制した。TGF-β 存在下で培養されたマスト細胞ではサイトカイン産生に重要な転写因子 STAT5B 発現が低下していたが、Ehf を強制発現させたマスト細胞においても同様に STAT5B の発現低下が見られた。これらの結果から、TGF-β に対するマスト細胞の応答の一部は Ehf の強制発現によって模倣できることが示された。
【結論】マスト細胞において、TGF-β によって誘導される FcεRI と c-Kit の発現低下及び脱顆粒とサイトカイン産生の抑制には、転写抑制因子 Ehf による GATA-1, GATA-2, STAT5B の発現抑制が寄与していると推測される。

Mast cell, TGF-β, Transcription factor

講演番号：2F12a11
講演日時、会場：3 月 27 日 11:10～ F 校舎 12 会場

加齢に伴う B 細胞機能変化における MAPKp38 の関与

Functions of MAPKp38 in aging-associated phenotypic changes of B cells

○藤木 司[1]、片倉 喜範[2]、岸原 健二[1] ([1]長崎国際大薬、[2]九大院農院)
○Tsukasa FUJIKI[1], Yoshinori KATAKURA[2], Kenji KISHIHARA[1] ([1]Nagasaki Int. Univ., [2]Kyushu Univ.)

【目的】

加齢に伴う免疫老化についてこれまでにストレス MAPK として知られる p38 が B 細胞における細胞の分裂老化において重要な役割を果たしていると考えられており、本研究では加齢に伴う免疫機能低下における炎症性シグナル、抗原提示機能への p38 の関与について検証を行った。

【方法】

高齢者（65 歳）および若年者（22 歳）より採取した B 細胞を EB ウィルスによって不死化した細胞株（EBV-B old、EBV-B young）を実験に供し、ELISA 法による抗体産生能測定、PhosFlow assay による細胞内リン酸化タンパク質解析、フローサイトメーターによる細胞表面発現分子解析、体外免疫法による抗原感作能解析、DNA マイクロアレイによる発現遺伝子の網羅的解析を行った。

【結果・考察】

EBV-B 細胞における抗体産生の比較において, EBV-B young は EBV-B old より優位に IgM 抗体を産生する傾向を示し、一方で EBV-B old における IgG 抗体産生は反対に EBV-B young より高く、EBV-B young においては著しく発現が見られなかった。また、体外免疫法（IVI）によって抗原感作能について検討したところ、EBV-B old において感作能の減退が観察された。さらに PhosFlow assay を用い MAPKp38 および NF-kB 活性化状態について検証したところ、EBV-B old で p38 および NF-kB が優位に活性化していることが明らかとなった。EBV-B old における NF-kB の優位な活性化は、B 細胞の細胞老化に伴い亢進した炎症性シグナルによるものであると考えられる。そこでさらに免疫応答における T-B 細胞間のシグナル相互作用に重要であることが知られている分子である CD40,CD86,HLA-DR の発現に関して解析した。その結果、EBV-B old において CD40 および HLA-DR の発現は減少し、CD86 発現は増加していた。その中で HLA-DR 発現の低下は MAPK p38 阻害剤である SB203580 処理により回復したことから、EBV-B old における p38 を介したシグナルが HLA-DR の発現を制御すると同時に、T-B 細胞間相互作用における機能低下を導いている可能性が考えられた。このように p38 活性化は免疫システムにおける様々な加齢の表現型を誘導する可能性が考えられた。

p38, Immunosenescence, B cell

講演番号：2F12a12
講演日時、会場：3 月 27 日 11:21～ F 校舎 12 会場

C2C12 筋管細胞における収縮依存的な RANTES の分泌制御

Contraction-dependent regulation of RANTES in C2C12 myotubes

○佐藤 整、柴垣 拓也、佐藤 和典、根建 拓（東洋大生命科学）
○HITOSHI SATO, TAKUYA SHIBAGAKI, KAZUNORI SATO, TAKU NEDACHI (Toyo Univ.)

運動は骨格筋での代謝を直接亢進させるとともに筋発達を促進して体全体での基礎代謝を上昇させることが知られている。一方、近年、運動は骨格筋以外の組織に対しても影響を及ぼすことが明らかにされてきた。例えば、運動による免疫機能の調節、脂肪組織における脂肪分解の促進、脳神経系における神経新生の促進が挙げられる。以前の研究から、骨格筋細胞からインターロイキン 6（IL-6）が分泌されることがわかっており、骨格筋で生じる収縮は IL-6 のような運動依存性分泌タンパク（運動因子）を介して他組織に伝達されることが示唆されている。一方、運動因子の種類、発現制御、生理作用については不明な点が多く残っている。本研究では、骨格筋研究の有用なモデルである C2C12 細胞を用いて、骨格筋由来の運動依存的分泌タンパクの種類の特定と発現制御機構を明らかにすることを目的とした。

まず、電気パルス刺激（EPS）を用いた収縮に依存して C2C12 細胞から分泌されるタンパク質の変動を明らかにするために、抗体アレイ（Proteome Profiler)を用いた分析を行った。その結果、EPS 処理依存的に分泌変動する複数の分泌タンパクが確認され、特に EPS 処理をした場合、CCl5 (RANTES)と CXCL10（IP-10)の分泌量が減少していることが明らかとなった。次に特に顕著な収縮依存的な分泌減少を示した RANTES の発現機構を明らかにするため、リアルタイム PCR を用いて遺伝子発現を調べたところ、EPS 処理をした C2C12 細胞において RANTES の遺伝子発現量が有意に減少していることがわかった。このことから、収縮依存的な RANTES 分泌低下の少なくとも一部は遺伝子発現量抑制によって制御されていることが示唆された。次に収縮依存的な RANTES 分泌低下に重要な細胞内シグナル伝達経路を明らかにすることを目的に、各種シグナルの活性化剤や阻害剤を添加した際の RANTES 分泌変化を調べた。その結果、AMPK 活性化剤（AICAR）処理により RANTES の分泌低下が観察されること、PI3K 阻害剤処理は RANTES 分泌量を上昇させることが明らかとなり、AMPK と PI3K の活性化が RANTES の発現の抑制に関与していることが示唆された。

以上の研究により、運動によって骨格筋からの RANTES 分泌が低下すること、さらにその分泌低下を制御する細胞内シグナル伝達を同定することに成功した。これまでに RANTES は Th1 細胞や好酸球・好塩基球の炎症部位への誘引や NK 細胞の増殖、活性化に重要であることがわかっており、今回発見された運動依存的な RANTES 分泌低下は、運動依存的な免疫変動の一部を担う機構であることが示唆される。

contraction, skeletal muscle, secreted protein

講演番号：2F12a13
講演日時、会場：3 月 27 日 11:32～ F 校舎 12 会場

ナトリウム利尿ペプチド受容体 C の新規結合タンパク質同定
Identification of Natriuretic Peptide Receptor-C interacting protein
○宮本 賢治、清水 友紀、松田 真弥、辻 明彦、湯浅 恵造（徳島大学）
○ Kenji MIYAMOTO, Yuki SHIMIZU, Shinya MATSUDA, Akihiko TSUJI, Keizo YUASA (Tokushima Univ.)

ナトリウム利尿ペプチド(NP)は、atrial natriuretic peptide (ANP)、brain natriuretic peptide (BNP)、および C-type natriuretic peptide (CNP)の 3 種類から構成され、心臓や血管、体液量の恒常性維持などの重要な役割を担うペプチドホルモンである。NP の受容体には、細胞内領域にグアニル酸シクラーゼドメインを有する natriuretic peptide receptor (NPR)-A および NPR-B と、有さない NPR-C の計 3 種類のサブタイプが存在し、NPR-A と NPR-B は NP が結合すると細胞内セカンドメッセンジャーである cGMP を産生する。一方、NPR-C は血中 NP のクリアランスに関わるとされている。しかしながら、NPR-C は G タンパク質と共役し、アデニル酸シクラーゼによる cAMP 産生を阻害すること、また、MAPK 活性を阻害することなどが報告されており、NPR-C は NP のクリアランス以外の生理機能も有する可能性が考えられている。しかしながら、その詳細な分子機構については未だほとんど解明されていない。

そこで、本研究では、NPR-C のクリアランス以外の新たな生理機能およびその分子機構を明らかにするために、NPR-C と相互作用するタンパク質の探索を行った。Strep タグ NPR-C を HEK293 細胞に遺伝子導入し、Strep プルダウンアッセイを行った後、質量分析法により NPR-C 結合タンパク質として basic leucine zipper and W2 domain-containing protein 2 (BZW2)を同定した。BZW2 には約 70%のアミノ酸相同性を示す BZW1 が存在するが、BZW1 は NPR-C と結合を示さず、NPR-C への結合は BZW2 に特異的であった。また、免疫細胞染色により NPR-C と BZW2 の細胞内局在を調べた結果、BZW2 を単独発現させた細胞では BZW2 は細胞質に局在したのに対して、共発現させた細胞では一部の BZW2 が細胞膜に移行し、NPR-C と共局在した。興味深いことに、NPR-C のリガンドである ANP および CNP により細胞を処理した後、プルダウンアッセイを行った結果、BZW2 はリガンド濃度依存的に NPR-C から解離することが明らかにされた。現在、NPR-C の欠損変異体を作製し、BZW2 との結合に関わる領域の同定を行っており、合わせて報告したい。

Natriuretic peptide receptor, Protein interaction

講演番号：2F12a14
講演日時、会場：3 月 27 日 11:43～ F 校舎 12 会場

SUMO リガーゼ PIASy によるパーキンソン病関連転写因子 PARIS の転写活性調節

PIASy regulates PARIS transcriptional activity and acts as an E3-SUMO ligase towards PARIS.

○西田 有、山田 芳司（三重大・生命科学研究支援センター）
○Tamotsu Nishida, Yoshiji Yamada (Mie Univ. Life Sci. Res. Center)

KRAB-Zn フィンガー転写抑制因子 PARIS/ZNF746 は家族性パーキンソン病の原因遺伝子 *parkin* の産物であるユビキチンリガーゼ Parkin の新たな基質として同定された(Shin et al. Cell 2011)。PARIS はヒトのパーキンソン病患者の脳に蓄積し、転写コアクチベーターPGC-1α とその標的遺伝子の発現を抑制することによりドーパミン神経の変性に深く関与していることが示唆されている。しかし、PARIS の転写抑制の制御機構はほとんど明らかにされていない。
ユビキチン様タンパク質 SUMO は翻訳後修飾により様々な細胞内プロセスを制御していることが知られている。既に KRAB-Zn フィンガーファミリー転写因子を含む多くの転写抑制因子において SUMO 化による制御が明らかにされていることから、我々は PARIS の転写抑制活性が SUMO 化によって制御されているのではないかと考え研究を進め、2014 年度大会において以下のような結果を報告した。①PARIS は in vitro, in vivo において SUMO 化される。②KRAB ドメインに隣接した中央ドメインの２ヶ所のリシン残基が SUMO 化される。④培養細胞において PARIS は SUMO-1 核内スペックルに共局在する。⑤PARIS の SUMO 化は細胞種、プロモーター依存的に転写活性を調節している。本大会では新たに PARIS の SUMO 化の制御と転写活性調節に SUMO リガーゼ PIASy が機能していることを報告する。

Sumo, Paris, Parkinson's disease

講演番号：2F12p01
講演日時、会場：3 月 27 日 14:00～ F 校舎 12 会場

ヒトのミトコンドリア NAD キナーゼの細胞外環境に応答したリン酸化修飾

Growth condition-dependent phosphorylation of human mitochondrial NAD kinase

川畑 豊[1]、村田 幸作[2]、○河井 重幸[1] ([1]京大院農、[2]摂南大理工)
Yutaka KAWABATA[1], Kousaku MURATA[2], ○Shigeyuki KAWAI[1] ([1]Grad. Sch. Agric, Kyoto Univ., [2]Sci. Eng., Setsunan Univ.)

【背景】NAD キナーゼ（NADK）は、NAD^+のリン酸化による $NADP^+$の合成反応を触媒する唯一の酵素である。最近、当分野ではミトコンドリア局在性 NADK（mitNADK）を特定し、ヒトには細胞質局在性 NADK（cytNADK）と mitNADK が存在することが明らかとなった[1)]。mitNADK の最も顕著な特性は、cytNADK の活性が NAD^+濃度の変化に応じて大きく変動するのに対し、mitNADK は幅広い NAD^+濃度域（100 μM～）で弱い（V_{max} 値は cytNADK の V_{max} 値の約 1/200）ながらも一定の活性を示すという点にあると考えられる[1)]。タンパク質のリン酸化修飾は、タンパク質の機能制御の手段の一つである。近年、ヒト、マウス、およびラットの cytNADK と mitNADK の Ser、Thr、Tyr 各残基のリン酸化がフォスフォプロテオミクス解析により明らかにされている。本研究では、両 NADK のヒト細胞内における活性制御の仕組みを明らかにするために、両 NADK のリン酸化修飾に着目した。
【結果】模倣リン酸化 cytNADK 組換え精製酵素（リン酸化 Ser または Thr 残基を Asp 残基に置換）では *in vitro* における NADK 活性に大きな変化は見られなかった。一方、cytNADK と比較して活性が弱い mitNADK では模倣リン酸化による NADK 活性の上昇を期待したが、各模倣リン酸化 mitNADK 組換え精製酵素（mitNADK T183D、S188D、S289D、S289E、S294D、T357D、および S376D）の *in vitro* における NADK 活性は低下した（同 S345D、S363D、および S367D の活性は変動しなかった）。特に、mitNADK S188D の活性は完全に消失した。さらに、ヒト HEK293A 細胞から免疫沈降で回収した mitNADK の Ser および Thr 残基のリン酸化も検出された。ヒト mitNADK Ser-188 のリン酸化は、複数のフォスフォプロテオミクス解析で検出されている。さらに Ser-188 は mitNADK のホモログ間に高度に保存されており、かつ同ホモログに特有な Motif 2 に存在するため、Ser-188 のリン酸化は重要な役割を有する可能性があると推察された。さらに Phos-tag SDS-PAGE 分析により、ヒト HEK293A 細胞における、酸化ストレスや高濃度グルコースによる mitNADK のリン酸化の誘導が検出された。

[1)] Ohashi et al. Nat. Commun. 3:1248 (2012) doi:10.1038/ncomms2262

mitochondria, phosphorylation, NAD kinase

講演番号：2F12p02
講演日時、会場：3 月 27 日 14:11～ F 校舎 12 会場

Death-associated protein kinase-2 (DAPK2)と tubulin の相互作用解析及びアポトーシスへの関連性
Interaction between death-associated protein kinase-2 (DAPK2) and tubulin is associated with apoptosis.

○一色 衣香[1,2]、平瀬 大志[1]、辻 明彦[1]、湯浅 恵造[1] ([1]徳島大 STS 研究部、[2](独)日本学術振興会特別研究員 DC1)
○Kinuka ISSHIKI[1,2], Taishi HIRASE[1], Akihiko TSUJI[1], Keizo YUASA[1] ([1]Tokushima Univ., [2]JSPS Research Fellow)

Death-associated protein kinase-2 (DAPK2)は、細胞死やガン抑制に関連する DAPK ファミリーに属する Ca^{2+}/calmodulin (CaM)依存性プロテインキナーゼであり、様々な刺激に応答してアポトーシスを誘導することが知られている。我々は、これまでに、DAPK2 と相互作用するタンパク質としてヒト乳癌細胞 MCF7 細胞より 14-3-3 タンパク質を同定し、14-3-3 タンパク質との相互作用によって DAPK2 のキナーゼ活性が阻害されることを明らかにしてきた。しかしながら、未だ DAPK2 の下流シグナル伝達経路の解明には至っておらず、本研究では、DAPK2 の新たな結合タンパク質の同定を試みた。Strep タグ DAPK2 をヒト子宮頸癌 HeLa 細胞およびヒト胎児由来腎臓細胞 HEK293 細胞に遺伝子導入し、Strep プルダウンアッセイを行った。MCF7 細胞を用いたときと同様に、いずれの細胞からも結合タンパク質として約 30-31 kDa の 14-3-3 タンパク質に相当するバンドが得られた。加えて約 55 kDa の特異的なバンドが得られたため、質量分析法により解析した結果、細胞骨格の一つである微小管を構成するβ-チューブリンを同定した。そこで、内在性 DAPK2 が発現している HeLa 細胞を用いて、抗 DAPK2 抗体による免疫沈降を行った結果、内在性チューブリンとの結合が確認された。また、恒常活性型変異体である DAPK2 S299D は野生型と比較してチューブリンと強い結合を示した一方、不活性型変異体 DAPK2 S318E はチューブリンとほとんど相互作用を示さなかったことから、DAPK2 活性がチューブリンとの結合に関与していることが推測された。

α/β-チューブリンヘテロ二量体は、重合と脱重合を繰り返して細胞の機能を調節している。特に、有糸分裂において紡錘体の形成に重要な役割を果たしており、チューブリン重合阻害剤であるノコダゾールは微小管形成を阻害し、抗腫瘍活性効果を発揮する。DAPK2 とチューブリンの相互作用にノコダゾールがどのような影響を及ぼすか検討した結果、ノコダゾール処理によって DAPK2 とチューブリンの結合は増加し、また、DAPK2 過剰発現との協調作用により強いアポトーシスが誘導されることが示された。現在、ノコダゾールに加え、チューブリンの重合促進によってアポトーシスを誘導するパクリタキセルによる影響も検討しており、DAPK2 が微小管を標的としたこれら抗ガン剤とどのような関連性を有するのか合わせて報告したい。

apoptosis, tubulin, cancer

講演番号：2F12p03
講演日時、会場：3 月 27 日 14:22～ F 校舎 12 会場

アポトーシス関連因子 ALG-2 と CDIP1 の相互作用とアポトーシスへの関与
Interaction of ALG-2 with CDIP1 and its relevance to apoptosis

○鈴木 千尋、京 卓志、高原 照直、柴田 秀樹、牧 正敏 (名大院生命農・応用分子生命科)
○Chihiro SUZUKI, Takashi KANADOME, Terunao TAKAHARA, Hideki SHIBATA, Masatoshi MAKI (Dept. Appl. Mol. Biosci., Grad. Sch. Bioagric. Sci. Nagoya Univ.)

[背景と目的] ALG-2 (apoptosis-linked gene 2) は 191 アミノ酸からなるタンパク質で、分子内にカルシウム結合モチーフである EF-hand を 5 つ連続してもつ。アポトーシス関連因子を探索する過程で同定されたが、その機能は依然として分かっていない部分が多い。これまでに、ALG-2 の機能解明のためにカルシウム依存的に相互作用するタンパク質の探索が行われ、様々なタンパク質が同定されてきた。その中の多くはプロリンに富む領域 PRR (proline-rich region) をもつ。ALIX, PLSCR3, Sec31A については ALG-2 結合領域が同定され、その結果、2 種類の ALG-2 結合モチーフが明らかになった。 更なる標的タンパク質探索のため、ALG-2 結合モチーフをもつタンパク質をデータベースで検索したところ、CDIP1 が候補の 1 つとして挙げられた。CDIP1 (Cell Death Involved p53-target 1) は、208 アミノ酸からなる p53 応答性の遺伝子産物で、TNF-α の発現を促進することが報告されている。DNA 傷害で誘発されるアポトーシスが、CDIP1 を介して TNF-α の分泌を亢進することで caspase 8 依存的な外因性の経路を経由することは興味深い。本研究では、ALG-2 と CDIP1 の結合様式の詳細な解析を行うとともに、両者の結合が DNA 傷害で誘発されるアポトーシスに必要かどうかを検討することを目的とした。

[方法と結果] CDIP1 は、他の ALG-2 標的タンパク質と同様に PRR をもつ。HEK293 細胞に GFP 融合 CDIP1 と FLAG タグを付加した ALG-2 を過剰発現させたのち、カルシウム条件下、またはカルシウムをキレートした条件下で抗 GFP 抗血清を用いて免疫沈降を行ったところ、カルシウム条件下でのみ両者の結合が確認された。また、PRR 内の ALG-2 結合モチーフ (62-66 アミノ酸残基) の領域を欠損させた CDIP1 では、ALG-2 との結合が著しく低下した。HEK293 細胞に GFP 融合 CDIP1 を過剰発現させ、内在性 ALG-2 を標的とした共免疫沈降実験においても、同様の結果が得られた。これより、CDIP1 では 62-66 アミノ酸残基の領域が ALG-2 とのカルシウム依存な結合に重要であることが明らかになった。

野生型 p53 をもつ骨肉腫由来の U2OS 細胞に抗腫瘍剤エトポシドを添加してアポトーシス刺激をし、細胞内での CDIP1 と ALG-2 の発現量の変化と相互作用の解析を進めている。また、CDIP1 の過剰発現がアポトーシスを誘導する傾向がみられることから、CDIP1 と ALG-2 の結合がアポトーシスシグナルに必要であるかについても、今後研究を行う予定である。

ALG-2, calcium-binding protein, apoptosis

講演番号：2F12p04
講演日時、会場：3 月 27 日 14:33～ F 校舎 12 会場

カルシウム結合タンパク質 ALG-2 の 2 型結合モチーフに基づいた新規相互作用タンパク質探索
Search for novel interacting proteins of Ca^{2+}-binding protein ALG-2 based on type 2 binding motif
○松尾 里奈、小島 享介、張 維、高橋 健、佐々木 桂奈江、高原 照直、柴田 秀樹、牧 正敏 (名大院生命農・応用分子生命科)
○Rina Matsuo, Kyosuke Kojima, Wei Zhang, Takeshi Takahashi, Kanae Sasaki, Terunao Takahara, Hideki Shibata, Masatoshi Maki (Dept. Appl. Mol. Biosci., Grad. Sch. Bioagric. Sci. Nagoya Univ.)

【目的】ALG-2(Apoptosis-linked gene 2、別名 PDCD6)は、アポトーシス関連因子として発見され、細胞死、がん発生、シグナル伝達、小胞輸送などに関与する報告があるが、その詳細な作用機構は不明である。ALG-2 は分子内に５つの連続した EF-hand 構造をもち、Ca^{2+}に応答して様々なタンパク質と相互作用することが知られている。これまでに未同定な相互作用タンパク質も多く存在していると想像される。新規に相互作用因子を探索する場合、酵母 Two-Hybrid 法においては、ALG-2 はホモ 2 量体および peflin とのヘテロ 2 量体を形成するため、ALG-2 および peflin が優先的に得られる。また、共免疫沈降産物の質量分析による同定に際しても、量的に多く存在する既知因子が優先して得られる。したがって、さらなる未知の相互作用因子探索の場合、これらの方法による効率の悪さが問題となっていた。我々は、ALG-2 が Pro-rich 領域に存在する 2 種類の結合配列モチーフを認識することを明らかにしている。そして、独自に開発した検索プログラムを用いてアミノ酸配列データベースから候補配列を抽出し、ビオチン標識した ALG-2 をプローブとして用いた発現産物の Far Western (FW) 解析による小規模な半網羅的探索を行い、複数の新規相互作用因子を同定した(Osugi ら JB 2012; Sasaki-Osugi ら JBC 2013)。しかし、結合が弱い、あるいは検出されなかったものが多数存在し、検索に用いた結合モチーフの配列情報が不十分であったと考えられる。そこで本研究では検索の改良を試みた。
【方法と結果】従来、2 型結合モチーフを PXPGF と定義していたが、新たに定義した 7 残基からなるモチーフ(高橋 ら 投稿中)を用いてデータベース UniProt を検索した。いくつかの相互作用因子候補が得られたが、スコアの高い 13 のタンパク質を選び、Pro-rich 領域や他の特徴的ドメインなど部分断片あるいは全長の GFP 融合タンパク質の発現プラスミドを作製した。HEK293T 細胞に DNA をトランスフェクションして、抗 GFP 抗体を用いて細胞溶解液から GFP 融合タンパク質を免疫沈降した。そして免疫沈降産物の SDS-PAGE 分離後、FW 解析を行った結果、SARAF、SHISA4、FNDC3A、DIAPH3、cTAGE5 において FW の強いシグナルが検出された。現在、これらのタンパク質について、GFP 融合タンパク質を Ca^{2+}存在下、非存在下で免疫沈降し、免疫沈降産物の抗 ALG-2 抗体によるウェスタンブロット(WB)解析をする共免疫沈降実験を行い、細胞溶解液中での ALG-2 との Ca^{2+}依存的相互作用を解析中である。

calcium-binding protein, protein-protein inretaction, motif

講演番号：2F12p05
講演日時、会場：3 月 27 日 14:44～ F 校舎 12 会場

ALG-2 とストア作動性 Ca^{2+}流入負制御因子 SARAF の Ca^{2+}依存的相互作用
Ca^{2+}-dependent interaction between ALG-2 and a negative regulator of store-operated Ca^{2+} entry named SARAF

○張 維、小島 亨介、佐々木 桂奈江、川崎 真依、高橋 健、高原 照直、柴田 秀樹、牧 正敏（名大院生命農・応用分子生命科）
○Wei Zhang, Kyosuke Kojima, Kanae Sasaki, Mai Kawasaki, Takeshi Takahashi, Terunao Takahara, Hideki Shibata, Masatoshi Maki (Nagoya Univ Grad Sch Bioagric Sci, Dept Appl Mol Biosci)

【目的】Ca^{2+}はセカンドメッセンジャーとして情報伝達において重要な働きをしているが、過剰な Ca^{2+}は細胞死を引き起こすため、巧妙な制御機構により恒常性が維持されている。細胞刺激に伴い小胞体(ER)内腔に貯蔵された Ca^{2+}がサイトソルに放出され、ER 内腔 Ca^{2+}が枯渇した状態になるとストア作動性 Ca^{2+}流入機構（Store-Operated Calcium Entry, SOCE）が働く。すなわち、ER 膜貫通 Ca^{2+}センサータンパク質である STIM1 が ER 内腔の Ca^{2+}枯渇を感知し、小胞体と細胞膜の接合部に移動して集積し、細胞膜上に局在する Ca^{2+}チャネルの Orai1 と相互作用してチャネルを活性化し、細胞外から細胞内に Ca^{2+}が取り込まれる。一方、ER 膜貫通タンパク質の SARAF は STIM1 と結合して過剰の Ca^{2+}流入を抑制するが、分子内には Ca^{2+}結合モチーフが存在しないため、細胞外から流入した Ca^{2+}濃度変動をどのように感知し、フィードバック制御に関わっているのか不明である。我々はこれまで、Ca^{2+}結合タンパク質である ALG-2 が Ca^{2+}依存的に相互作用するタンパク質には特定のアミノ酸配列からなる結合モチーフをもつことを明らかにしてきたが、SARAF にも類似アミノ酸配列が存在することを見出し、ALG-2 が SARAF の Ca^{2+}センサーとして働き、Ca^{2+}ホメオスタシスにおけるフィードバック制御に関与している可能性が出てきた。本研究では、ALG-2 の新規生理機能解明の第一歩として、SARAF と ALG-2 の相互作用を明らかにすることを目的として実験を行った。【方法と結果】GFP 融合 SARAF（SARAF-SGFP2）を HEK293T 細胞に発現させ、GFP 抗体を用いて免疫沈降すると ALG-2 が Ca^{2+}依存的に共沈降した。一方、GST-ALG-2 プルダウンにより結合解析を行ったところ、野生型 ALG-2 とは結合したが、Ca^{2+}結合能喪失 ALG-2 変異体とは結合しなかった。また SARAF 中の ALG-2 結合モチーフを欠損させると結合能が喪失した。さらに、HeLa 細胞を用いた蛍光顕微鏡観察において、ER 膜 Ca^{2+}ポンプ（SERCA、Ca^{2+}-ATPase）の阻害剤である Thapsigargin 処理して人為的に ER 内腔の Ca^{2+}枯渇を誘導させると mCherry-ALG-2 と SARAF-SGFP2 は細胞内で一部斑点状の共局在を示した。以上のことより ALG-2 が SOCE の制御因子として関与している可能性が示唆された。

calcium-binding protein, protein-protein interaction, SOCE

講演番号：2F12p06
講演日時、会場：3 月 27 日 15:05～ F 校舎 12 会場

アミノ酸による細胞内カルシウム上昇機構の解析

A regulatory mechanism of an intracellular calcium rise triggered by amino acids in mammalian cells

○中村 奈央、井上 国子、高原 照直、柴田 秀樹、牧 正敏（名大院生命農・応用分子生命科）
○Nao NAKAMURA, Kuniko INOUE, Terunao TAKAHARA, Hideki SHIBATA, Masatoshi MAKI (Dept. Appl. Mol. Biosci., Grad. Sch. Bioagric. Sci. Nagoya Univ.)

【背景・目的】アミノ酸は細胞において必須の栄養素であり、タンパク質の構成要素として重要である。また、アミノ酸はタンパク質合成やオートファジーなど、生命維持の基礎に深く関わるシグナル因子としても重要である。アミノ酸応答の主要なシグナル伝達経路として mTOR(mammalian target of rapamycin)経路がある。mTOR は、タンパク質リン酸化酵素複合体 mTOR complex 1(mTORC1)を形成し、アミノ酸をシグナルとして下流の p70 S6 キナーゼや 4E-BP1 などをリン酸化する。これまでの研究で、アミノ酸枯渇した細胞にアミノ酸溶液を与えると細胞内カルシウム濃度が上昇するということが分かっている。しかしながら、アミノ酸によるカルシウム濃度上昇の具体的な分子機構はよく分かっていない。そこで本研究では、カルシウム濃度上昇に関与するアミノ酸を検討するとともに、mTORC1 経路に対するカルシウム濃度上昇の寄与についても検討した。
【方法・結果】本研究では、細胞内カルシウム濃度の測定として以下の二つの方法を用いた。蛍光カルシウム指示薬 Fura2-AM を用いて、HeLa 細胞（ヒト子宮頸癌由来上皮細胞）の細胞内カルシウム濃度をプレートリーダーで測定した。また、カルシウムセンサー蛍光タンパク質 R-GECO1 を恒常的に発現させた HeLa 細胞を用いて、共焦点レーザー顕微鏡で生細胞観察を行った。アミノ酸枯渇した HeLa 細胞に 13 種類のアミノ酸混合溶液を投与すると、どちらの測定系でもカルシウム濃度上昇がみられた。また、細胞外のカルシウムキレート剤である EGTA の存在下で、カルシウム濃度上昇が低減した。この結果から、細胞内カルシウム濃度上昇において、細胞外からのカルシウム流入の寄与が大きいと考えられる。次に、カルシウム濃度上昇に関わるアミノ酸を調べるため、いくつかのアミノ酸を除いたアミノ酸混合溶液でアミノ酸刺激を行い、カルシウム濃度上昇の変化を比較した。その結果、アルギニンとリジンを除いた 11 種類のアミノ酸混合溶液では、カルシウム濃度上昇が大きく減弱した。さらに、アルギニンとリジンのみから成るアミノ酸溶液でもカルシウム濃度上昇が起きた。これらの結果から、細胞内カルシウム濃度の上昇にはアルギニンとリジンが関与していると考えられる。
　また、mTORC1 経路へのカルシウム濃度上昇の影響を調べるために、mTORC1 の活性化の指標として代表的な基質である p70 S6 キナーゼのリン酸化により mTORC1 の活性を評価した。その結果、EGTA 存在下では、アミノ酸刺激 30 分後の p70 S6 キナーゼのリン酸化が低下した。このことから、アミノ酸によるカルシウム濃度上昇が mTORC 1 活性の維持に関わることが示唆される。

amino acid, calcium, mTOR

講演番号：2F12p07
講演日時、会場：3 月 27 日 15:16～ F 校舎 12 会場

グルココルチコイドとアンドロゲンの拮抗作用による膵β細胞のアポトーシス制御

Functional competition between glucocorticoid and androgen in pancreatic β-cell apoptosis

○原田 直樹[1]、中野 長久[2]、乾 博[3]、山地 亮一[1] ([1]大阪府大・生命環境、[2]大阪女子短大、[3]大阪府大・栄養)
○Naoki HARADA[1], Yoshihisa NAKANO[2], Hiroshi INUI[3], Ryoichi YAMAJI[1] ([1]Div. Life Environ. Sci., Osaka Pref. Univ., [2]Osaka Woman's Junior College, [3]Div. Comp. Rehab., Osaka Pref. Univ.)

【目的・背景】アナボリックホルモンであるアンドロゲンとカタボリックホルモンであるグルココルチコイドは、それぞれアンドロゲン受容体（AR）とグルココルチコイド受容体（GR）に結合して生理作用を発揮する。リガンド依存的な転写因子として機能する AR と GR は DNA 結合ドメイン間に相同性を有し、一部共通の標的遺伝子プロモーターのシスエレメントに結合する。しかし、AR と GR の相反する生理作用を発揮するメカニズムについてはほとんど明らかになっていない。グルココルチコイドは、膵β細胞株である INS-1 細胞において GR を介したアポトーシスを誘導する。一方、我々はこれまでの研究から、膵β細胞に AR の発現を見出している。そこで、本研究では、膵β細胞におけるグルココルチコイドシグナルに対するアンドロゲンシグナルの影響について検討を行った。
【方法・結果】INS-1 細胞から単離した AR を高発現する INS-1 #6 細胞で、合成グルココルチコイドであるデキサメサゾン（DEX）によって誘導された細胞死は、アンドロゲンであるテストステロンによって抑制された。このテストステロンによる細胞保護作用は、AR のノックダウンや AR アンタゴニストであるヒドロキシフルタミド (HF) により減弱した。アポトーシスの指標である DNA 断片化、カスパーゼ-3 の活性化と PARP の断片化は DEX によって誘導され、テストステロンによって抑制された。さらに、DEX によるアポトーシスに必須である thioredoxin-interacting protein（TXNIP）の発現誘導は、テストステロンによりタンパク質レベルと mRNA レベルの両方で抑制された。これらのアポトーシス指標に対するテストステロンによる抑制も HF の存在下では減少した。TXNIP プロモーターの-851/-837 領域にはグルココルチコイド応答配列（GRE）が同定されており、アンドロゲン応答配列（ARE）としても機能する可能性が推測された。-1081/+20 領域を用いたルシフェラーゼレポーターアッセイにより、DEX によりプロモーター活性が上昇し、テストステロンが抑制することを見出した。-851/-837 の ARE/GRE 領域のみを含むレポーターを用いても同様の結果が観察された。クロマチン免疫沈降により、AR と GR はそれぞれのリガンド依存的に ARE/GRE を含む領域に直接結合すること、さらにテストステロンの存在下では、DEX 刺激による GR の ARE/GRE への結合が減少することが判明した。AR の DNA 結合ドメインがこの ARE/GRE に直接結合することが EMSA により明らかになった。これらの結果から、TXNIP プロモーター-851/-837 の ARE/GRE 領域で AR がサイレンサーとして GR がエンハンサーとして拮抗することで、アンドロゲンとグルココルチコイドが膵β細胞のアポトーシスを制御することが示唆された。

androgen, glucocorticoid, pancreatic β-cell

講演番号：2F12p08
講演日時、会場：3 月 27 日 15:27～ F 校舎 12 会場

膵β細胞形成に及ぼす胎児期の男性ホルモンの影響
Effect of testosterone surge on the development of pancreatic beta-cells
○甲木 孝弘[1]、原田 直樹[1]、中野 長久[2]、乾 博[3]、山地 亮一[1]([1]大阪府大院・生命環境、[2]大阪女子短大、[3]大阪府大院・栄養)
○Takahiro Katsuki[1], Naoki Harada[1], Yoshihisa Nakano[2], Hiroshi Inui[3], Ryouichi Yamaji[1]([1]Osaka Prefecture Univ. Life and Enviromental Sciences., [2]Osaka Women's Junior College, [3]Osaka Prefecture Univ. Nutrition)

【背景・目的】膵臓のβ細胞は血糖降下作用を持つインスリンを分泌する唯一の内分泌細胞である。膵β細胞の分化・増殖は胎児期が最も盛んである。胎児期における膵β細胞の形成不全は成人後の膵β細胞量にも影響するため、2 型糖尿病発症のリスクを高めると考えられる。この膵β細胞形成期は男性への性分化のために男性ホルモンであるテストステロンレベルが一過的に上昇する時期と合致する。我々は、これまでに 8 週齢の雄性 Wistar ラットの膵β細胞にアンドロゲン受容体（AR）が発現し、核内に局在することを明らかにした。さらに、成人期の雄性ラットでテストステロンが膵β細胞の増殖を促進することを見出した。そこで、本研究では胎児期の膵β細胞の形成に男性ホルモンシグナルが関与する可能性を検討するため、胎児期の膵β細胞における AR の発現と膵β細胞の増殖や分化に及ぼすテストステロンの影響を、AR のアンタゴニストを用いて検討した。
【方法・結果】胎児期のテストステロンサージが観察される胎生 19.5 日目の雄性 Wistar ラットの膵臓切片を作製し、AR の発現を検討した。その結果、AR は抗インスリン抗体で染色される膵β細胞の近傍の細胞で高発現していた。AR と膵β細胞前駆細胞マーカーである抗 Nkx6.1 抗体で染色したところ、Nkx6.1 陽性細胞で AR が高発現しており、細胞膜に局在することが明らかとなった。次に、胎児期の膵β細胞分化に対するテストステロンの影響を調べるため、AR のアンタゴニストであるフルタミド（50 mg/kg body weight）を妊娠 16.5 日目から出生まで毎日母ラットに経口投与した。出生 0 日目の雄性ラットでは、体重に差はなかったが、膵β細胞量はフルタミド投与によって有意に減少した。この膵β細胞量の減少は膵β細胞の個数と大きさの両方の減少に起因することが判明した。一方で、雌性ラットでは膵β細胞量に差は見られなかった。また、出生児の膵臓から mRNA を抽出し、インスリン遺伝子の発現量の変化を検討した。その結果、フルタミド投与により雄性ラットでは Ins1 及び Ins2 の発現が減少したが、雌性ラットでは影響がなかった。さらに、フルタミド投与ラットから出生した雄性ラットを 6 週齢まで飼育し、胎児期の AR 機能阻害が生育後の膵β細胞に影響するか否かを検討した。その結果、フルタミド投与群で胎児期の膵β細胞量の減少がそのまま維持されることが明らかとなった。以上の結果から、胎児期では膵β細胞前駆細胞で AR が高発現し、雄性ラットの膵β細胞形成を促進する作用を持つことが示唆された。さらに、胎児期の AR 機能阻害によるβ細胞形成不全は生育後も維持されることが明らかとなった。

Panceratic beta-cells, Testosterone, Fetus

講演番号：2F12p09
講演日時、会場：3 月 27 日 15:38～ F 校舎 12 会場

LGR4 はプロゲステロンシグナルを介した子宮受容能獲得に必要である
LGR4 is required for endometrial receptivity acquired through progesterone signaling
○木田 奉代[1]、大山 一徳[1]、曽根 瑞季[1]、小泉 雅江[2]、日出間 志寿[1]、西森 克彦[1] ([1]東北大院農、[2]愛媛大医)
○Tomoyo KIDA[1], Kazunori OYAMA[1], Mizuki SONE[1], Masae KOIZUMI[2], Shizu HIDEMA[1], Katsuhiko NISHIMORI[1] ([1]Tohoku Univ., [2]Ehime Univ.)

研究背景）LGR4(leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 4)は LHR（黄体化ホルモン受容体）や FSHR（卵胞刺激ホルモン受容体)、TSHR（甲状腺刺激ホルモン受容体）といったグリコプロテイン受容体ファミリーの新たなメンバーとして同定され、当初は三量体 G タンパク質と共役する GPCR とみられていた。しかしその後の研究展開により、分泌性タンパク質である R-spondin をリガンドとして Wnt/β-catenin シグナルを亢進することが見出された。我々は K5-Cre（ケラチン５）トランスジェニックマウスを用いて *Lgr4* を上皮組織特異的に欠損させた *Lgr4* コンディショナルトランスジェニックマウス（$Lgr4^{K5\,KO}$）を作製し、LGR4 の機能解析を行ってきた。解析を進めたところ、子宮分泌腺の形成不全による LIF と呼ばれるサイトカインの分泌が減少していることを見出した。この LIF 刺激の低下によってストローマ細胞の細胞増殖が起きないことが受精卵の着床率の低下であることを見出した。しかし、受精卵の着床率は LIF タンパクの投与により回復しなかったことから、我々は *Lgr4* が子宮内において他の機能も有していると予想した。*Lgr4* の発現は分泌腺形成後においても子宮内腔上皮において観察されたことから、我々は LGR4 と子宮内腔上皮における“子宮受容能の獲得”に着目して解析を行った。
方法及び結果・考察) エストロゲン・プロゲステロンを投与しマウスを妊娠早期のホルモン状態にし、免疫染色および qRT-PCR を用いてエストロゲン・プロゲステロンシグナルについて解析を行った。正常マウスでは、エストロゲン投与刺激後にプロゲステロン投与刺激を行うことで内腔上皮細胞の細胞増殖が抑制され、受精卵着床のための内腔上皮細胞の性質変化が正常に誘導された。一方、$Lgr4^{K5\,KO}$マウスの子宮内腔上皮においてプロゲステロン刺激は細胞増殖を抑制しなかった。加えて、活性化プロゲステロン受容体の発現が減少しており、プロゲステロンシグナルの下流遺伝子である ihh、areg も発現が減少していた。これらのことは、LGR4 がプロゲステロンシグナルを介した子宮内腔上皮の受容能獲得に必須であることを示唆している。今後の解析としてプロゲステロン受容体のリン酸化において LGR4 がどのような機能を持つのかを明らかにしていきたい。

LGR4, endmetrial receptivity, progesterone signaling

講演番号：2F12p10
講演日時、会場：3 月 27 日 15:49～ F 校舎 12 会場

内因性代謝物質による HIF-1α の活性制御

Regulation of HIF-1α activity by endogenous metabolites

○芹沢 茉里子[1,3]、Tariq Mohammad[1,4]、前田 里子[1]、中尾 洋一[3]、伊藤 昭博[1,2,5]、吉田 稔[1,2,4,5] ([1]理研、化学遺伝、[2]理研　環境資源、ケミカルゲノミクス、[3]早大院先進理工、[4]埼玉大院理工、[5]科技機構、CREST)
○Mariko SERIZAWA[1,3], Mohammad TARIQ[1,4], Satoko MAEDA[1], Yoichi NAKAO[3], Akihiro ITO[1,2,5], Minoru YOSHIDA[1,2,4,5] ([1]RIKEN, Chem. Genet., [2]RIKEN CSRS, Chem. Genomics, [3]Dept. Chem. Biochem., Adv. Sci. Eng., Waseda Univ., [4]Grad. Sch. Sci. Eng., Saitama Univ., [5]JST, CREST)

【目的】

Hypoxia inducible factor (HIF)-1α は低酸素応答に重要な転写因子である。HIF-1α は通常酸素濃度下ではプロリン水酸化依存的にユビキチンープロテアソーム系により速やかに分解されるが、低酸素状態ではプロリン水酸化が阻害されることにより安定化し、HIF-1β とともにヘテロ二量体 HIF-1 を形成して DNA 上の Hypoxia responsive element (HRE)に結合する。HRE に結合した HIF-1 は、Vascular endothelial growth factor (VEGF)や Erythropoietin (EPO)などの遺伝子発現を誘導し、血管新生や造血などを促進する。一方、生体内において HIF-1α を活性化させる内因性物質についてはよく分かっていない。本研究では、HIF-1α を活性化させる内因性の生理活性物質を同定することを目的とし、脂肪酸類縁体を中心とした代謝物質ライブラリを用いてスクリーニングを行った。さらに、同定された活性物質について、HIF-1α 活性化のメカニズムを検討した。

【方法】

内因性代謝物質のスクリーニングは、HRE の下流にルシフェラーゼを連結させたレポータープラスミドを用いたレポーターアッセイ系により行った。同定された化合物について、Western blotting 法により HIF-1α の安定化を、qRT-PCR 法により HIF-1α 標的遺伝子の発現量の変化を検討した。

【結果・考察】

HIF-1α を活性化させる内因性代謝物質のスクリーニングを行ったところ、アシルドーパミン類が HIF-1α の転写活性を上昇させることを見出した。そこで、購入可能な 5 種類のアシルドーパミンについて検討したところ、全てのアシルドーパミンは濃度依存的にレポーター遺伝子の発現を誘導し、タンパク質レベルで HIF-1α の発現量を増加させた。さらに、アシルドーパミンの一種である *N*-palmitoyl dopamine (PALDA) は HIF-1α の標的遺伝子の発現を誘導することを確認した。一方、PALDA を構成しているパルミチン酸あるいはドーパミン単独では HIF-1α の発現を誘導出来なかったことから、HIF-1α の活性化作用はアシルドーパミンに特異的な活性であることが示唆された。HIF-1α はプロリンの水酸化依存的に分解されることが知られているが、PALDA は HIF-1α を安定化させる濃度で 564 番目のプロリン水酸化を阻害した。以上の結果から、PALDA はプロリン水酸化を阻害することにより HIF-1α を活性化する内因性物質であることが示唆された。

HIF-1α, hypoxia, *N*-acyldopamine

講演番号：2F12p11
講演日時、会場：3 月 27 日 16:10～ F 校舎 12 会場

プロリン異性化酵素 Pin1 によるタウキナーゼの活性制御の解析
Analysis of Tau kinase regulation by prolyl isomerase Pin1
○馬場 貴大、金井 研太、日高 將文、内田 隆史（東北大農）
○Takahiro BABA, Kenta KANAI, Masafumi HIDAKA, Takafumi UCHIDA (Tohoku Univ.)

［目的］
Pin1 は、タンパク質中のリン酸化 pSer/Thr-Pro 部位を認識し、ペプチド結合の *cis/trans* 異性化を触媒するプロリン異性化酵素である。我々は、*Pin1* ノックアウトマウスの作成や阻害剤の探索を行い Pin1 の個体での機能を明らかにしてきた。ハーバード大との共同研究では、Pin1 がアルツハイマー病の病理症状の一つである「神経原線維変化」を抑制的することを見出した。神経原線維変化はタウの過剰リン酸化と変性が原因であるので、この生成を抑制することはアルツハイマー病の根本的な治療になると推測されている。
今回、我々は、タウタンパク質のリン酸化状態を制御している分子機構のうち、Pin1 によるタウキナーゼの活性化や(不)安定化作用を明らかにすることを目的として研究を行った。

［方法と結果］
我々はタウキナーゼとして、CaMKII（Ca^{2+}/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II）と GSK3β（グリコーゲン合成酵素キナーゼ 3β）に着目して研究を進めた。なぜなら、CaMKII に Pin1 が結合することは我々がマウス脳のプロテオーム解析によって見出しており、また、GSK3β に Pin1 が結合し活性が低下することは他グループから報告されていたからである。
まず、これらの酵素を大量に精製した。タンパク質発現系の宿主として大腸菌と昆虫細胞を検討した。Pin1 は大腸菌発現系を用いて精製した。CaMKII と GSK3β については、リン酸化などの翻訳後修飾が起こる昆虫細胞 sf9 を使用したバキュロウイルス発現系を構築し精製した。200 ml の振盪培養および His タグカラム精製により、CaMKII；0.2 mg、GSK3β ；1.3 mg を作成することに成功した。
精製した各キナーゼを用いて、Pin1 存在下と非存在下における活性の変化を RI 測定系において調べた。CaMKII の活性は Pin1 濃度依存的に減少しており、酵素活性レベルで CaMKII の機能が Pin1 によって抑制されることを見出した。また、Pin1 は CaMKII を不安定化し、その総量も抑制していることが明らかになった。Pin1 による活性制御が報告されている GSK3β については、プルダウンアッセイによる結合部位の同定や変異体の活性測定により、現在、Pin1 による活性制御機構の詳細な解析を行っているところである。

Pin1, GSK3 ß, CaMKII

講演番号：2F12p12
講演日時、会場：3 月 27 日 16:21～ F 校舎 12 会場

錐体 cGMP Phosphodiesterase 6 のシャペロン共発現下における機能的発現

Functional Expression of Cone cGMP Phosphodiesterase 6 by Co-expression with Molecular Chaperones

○田端 勇人、長岡 健斗、尾谷 優磨、嶺岸 卓徳、奥田 祐介、岡崎 修治、赤沼 元気、石塚 盛雄（中央大学)
○Hayato TABATA, Kento NAGAOKA, Yuma OTANI, Takunori MINEGISHI, Yusuke OKUDA, Shuji OKAZAKI, Genki AKANUMA, Morio ISHIZUKA (CHUO Univ.)

脊椎動物は物を見る際、眼網膜内の視細胞で光情報を電気信号に変換し、視覚情報として脳へ伝えている。視細胞には桿体細胞と錐体細胞があり、錐体細胞に局在する cGMP Phosphodiesterase 6 (PDE6) はα', α', γ', γ'の 4 量体サブユニット構造を持つ。そのうちのα' α'触媒サブユニットが cGMP を GMP に特異的に加水分解する機能を持ち、視細胞内の cGMP 濃度を調節することで視覚情報伝達の中核的な役割を担っている。PDE6 の遺伝子変異やタンパク質の変性は眼科疾患の原因の一つとされている。これまでに昆虫細胞や *Xenopus laevis* の視細胞において遺伝子組換え技術を用いた PDE6 の発現が試みられてきたが、PDE6 の機能的な発現が難しく、十分な機能解析は行われていない。

分子シャペロンはタンパク質の構造変化を制御するタンパク質であり、そのクライアントタンパク質のフォールディングにおいて主要な役割を担っている。近年、シャペロンタンパク質である Hsp40 (Heat-shock protein 40), 70, 90 そして AIPL1 (aryl hydrocarbon receptor interacting protein like-1) が網膜内視細胞で、桿体 PDE6 触媒サブユニットの立体構造の安定化と正しいフォールディング、PDE6 の多量体形成に寄与すると報告された。

私たちはこれまでに、*in vitro* での実験から各シャペロンタンパク質との相互作用が PDE6a'の活性を増加させるという結果を得ている。そこで本研究では、*Xenopus laevis* 由来の DNA を用いて、同一の大腸菌内で触媒サブユニット PDE6α'、シャペロンである Hsp90 と AIPL1、そして阻害サブユニットである PDE6γ'を共発現させる系を構築した。構築した系により発現させた PDE6α'の cGMP 加水分解活性を PDE-Glo™ Phosphodiesterase Assay を用いて測定した。その結果、シャペロンを共発現させることでより高い cGMP 分解活性を維持した PDE6α'の発現に成功した。この結果は、触媒サブユニットとシャペロンが大腸菌内で相互作用し、PDE6α'の構造安定化を促進していることを示唆するものである。この効果は、特に AIPL1 で顕著に観察された。この結果に加え、PDE6γ'が PDE6α'の構造安定化に重要であることが分かった。

AIPL1 は Hsp90 と Hsp70 と相互作用し、また Hsp40 は Hsp70 のコシャペロンであることが分かっている。現在、これら分子シャペロンと PDE6α', PDE6γ'を同一大腸菌内で共発現させ、より活性を維持した PDE6 の発現系構築を試みている。今回はそれらの結果を合わせて報告する。

Phosphodiesterase 6, Chaperone, *Xenopus laevis*

講演番号：2F12p13
講演日時、会場：3 月 27 日 16:32～ F 校舎 12 会場

Stabilon 融合タンパク質を用いた iPS 細胞から肝細胞への分化誘導法の確立

Differentiation of iPS cells into hepatocyte-like cells by Stabilon-fused protein.

○峰岸 紋子[1]、相原 絵理[2]、細野 崇[1]、舛廣 善和[1]、花澤 重正[1]、関 泰一郎[1] ([1]日本大院生資料、[2]日本大生資科)
○Ayako MINEGISHI[1], Eri AIHARA[2], Takashi HOSONO[1], Yoshikazu MASUHIRO[1], Shigemasa HANAZAWA[1], Taiichiro SEKI[1] ([1]Nihon Univ. Grad. School, [2]Nihon Univ.)

【目的】肝臓はヒトの体内では再生能を有する数少ない臓器である。一方、遺伝性肝疾患や肝不全などの重篤な肝疾患では、自己の再生能力では治癒することができず、治療には iPS 細胞などの幹細胞から分化を誘導した肝細胞移植が期待されている。iPS 細胞を維持し、目的の細胞へ分化を誘導するためのコストは高く、安全性の面からの議論もある。そこで演者らは、細胞膜透過性タンパク質を用いた分化誘導法に着目し、Stabilon と呼称されるタンパク質安定化モチーフを付与した組み換えタンパク質を用いて、安価かつ簡便な iPS 細胞から肝細胞への分化誘導法を確立しようとしている。本研究では分化誘導に必要な細胞膜透過性タンパク質の発現系の確立を試みた。
【方法】内胚葉への分化誘導因子 Sox17, 肝細胞への分化誘導因子 Hnf3β/Foxa2 の N 末端側に Stabilon, C 末端側に細胞透過性タグである MTM を付与した組換え体を pET system を用いて構築した。これらのベクターを大腸菌(BL21[DE3])に形質転換し LB 培地で培養してタンパク質を発現させた。発現タンパク質はグアニジン塩酸を用いて変性後、Ni レジンを用いて精製した。透析によりリフォールディングを行い精製タンパク質の純度および収量は SDS-PAGE により確認、算出した。これらの精製タンパク質を HEK293 細胞に添加して 30 分間培養後、市販のキットにより細胞質画分、核画分を調製し、ウエスタンブロッティングにより細胞内への取り込みを確認した。
【結果】上記の方法により構築した 4 種類のコンストラクトを形質転換した大腸菌の培養液 1 L から Stabilon-Sox17-MTM 355 μg, Sox17-MTM 385 μg, Hnf3β-MTM 215 μg, Stabilon-Hnf3β-MTM 440 μg を調製することが出来た。これらのうち、Stabilon-Sox17-MTM , Sox17-MTM を HEK293 細胞に添加培養したところ、細胞質、核への移行が確認された。現在、これらの Sox17 タンパク質を iPS 細胞に添加、培養し内胚葉細胞への分化誘導について検証中である。
【結論】細胞膜透過性を有する Sox17 の調製法を確立した。

iPS cell, Stabilon, hepatocyte

講演番号：2F12p14
講演日時、会場：3 月 27 日 16:43～ F 校舎 12 会場

ROCK 阻害剤による ES 細胞から神経細胞への分化の促進メカニズム
Promotion mechanism of ES cell differentiation into neurons by ROCK inhibitor
○上芝原 佑[1]、川口 英夫[1]、清水 範夫[2] ([1]東洋大院生命科学、[2]東洋大バイオ・ナノエレクトロニクス研究センター)
○Yu KAMISHIBAHARA[1], Hideo KAWAGUCHI[1], Norio SHIMIZU[2] ([1]Toyo Univ., [2]Bio-Nano Electronics Research Center)

【目的】胚性幹（embryonic stem：ES）細胞は、*in vitro* において様々な細胞に分化する多分化能及び自己複製能を保持することから、再生医療分野への応用が期待されている。しかし分化メカニズムには不明な点が多く、分化を制御する研究が重要になっている。一方 Rho/Rho キナーゼ（ROCK）経路は、細胞増殖や軸索の退縮など様々な細胞機能を制御していることが報告された。更に、ROCK 阻害剤は血管平滑筋弛緩薬としてだけでなく、中枢神経系（CNS）の治療への可能性が明らかになってきた。これらの知見から本研究では、ES 細胞の分化培養時に ROCK 阻害剤を添加することによる神経細胞への分化効率の向上及びその分化メカニズムを解明することを目的とした。
【方法】浮遊培養により直径 200 μm の細胞コロニーを形成させた。この細胞コロニーに ROCK 阻害剤または ROCK 阻害剤と同時に神経成長因子（nerve growth factor ： NGF）を添加して分化培養した。培養 12 日目にβIII-tubulin（神経細胞マーカー）を用いて免疫蛍光染色を行い、フルオロ・イメージアナライザーを用いて蛍光強度を測定し、神経細胞への分化割合を検討した。また、ROCK 阻害剤の添加がどのシグナル伝達経路を活性化させているかについて、ウェスタンブロッティング法によりリン酸化したタンパク質を検出し、かつ各経路の阻害剤を用いてシグナル経路を阻害することにより、神経細胞への分化に及ぼす影響について検討した。
【結果】ES 細胞コロニーに ROCK 阻害剤を添加して分化培養した結果、無添加の場合と比較して、神経細胞に分化した割合が高くなった。ROCK 阻害剤による ERK シグナル伝達経路の活性化について検討した結果、無添加の場合と比較して、リン酸化 ERK 量が高くなり、ERK の上流に位置する MEK を阻害すると、神経細胞への分化が抑制されることが分かった。これから、ROCK 阻害剤の添加により、ERK シグナル伝達経路の ERK が活性化されることが分かった。一方、NGF 受容体である TrkA の阻害剤と PLC 阻害剤では、神経細胞への分化は抑制されなかった。
以上の結果から、ROCK 阻害剤は TrkA や PLC 以外のシグナル伝達物質により、ERK を活性化させて神経細胞への分化を促進させていると考えられる。

ES cell, differentiation, ROCK inhibitor

講演番号：2F12p15
講演日時、会場：3 月 27 日 16:54～ F 校舎 12 会場

p53 ノックアウトマウス軟部腫瘍由来細胞株におけるグルタミンの還元的代謝の解析

Analysis of reductive glutamine metabolism in p53-null soft tissue sarcoma cells

○岡橋 伸幸[1]、松田 史生[1]、河野 晋[2]、高橋 智聡[2]、清水 浩[1] ([1]阪大院情報、[2]金沢大がん研)
○Nobuyuki OKAHASHI[1], Fumio MATSUDA[1], Susumu KOHNO[2], Chiaki TAKAHASHI[2], Hiroshi SHIMIZU[1] ([1]Osaka Univ., [2]Kanazawa Univ.)

【背景・目的】
がん化メカニズムの解明や創薬ターゲットの発見に向け、がん細胞に特異的な代謝のフラックス（代謝流量）レベルでの解析が注目されている。そこで本研究では、がん化メカニズムとの関連が示唆されているグルタミンの還元的代謝に着目し、培地組成の分析や、^{13}C 標識実験、計算機シミュレーションなどの手法で、p53 ノックアウトマウス軟部腫瘍由来細胞株の解析を行った。
【方法】
がん抑制遺伝子 p53 を欠損したマウスの軟部腫瘍から細胞株を樹立した。この細胞株を[1-^{13}C]グルタミン含有 DMEM で標識培養した。培地中のグルコース、乳酸、酢酸、アミノ酸を HPLC、UPLC で分析し、消費および排出の比速度を算出した。また細胞内代謝物質を抽出、誘導体化し、ガスクロマトグラフ質量分析装置で ^{13}C 標識割合を分析した。代謝フラックス解析には、専用ソフトウェア ”OpenMebius” (Kajihata *et al.*, 2014) を用いた。
【結果・考察】
p53 ノックアウトマウス軟部腫瘍由来細胞株を[1-^{13}C]グルタミン含有 DMEM を用いて培養した。培地組成の経時変化を調べたところ、取り込んだグルコースの 75%が乳酸として培地に排出されており、がん細胞の特徴であるワールブルク効果が起きていると推測された。乳酸以外にも酢酸（11%）や非必須アミノ酸（4.8%）の培地中への排出が観測された。次に、細胞内代謝物の ^{13}C 標識割合を分析した。得られたマススペクトルから天然に存在する同位体の影響を除去した結果、^{13}C 標識されたクエン酸が 10%存在することが明らかとなった。これは、[1-^{13}C]グルタミンがイソクエン酸デヒドロゲナーゼ（IDH）の逆反応を介して還元的に代謝されて生成したものと考えられた。また、各代謝物質中の標識割合の計算機シミュレーションを行った結果、他の代謝経路では実測されたクエン酸の標識割合を説明できないことが明らかとなった。これらの結果から、ヒトがん細胞で報告されていたグルタミンの還元的代謝ががん細胞一般で広く起きている可能性が示唆された。

metabolic flux analysis, reductive glutamine metabolism, p53

講演番号：2F12p16
講演日時、会場：3 月 27 日 17:15～ F 校舎 12 会場

食品成分摂取による TRP チャネルを介した体温調節

Thermoregulation by intake of foods via TRP channels

○森 紀之、浦田 朋美、福渡 努（滋賀県大人間文化）
○Noriyuki MORI, Tomomi Urata, Tsutomu Fukuwatari (Univ. of Shiga Pref.)

【背景】 食品には身体を温めたり冷やしたりする働きがあるとされている。しかしながら食品の摂取が体温に与える影響やその作用機序に関する報告は少ない。本研究では温度受容 Transient receptor potential (TRP)チャネルに着目した検討を行った。温度受容 TRP チャネルは生体での温度受容に関与することが報告されており、特定の温度域を受容するチャネルが体温や環境温を受容し、行動性ならびに自律性の体温調節を惹起することが報告されている。興味深いことに、温度受容 TRP チャネルは、香辛料などの特定の食品成分によって活性化されることが報告されている。これまでの研究で 温度受容 TRP チャネルのアゴニストである食品成分の胃内投与により、それぞれの温度受容チャネルの受容温度領域に応じた熱産生および熱放散が惹起されることが明らかになっている (Masamoto et.al 2009)。しかしながらアゴニスト投与により惹起された体温調節が温度受容 TRP チャネルを介したものであるのかについては明らかになっていない。本研究は TRP チャネルアゴニストの投与により惹起された体温調節が温度受容 TRP チャネルを介した作用であるか明らかにすることを目的として行った。

【方法】 C57BL/6 マウス、7 週齢、雄を実験に用いた。マウスを 2 時間絶食させた後、ウレタン麻酔（1.4 g/kg-wt.）をかけ、熱産生の指標となる肩甲骨間褐色脂肪組織(IBAT),深部体温を表す直腸,熱放散の指標となる尾静脈周囲の 3 ヶ所にサーモプローブを取り付け、温度変化を測定した。サンプル投与は、開腹し胃内に挿入したカニューレを介して行った。マウスの直腸温が 37 ℃近になるように恒温槽の温度を設定し、マウスの直腸温が安定したところでサンプルを投与し体温変化を記録した。投与サンプルには TRPV1、TRPM8、TRPA1 のアゴニストとしてカプサイシン、1,8-シネオール、シンナムアルデヒドをそれぞれ用いた。また、TRPV1、TRPM8、TRPA1 のアンタゴニストとして BCTC、M8-B、HC-030031 をそれぞれ用いた。

【結果と考察】 TRPV1 のアゴニストであるカプサイシンの投与により一過性の尻尾温の上昇および直腸温の低下が確認された。IBAT 温は投与後すぐ低下するが、その後徐々に上昇することが確認された。TRPV1 のアンタゴニストである BCTC の腹腔内投与により、カプサイシン投与で確認された尻尾温における体温上昇が観察されなくなった。以上の結果から、カプサイシンは胃内投与により TRPV1 を介して熱放散を惹起することが示唆された。これは TRPV1 の受容温度領域に対応する生体反応であると考えられる。現在、他の TRP チャネルアゴニストに関して詳細な検討を行っている。

TRP channels, thermoregulation, mice

講演番号：2F12p17
講演日時、会場：3 月 27 日 17:26～ F 校舎 12 会場

デオキシニバレノールの食欲抑制メカニズム
Anorexic mechanism of Deoxynivalenol
○富永 美沙、只石 幹、百中 佑果、横瀬 ちひろ、市川 沙織、坂下 文子、服部 一夫（東農大応生科・栄養）
○Misa Tominaga, Miki Tadaishi, Yuka Momonaka, Chihiro Yokose, Saori Ichikawa, Fumiko Sakashita, Kazuo Hattori (Tokyo University of Agriculture.)

[目的]デオキシニバレノール（DON）は、フザリウム属菌によって生産されるトリコテセン系マイコトキシンであり、麦類を中心とした赤かび病の原因となる植物病原菌の一つである。DON の中毒症状は、吐き気、嘔吐、下痢、食欲抑制、皮膚炎症や造血系の機能低下などが報告されているが、その中でも食欲抑制の機序は明らかではない。そこで本研究では DON をマウスに経口投与し、摂食制御の中枢である視床下部や腸管における摂食関連ペプチドやその制御に関わる因子について検討した。
[方法]6 週齢雌性 B6C3F1 マウスを 8 時間絶食させた後、PBS または DON（6.25、12.5、25 ㎎/kg bw）を経口投与し、3、6、12、18、24 時間後の摂食量を測定した。また、12.5 ㎎/kg bw の DON を投与して 3 時間後に解剖を行い、視床下部、胃、小腸を採取した。採取したサンプルから、摂食関連ペプチドやその制御に関わる因子の mRNA 量やタンパク質量をリアルタイム PCR あるいはウエスタンブロッティング法にて測定した。
[結果・考察]摂食量は、投与 0-3 時間で、PBS 群に比し DON 投与群において有意な減少が認められ、投与 3-6、6-12 時間で DON12.5、25 mg/kg bw 投与群において有意な減少がみられた。また、12.5 mg/kg bw 投与 3 時間後、摂食抑制ペプチドである POMCmRNA 量が有意に増加し、CARTmRNA 量は増加傾向を示した。さらに、POMC の下流に存在する MC4R、BDNF の mRNA 量にも有意な増加が認められた。一方、摂食促進ペプチドである NPY は DON によって変動しなかった。以上より、DON による摂食量の減少は、摂食抑制ペプチドである視床下部 POMC を介し、その下流に存在する MC4R、BDNF 発現量を増加させることにより誘導されることが示唆された。さらに、POMC は炎症性サイトカインの影響を受け、NF-κB の活性化により発現が増加することが報告されている。視床下部の炎症性サイトカインを測定した結果、DON 投与群で IL-1β と TNF-α の mRNA 量が上昇していた。さらに、IκB-α のリン酸化レベルは、PBS 群よりも DON 群において有意にが増加していたことから、NF-κB の活性化が示唆された。DON は脳への移行が確認されていることから、視床下部における炎症性サイトカインの誘導を介した NF-κB の活性化により、POMC を増加させることが示唆された。また、DON 群において、小腸の摂食抑制ペプチドであるコレシストキニンが有意に増加していたことから、腸管を介して摂食抑制が誘導される可能性も示された。以上より、DON は視床下部への直接的な作用と腸管を介する間接的な作用により、食欲を抑制すると考えられた。

Anorexia, Deoxynivalenol, Pomc

講演番号：2F12p18
講演日時、会場：3 月 27 日 17:37～ F 校舎 12 会場

昆虫のミトコンドリア膜 ADP/ATP 輸送体の遺伝子と機能の特性
Gene and functional characterizations of insect mitochondrial ADP/ATP carrier
管原 亮平[1]、上樂 明也[1]、篠原 康雄[2]、三芳 秀人[3]、○塩月 孝博[1] ([1]農生資研、[2]徳島大疾患プロテオゲノム研究セ、[3]京大院農)
Ryohei SUGAHARA[1], Akiya JORAKU[1], Yasuo SHINOHARA[2], Hideto MIYOSHI[3], ○Takahiro SHIOTSUKI[1] ([1]Nat'l Inst. Agro-Biol. Sci., [2]Tokushima Univ., [3]Kyoto Univ.)

【目的】
農業生産における総合的病害虫管理（IPM）の中で、殺虫剤も一つの重要な防除資材であるが、既存剤に対する抵抗性の発達や難防除害虫の発生などが問題になっている。その対策としては既存剤とは異なる作用機構を持つ新剤の開発が最も有効であるものの、新規作用点の発掘は容易でない。そこで本研究では、ミトコンドリア膜輸送体を作用点とする害虫制御剤開発を目指し、まずその中で ADP/ATP 膜輸体（ANT）の遺伝子と機能の特性を解明することを目的とした。
【方法】
遺伝子情報が少ない害虫種では RNA-seq 解析を行い、トランスクリプトームのデータベースを構築した。ミトコンドリア膜輸送タンパク質遺伝子はスーパーファミリーを形成しており、輸送される物質ごとに保存されているアミノ酸配列をもとに検索した。ANT には複数のパラログが存在する場合が多く知られているため、昆虫についても解析した。またそれらは組織や時期により発現様式が異なる例が報告されているので、カイコを用いて発現様式の調査から機能を推測した。
【結果および考察】
ナミハダニを含め 11 種から 23 の ANT 遺伝子を単離同定した。分子系統樹解析の結果、チョウ目では昆虫種ごとに ANT1 と ANT2 の 2 つのパラログを持ち、チョウ目 ANT2 は哺乳動物の ANT4 のグループに近かった。カイコ ANT1 はユビキタスに全ての時期で発現量が高く、培養細胞 BmN4 でも発現していた。一方カイコ ANT2 の発現は終齢オスで高く、精巣に特異的であった。哺乳動物 ANT4 の発現も精巣特異的で、さらに N 末端アミノ酸配列の特徴も類似し、機能も近いものと考えられた。前述 BmN4 細胞を用いて RNA 干渉法による発現抑制を行うと、カイコ ANT1 遺伝子の増殖率が低下した。この増殖率低下は、カイコおよびコナガの ANT1 遺伝子の強制発現で回復したが、カイコとコナガの ANT2 遺伝子、あるいは、トビイロウンカ、サバクトビバッタ、ナミハダニの全パラログの ANT 遺伝子の強制発現では効果を示さなかった。コクヌストモドキ幼虫に ANT1 と ANT2 の二重鎖 RNA 注射による発現抑制実験では、ANT1 遺伝子では全く影響が見られず、ANT2 遺伝子の場合に高い致死効果を与えた。以上の結果から、ANT 分子は異なる機能を持つパラログが存在すること、害虫制御剤の標的には効果的な分子種を選択する必要があることが分かった。
なお本研究は、農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業の支援を受けて行った。

mitochondria, ADP/ATP carrier

講演番号：2F12p19
講演日時、会場：3 月 27 日 17:48～ F 校舎 12 会場

トランスクリプトミクスを用いた新規神経芽腫関連遺伝子の探索

Researching neuroblastoma related gene using RNA-seq transcriptomics

○多田 一風太[1]、霞 千明[1]、坪田 庄真[2]、岸田 聡[2]、門松 健治[2]、池松 真也[1]([1]沖縄高専専攻科、[2]名大病理)
○ Ipputa TADA[1], Chiaki KASUMI[1], Shoma TSUBOTA[2], Satoshi KISHIDA[2], Kenji KADOMATSU[2], Shinya IKEMATSU[1] ([1]Okinawa nat. coll. of tech., [2]Nagoya Univ.)

神経芽腫とは，小児において 3 番目に多い固形腫瘍であり，神経細胞に分化すべき胎生期細胞である神経芽細胞から発生する．他の癌と比較し，環境要因が影響しない生後の早い段階での発生であることから，発癌の本質的な原因を追求できる可能性があるとして，世界中で研究が行われている．

本研究は，神経芽腫のモデルマウスである *MYCN*-トランスジェニックマウス（以下 *MYCN*- Tg マウスと表記；名古屋大学より提供）を用いて，神経芽腫特異的に発現する遺伝子を探索することを目的とする．*MYCN*- Tg マウスとは，転写因子である *MYCN* を腹部神経節特異的に発現させるために遺伝子導入したマウスのことであり，腹部神経節特異的に腫瘍が形成されることが確認されている (Weiss et al., 1997)．我々の研究室では，腫瘍を形成した *MYCN*- Tg マウスの腹部神経節と，野生型マウスの腹部神経節から RNA 抽出を行い，RNA-Sequence 法（以下 RNA-Seq と表記）を用いて遺伝子発現様式を調査してきた．RNA-Seq データの正規化には，代表的な RPKM 正規化を用いてきた．しかし，RPKM 正規化など従来の正規化法には，発現変動遺伝子の存在が正しいデータ正規化を阻み，結果として発現変動遺伝子検出精度を低下させるという問題が存在している．

本研究では，発現量が変動している遺伝子を除いて正規化係数を決定する TbT 正規化法（Kadota et al., 2012）を用いて正規化を行うことで，より高い検出精度で発現変動遺伝子を探索した．発現変動遺伝子の探索結果を癌遺伝子の発現プロファイルデータベースである Oncomine (https://www.oncomine.org) にて検索し，詳細な遺伝子発現プロファイルが登録されていない 9 つの遺伝子に絞り込んだ．この 9 つの遺伝子は，新規神経芽腫関連遺伝子の可能性が高く，そのうちの 1 つは miRNA であったことから，神経芽腫の発達にも miRNA が関与していることが示唆された．

neuroblastoma, RNA-seq, gene expression

講演番号：2F22a01
講演日時、会場：3 月 27 日 09:00～ F 校舎 22 会場

笹蒲鉾を発酵させて開発を試みた新規魚醤の抗酸化能

Antioxidant activity of new fish sauce fermented from Sasa-kamaboko

○原田 和樹[1]、福田 翼[1]、和田 律子[1]、武智 美佳[2]、鈴木 秀得[2]、崎村 祥太郎[1]、前田 俊道[1]、佐々木 悦郎[3]([1]水大校・院、[2]水大校・食科、[3]阿部蒲鉾店)
○Kazuki Harada[1], Tsubasa Fukuda[1], Ritsuko Wada[1], Mika Takechi[2], Syuto Suzuki[2], Shotaro Sakimura[1], Toshimichi Maeda[1], Etsuro Sasaki[3] ([1]Graduate School of National Fisheries Univ., [2]Dept. of Food Science and Technology, National Fisheries Univ., [3]Abekamabokoten)

【目的】利用性の低い蒲鉾加工残渣の有効利用を目的に、発酵技術を用いて新たな魚醤の開発を進めている。その一環として、東北の有名な笹蒲鉾を発酵させ、笹蒲鉾魚醤の開発を試み、その特徴を報告してきた。今回は、その笹蒲鉾魚醤のイン・ビトロ系での抗酸化能を調べたので報告する。
【方法】笹蒲鉾試料は、阿部蒲鉾店製の商品「笹かま千代」を用いた。発酵は、蒲鉾に、食塩、水を加えたものをベースとし、速醸させるためにプロテアーゼM-SD（*Aspergillus oryzae*由来のペプチダーゼ及びプロテアーゼ、天野エンザイム製）や醤油麹（ヤマカ醤油提供)、米麹（糀屋本店製）の組み合わせを変えて添加し、2カ月間発酵させた。発酵温度は、23℃と35℃を用い、合計で16実験区となった。抗酸化能は、H-ORAC法や電子スピン共鳴（ESR）法を用いて定法に従って調べ、ペルオキシラジカル消去活性能やヒドロキシラジカル捕捉活性能で評価した。実験はn = 3で行い、単位は、ORAC値がμmolトロロックス当量（TE）／100 gで示し（以下、単位省略)、ESR法の結果はIC_{50}値（%）で示した。
【結果】23℃発酵では、「笹蒲鉾＋塩＋水」をコントロールとすると、その時のORAC値は557であった。笹蒲鉾魚醤のORAC値は2,026から4,386の間に分散した。最もORAC値が低かった成分組成は、コントロール組成に米麹を添加したもので、最もORAC値が高かった成分組成は、コントロール組成に醤油麹とプロテアーゼM-SDを添加した試料区であった。一方、35℃発酵では、コントロールのORAC値は906であり、笹蒲鉾魚醤のORAC値は2,547から5,653の間に分散した。最もORAC値が低かった成分組成は、23℃発酵と同様、コントロール組成に米麹を添加した試料区で、最もORAC値が高かった成分組成は、コントロール組成に醤油麹を加えた試料区であった。概ね、23℃発酵よりも35℃発酵の方が高いORAC値を示した。23℃発酵と35℃発酵のいずれの試料区も、発酵1カ月までORAC値が上昇したが、1カ月から2カ月までの発酵期間では、変化が少なかった。一方、35℃発酵の実験区でのESR法の結果は、IC_{50}値が0.57%から0.37%の間に分散して、最も抗酸化能が高かったのは、コントロール組成に醤油麹と米麹を等量ずつ加えた試料区であった。この値は、市販魚醤の「しょっつる」と同程度の抗酸化能であった。

本研究の一部は、「宮城県に係る食料生産地域再生のための先端技術展開事業」において、「平成26年度低・未利用、低価格魚介藻及び加工残渣を原料とした加工品の開発等による水産加工の省コスト化・効率化、付加価値向上等に関する実証研究」の一環として行われた。

Sasa-kamaboko, fermentation, antioxidant activity

講演番号：2F22a02
講演日時、会場：3 月 27 日 09:11～ F 校舎 22 会場

タマネギの総ケルセチン含有量測定法の妥当性確認と北海道産タマネギ品種のケルセチン含有量測定

Validation of a method to quantify quercetin in onion, and varietal differences in quercetin contents of onions cultivated in Hokkaido

○渡辺 純[1]、室 崇人[2]、柳田 大介[3]、竹林 純[4]、山岸 喬[5]、石川（高野） 祐子[1]([1]農研機構食総研、[2]農研機構北農研、[3]道総研北見農試、[4]国立健栄研、[5]北見工大)
○Jun WATANABE[1], Takato MURO[2], Daisuke YANAGIDA[3], Jun TAKEBAYASHI[4], Takashi YAMAGISHI[5], Yuko ISHIKAWA(TAKANO)[1] ([1]Natl. Food Res. Inst., NARO, [2]Hokkaido Agric. Res. Cen., NARO, [3]Kitami Agric. Exp. Sta., Hokkaido Res. Org., [4]Natl. Inst. Health Nutr., [5]Kitami Inst. Technol.)

【目的】タマネギの主要なフラボノイドはケルセチン配糖体である。ケルセチン配糖体を酸加水分解し、総ケルセチン量を定量する方法としては妥当性の確認された AOAC 法が報告されているが、マテリアルはイチョウ葉エキスであった。本研究では、AOAC 法がタマネギ中の総ケルセチン定量にも適用可能か、添加回収試験および室間共同試験により確認した。さらに、本測定法を用いて北海道産タマネギ品種の総ケルセチン含有量を測定し、品種間の総ケルセチン含有量を比較した。

【方法】タマネギ凍結乾燥粉末にエタノール:水:塩酸 = 25:10:4 混合溶媒を加え、超音波処理後、90℃で 60 分間加熱し加水分解・抽出し、抽出液中のケルセチンを逆相 HPLC により定量した。タマネギ凍結乾燥粉末にケルセチン-3-*O*-グルコシドを 3 濃度で添加し、同様に抽出・定量して回収率を調べた。ケルセチン含有量の異なる 2 種類、2 反復の非明示のタマネギ凍結乾燥粉末を 4 試験室で分析し、併行精度・室間精度を調べた。北見農試にて栽培した 9 品種・系統のタマネギ凍結乾燥物粉末中の総ケルセチン含有量を同様の方法で定量するとともに、抗酸化能を酸素ラジカル吸収能測定法（ORAC 法）で測定した。

【結果および考察】AOAC 法により「北もみじ 2000」の総ケルセチン含有量を同一試験室で 3 反復、3 日間測定したところ、平均値は 3.48 g/kg 乾燥重 (DW)であり、併行精度・中間精度は相対標準偏差として 0.8%, 1.8%であった。添加したケルセチン-3-*O*-グルコシドの回収率は 98.42～100.31%と良好であった。室間共同試験では、総ケルセチン含有量の平均値は 2.80 および 6.61 g/kg DW、併行精度・室間精度は相対標準偏差として 0.41～0.92%, 6.73～7.62%であり、HorRat 値は 2 以下となった。以上より、AOAC 法はタマネギ中の総ケルセチン含有量測定に適用可能であると考えられた。9 品種・系統のタマネギ凍結乾燥物中の総ケルセチン含有量を比較した結果、新品種「クェルゴールド」の総ケルセチン含有量は 5.67 g/kg DW (75.3 mg/100g 新鮮重) であり、他の品種・系統よりも高かった。タマネギの抗酸化能は総ケルセチン含有量と正の相関を示し、クェルゴールドの抗酸化能は他の品種・系統よりも高値を示した。以上より、クェルゴールドは高ケルセチン含有・高抗酸化能を有する品種であると考えられた。

quercetin, onion, antioxidant capacity

講演番号：2F22a03
講演日時、会場：3 月 27 日 09:22～ F 校舎 22 会場

収穫時期の違いが国産ハーブの抗酸化能に及ぼす影響について

Seasonal changes in the antioxidant activities of herbs determined by the oxygen radical absorbance capacity method.

○上田 学[1]、田口 裕基[2]、渡辺 純[1]、荻田 佑[1]、後藤 真生[1]、新井 亮[2]、氏原 克人[2]、石川(高野)祐子[1] ([1]農研機構　食総研、[2]エスビー食品株式会社)
○Manabu Ueda[1], Yuuki Taguchi[2], Jun Watanabe[1], tasuku Ogita[1], Masao Goto[1], Ryo Arai[2], Katsuhito Ujihara[2], Yuko Takano-Ishikawa[1] ([1]NARO NFRI, [2]S&B Foods Inc.)

［背景］一般に「ハーブ」と呼ばれる植物群はポリフェノール類を多く含むため、高い抗酸化活性を有していることが知られているが、収穫時期による変動に関する知見はあまり得られていない。そこで本研究では、国産ハーブ 8 種に関して ORAC (oxygen radical absorbance capacity)法を用いて収穫時期による抗酸化活性の変動解析、およびポリフェノール含量の測定を行った。[実験方法]イタリアンパセリ、コリアンダー、セロリホワイト、クレソン、ルッコラ、マスタードグリーン、バジル、およびマーシュを対象に、3、5、9、および 12 月に収穫されたものを凍結乾燥後、粉砕した。高速溶媒抽出機(ASE-350)を用いて凍結乾燥粉末を n-ヘキサン : ジクロロメタン(1:1)で抽出し、親油性画分を得た。その後，引き続き酢酸酸性メタノール(メタノール：水：酢酸 ＝90: 90: 9.5: 0.5)を用いて抽出し、親水性画分を得た。親水性、および親油性画分は、それぞれ H-または L-ORAC 法による抗酸化能測定を行った[1、2]。また、親水性画分は、フォーリンチオカルト法を用いてポリフェノール含量を測定した。[結果・考察]供試したハーブの H-ORAC 値の範囲は 2931.9 ± 133.8 から 14380.1 ± 1082.2 μmol TE/100 g FW で、L-ORAC 値の範囲は 657.4 ± 52.3 から 6223.7 ± 929.8 μmol TE/100 g FW であった。最も高い抗酸化能を示したのがバジルであり、H-ORAC 値が 4453.2 ± 55.2 から 14380.1 ± 1082.2 μmol TE/100 g FW で、L-ORAC 値は 2931.9 ± 133.8 から 6223.7 ± 929.8 μmol TE/100 g FW であった。更に、イタリアンパセリの H-ORAC 値を除き、ハーブの ORAC 値はいずれも収穫時期によって異なることが分かった。また、セリ科は 5 月および 9 月の夏季に、アブラナ科は 12 月の冬季に H-ORAC 値が高くなる傾向を示し、L-ORAC 値も同様の傾向を示した。一方、バジルに関しては、H-ORAC 値は 3 月で高くなる傾向を示したが、L-ORAC 値は 5 月や 9 月で高くなる傾向を示した。次に、ハーブに含まれるポリフェノール含量を測定した結果、H-ORAC 値と同様の傾向を示した。また、H-ORAC 値とポリフェノール含量の相関関係を検討したところ、すべてのハーブにおいて正の相関を示し、特にバジルにおいてその相関は強く、決定係数は 0.99 であった。本研究の結果より、ハーブの抗酸化能は収穫時期によって異なることを明らかにした。更に、ハーブの抗酸化能には親水性抗酸化成分だけではなく親油性抗酸化成分の寄与も高いことも明らかにした。また、H-ORAC 値の寄与成分は主にポリフェノール類であることを示した。現在、ハーブの抗酸化能に寄与する成分の分析・同定を進めている。

[1]Watanabe et al. (2012) Analytical sience, 28, 159-165.
[2]Watanabe et al. (2013) Biosci. Biotecnol. Biochem. 77, 857-859.

herb, antioxidant, oxygen radical absorbance capacity

講演番号：2F22a04
講演日時、会場：3 月 27 日 09:33～ F 校舎 22 会場

ゴボウスプラウトの抗酸化能とポリフェノール成分

Antioxidant activity and polyphenolic compounds of burdock sprout

○高橋 亮祐[1]、阿部 準[2]、村山 里子[2]、原 崇[1,2]、城 斗志夫[1,2] ([1]新潟大農、[2]新潟大院自然科学)
○Ryosuke TAKAHASHI[1], Jun ABE[2], Satoko MURAYAMA[2], Takashi HARA[1,2], Toshio JOH[1,2] ([1]Niigata Univ., [2]Grad. Sch. Niigata Univ.)

【目的】生活習慣病の発症には遺伝的要因の他に食習慣が深く関係しており、特定の保健機能が期待される食品が研究・開発されている。機能性が注目される食品の一つにブロッコリースプラウトに代表されるスプラウトがある。発芽野菜であるスプラウトは種子より消化性が良く、発芽の過程で種子にはないビタミン類が合成される上、低カロリーである。また、スプラウトは生食が可能であるため、加工調理によるビタミン C 等の損失を最小限に抑えることができる。さらに、栄養機能に加えて抗酸化性、抗発癌性といった生理的機能も期待される。そこで本研究では、優れた機能性を持つ新たなスプラウトを見い出すことを目的に、種々の植物の種子から発芽野菜を栽培し、抗酸化能を評価した。その結果、ゴボウスプラウトに高い抗酸化能が見い出されたため、ポリフェノール成分を分析した。
【方法及び結果】種苗会社から購入した 33 種類の植物の種子を暗所下で栽培し、スプラウトを調製した。抗酸化能を DPPH ラジカル消去能活性により評価した結果、乾燥重量当たりの活性はソバスプラウトで最も高く、次いでゴボウスプラウト、紫カイワレダイコンの順であった。また、代表的抗酸化成分であるポリフェノールの含量をフォリンチオカルト法で測定した結果、ソバスプラウトとゴボウスプラウトの含量がほぼ同じで最も多く、次いで紫カイワレダイコンの順であった。33 種類のスプラウトの DPPH ラジカル消去活性とポリフェノール含量の相関関係を調べたところ、相関関数が 0.8 と高い正の相関が見られた。高い抗酸化能とポリフェノール含量を示したソバスプラウト、ゴボウスプラウト、紫カイワレダイコンのうち、ゴボウスプラウトだけが一般に市販されていない新規なスプラウトである。そこでゴボウスプラウトに着目し、ポリフェノール成分の分析を行った。ゴボウスプラウトを凍結乾燥後、0.1% ギ酸を含む 50% メタノール水溶液と 70% アセトン水溶液でポリフェノールを抽出し、ODS カラムを用いた HPLC で分析した結果、主要な 4 種類のポリフェノール成分が検出された。同時に通常の根菜であるゴボウについても分析したところ、スプラウトで検出された 4 種類のうち 2 種類は根菜には含まれておらず、これらはスプラウトに特異的なポリフェノールであることがわかった。それらスプラウトに特異的なポリフェノールを分取し、抗酸化能を測定した結果、2 種類のうちの一つは高い抗酸化能を持つことが示された。また、LC-MS 分析および吸収スペクトル分析によりゴボウスプラウトのポリフェノール成分の同定を試みた。その結果、スプラウトと根菜に共通の 2 種類のポリフェノールはクロロゲン酸、1,5-ジカフェオイルキナ酸と同定できたが、スプラウトに特異的な 2 種類のものについては両分析結果だけで構造を推定することはできなかった。

Burdock sprout, Antioxidant activity, Polyphenol

講演番号：2F22a05
講演日時、会場：3 月 27 日 09:44～ F 校舎 22 会場

バラや月桃などの抗酸化および抗糖化活性

Antioxidant and antiglycation Activity of *Rose damascena, Alpinia zerumbet, etc.*

○西本 有貴、猪飼 勝重、小林 常吉（白井松新薬株式会社）
○Yuki NISHIMOTO, Katsushige IKAI, Tsuneyoshi KOBAYASHI (Shiraimatsu Shinyaku Co., Ltd.)

【目的】植物の機能性成分を効率的に得る方法として低温減圧乾燥法を用い、機能性成分を含む乾燥物および芳香成分を含む蒸留エキス（芳香蒸留水）を得ることができた。我々は、このような方法で得た乾燥物および蒸留エキスに着目し、植物原料として食経験のあるバラ（*Rose damascena*）や月桃（*Alpinia zerumbet*）などを中心に、抗酸化および抗糖化活性を指標として、それらの機能性について検討した。
【方法および結果】低温減圧乾燥法により植物原料（バラ花弁や月桃葉など）から乾燥物および蒸留エキスを得た。乾燥物は粉砕し、使用した。この乾燥粉末をエタノール、50%エタノール、水でそれぞれ抽出し、抽出液を得た。得られた乾燥粉末の各抽出液および蒸留エキスについて、抗酸化（DPPH ラジカル消去）および抗糖化（ペントシジン合成阻害）活性の測定を行った。その結果、バラ乾燥粉末に高い抗酸化および抗糖化活性、月桃葉乾燥粉末および蒸留エキスに高い抗糖化活性があることを確認した。そこで、バラおよび月桃葉乾燥粉末に含まれている抗酸化および抗糖化物質を精製、単離した。分析の結果、バラ乾燥粉末は没食子酸であり、月桃葉乾燥粉末は Quercetin-3-*O*-glucuronide および Kaempferol-3-*O*-glucuronide であった。

antioxidant, antiglycation, *Rose damascena*

講演番号：2F22a06
講演日時、会場：3 月 27 日 10:05～ F 校舎 22 会場

糀の抗酸化活性評価と関連するポリフェノールの分析

Analysis on antioxidant activity and related polyphenols in koji

○中島 加奈子[1]、山﨑 京子[2]、木戸 みゆ紀[3]、林 真由美[3]、井口 晃徳[3]、重松 亨[3]([1]新潟薬大・産官学、[2]山﨑糀屋、[3]新潟薬大・応生科)
○ Kanako NAKAJIMA[1], Kyoko YAMAZAKI[2], Miyuki KIDO[3], Mayumi HAYASHI[3], Akinori IGUCHI[3], Toru SHIGEMATSU[3] ([1]Niigata Univ. Pharm. Appl. Life Sci. LCRDP, [2]Yamazaki koujiya, [3]Niigata Univ. Pharm. Appl. Life Sci.)

【目的】

糀は炊飯米に麹菌を撒き発酵させた食品であり、昔から味噌や醤油・酒などの発酵食品の製造に用いられてきた。発酵食品の生理活性については血圧上昇抑制効果や中性脂肪低減効果、肝臓保護効果などの報告がなされており、糀由来の酵素や発酵によって生成された成分によるものが多い。だが、糀そのものの生理活性についての報告例は少ない。

本研究では糀の効能に対する科学的検討の一つとして、糀中の水で抽出される水溶性成分の抗酸化活性に着目し、抗酸化活性の評価と抗酸化活性に関連する水溶性ポリフェノールの分析を行った。

【方法・結果】

糀(山﨑糀屋「生黄糀」以下黄糀)を凍結乾燥・粉末化し、4℃、 60 min の条件で得た水抽出物について ORAC 値の測定、比色法と ESR にて測定した DPPH ラジカル消去活性の測定、および DMPO スピン捕捉法を用いた OH ラジカル消去活性、SOD 様活性の測定を行った。コントロールである白米粉末と比較すると黄糀粉末は今回使用した測定法の全てで 2 倍以上の高い値を示し、他社製米麹粉末と比較したところ傾向は類似しているが ESR による DPPH ラジカル消去活性と OH ラジカル消去活性において強い活性を示した。このことから、他社製米麹粉末と黄糀粉末の間に対象ラジカルによる消去活性に違いが見られ、2 種の糀の抗酸化成分あるいはその組成に違いがある可能性が示された。

フォリン-デニス法による総フェノール量と塩化アルミニウム比色法を用いた総フラボノイド量を測定したところ、総フェノール量では白米粉末の 22.3 μmol-Gallic acid/100 g より 20 倍以上の高い値を示し、他社製米麹粉末と黄糀粉末では有意な差は見られなかった。総フラボノイド量では 3 つの試料間に有意な差は見られなかったが白米粉末より他社製米麹粉末と黄糀粉末が高い傾向を示した。このことからフラボノイド骨格を持たない低分子のフェノール性化合物が 2 種の糀の水抽出物に多く存在していると示された。

HPLC-UV/VIS を用いて測定波長 280 nm にてフェノール成分を分析したところ、白米粉末では今回検討した測定条件ではピークは検出されなかった。他社製米麹粉末と黄糀粉末では類似したピーク群が検出されたが、その存在比は異なることが示された。

現在、そのピーク群をフラクションコレクターにて収集し質量分析器を用いてフェノール成分の同定を進めている。

koji, antioxidant activity

講演番号：2F22a07
講演日時、会場：3 月 27 日 10:16～ F 校舎 22 会場

グリル加熱がナスの健康特性成分に及ぼす影響

Effects of Grilling on Polyphenol Content in an Eggplant

○内田 健太郎、冨田 晴雄、竹森 利和（大阪ガス株式会社）
○Kentaro UCHIDA, Haruo TOMITA, Toshikazu TAKEMORI (Osaka Gas Co., Ltd.)

【目的】健康特性成分を多く含むとされている種々の野菜は加熱され食されることも多い。一方で、加熱中の健康特性成分量の変化について中心温度、内部構造の観点より考察されている既報は少ない。本研究は、ガスグリル内の加熱においてナスの実部分における健康特性成分、健康特性指標の変化を明らかにし、変化の原因を解明することを目的としている。

【実験手法】岡山県産ナスを使用し、皮を除いたナスの実部分に対しナス軸方向と平行に直径 32 mm、高さ 20 mm にナスの実の部分をくり抜き加熱サンプルとした。グリル庫内の網中心部にサンプルを設置し、φ0.5 の熱電対をサンプルの高さ 10 mm の位置から軸方向に垂直に 16 mm 差し込み、測定される温度をサンプル中心温度(Center Temperature : CT)とし、50, 65, 75, 85, 95 ℃のそれぞれの条件で加熱を終了した。サンプル数は 50 ℃, 95 ℃について N=2、65 ℃, 75 ℃, 85 ℃について N=3 とした。未加熱サンプルについては切断後、加熱サンプルについては加熱後、速やかに凍結乾燥により水分除去を行い、乾燥後にミルサーで 1 分間粉砕した。粉末 0.10 g を使用し 80%エタノールで抽出を行い DPPH ラジカル補足活性, Total Polyphenol Contents (TPC), クロロゲン酸量(CGA)をそれぞれ測定した。

【結果・考察】サンプル中心温度の変化を図 1 に示す。中心温度が 50, 65, 75, 85, 95 ℃に達するまでにそれぞれ 4, 5, 7, 8, 13 分程度加熱した。それぞれのサンプルについて TPC, CGA 値を図 2 に示す。中心温度 50, 65, 75 ℃においては生の状態と比較し TPC, CGA 値が大きく減少した。サンプルの CGA 量維持率は 60 % (CT 50 ℃), 44 % (CT 65 ℃), 53 % (CT 75 ℃) 66 % (CT 85 ℃), 91 % (CT 95 ℃)と、中心温度 50 ℃から 65 ℃に上がるにつれて一旦減少し、65 ℃から 95 ℃にかけて増加していく傾向が見られた。CGA 等ポリフェノールは短時間加熱の場合、十分に失活されなかったポリフェノール酸化酵素等の働きにより加熱後に減少していると考えられる。一方、長時間加熱は内部温度が高くなりポリフェノール酸化酵素が失活するに十分な熱が加えられたこと、又は細胞壁の崩壊等で抽出が容易になったためポリフェノールの増加傾向が見られたと考えられる。

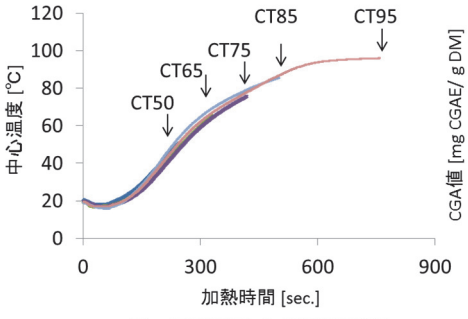


図1. 加熱温度と中心温度の関係

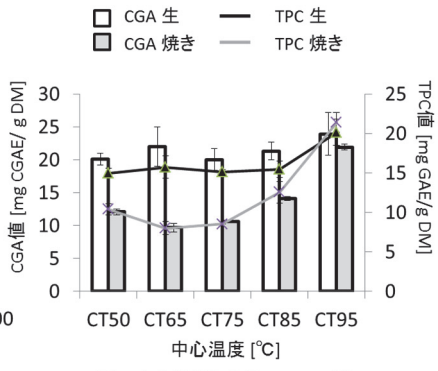


図2. 中心温度によるCGA, TPC値

eggplant, antioxidant capacity, chlorogenic acid

講演番号：2F22a08
講演日時、会場：3 月 27 日 10:27～ F 校舎 22 会場

脂質過酸化反応におけるチオール化合物と各種抗酸化物の併用効果解析

Combination effects of antioxidants with thiols in lipid peroxidation

○山内 良子[1]、小浜 友紀子[2]、小林 弘司[1]、松井 利郎[3]、石川 洋哉[1,2]（[1]福岡女子大学国際文理、[2]福岡女子大学院人間環境、[3]九州大学院農）
○Ryoko YAMAUCHI[1], Yukiko KOHAMA[2], Hiroshi KOBAYASHI[1], Toshiro MATSUI[3], Hiroya ISHIKAWA[1,2] ([1]International College of Arts and Science, Fukuoka Women's University, [2]Graduate School of Human Environment Science, Fukuoka Women's University, [3]Faculty of Agriculture Graduate School, Kyushu University)

【目的】我々は、薬剤の併用効果解析法である Median effect analysis を利用して各種抗酸化物の相乗・相殺効果の解析を行ってきた。DPPH ラジカル消去反応での解析では、システインやグルタチオン等のチオール化合物と種々のポリフェノール類との間で相乗効果が発現することを明らかにしている。一方、食品の酸化防止では、脂質過酸化反応系における抗酸化物の併用効果を明らかにすることが重要である。そこで、本研究ではチオール化合物と各種抗酸化物の抗酸化能をロダン鉄法により測定し、併用効果を Median effect analysis により解析した。
【方法】チオール化合物としてシステインおよびグルタチオンを用い、各種抗酸化物（ポリフェノール類中心）との併用効果を検討した。ロダン鉄法は、常法により行ったが酸化促進剤として AAPH を添加することにより反応時間 5 時間での抗酸化力を測定した。実験は、2 種類の抗酸化成分をそれぞれ単独で測定した後、各々を IC_{50} の濃度比で混合して活性測定を行った。得られた結果を基に Median effect plot を行い、直線の傾き m 値より各濃度レベルにおける Combination index (CI) 値を算出し、併用効果の判定を行った（CI<1：相乗効果、CI＝1：相加効果、CI>1：相殺効果）。
【結果】ロダン鉄法を用いてチオール化合物とカテキンの併用効果を解析した結果、グルタチオンとの併用では CI 値は 0.48～0.82 となり比較的強い相乗効果が得られた。同様に、システインとの併用でも強い相乗効果が確認され、0.46～0.68 の CI 値が得られた。また、システインで EGCg、EGC などのカテキン類との組合せでも同様の大きな相乗効果が確認されており、チオール化合物とカテキン類は脂質過酸化反応系において強い相乗効果を発現する可能性が高いことが示唆された。なお、以前行った DPPH 反応系においても上記の組合せで大きな相乗が確認されており、カテキン類とチオール類は反応系が異なっても相乗効果を発現することが確認された。一方、ケルセチンとの併用実験では異なる傾向が認められた。DPPH 法で強い相乗効果が確認されたグルタチオンとケルセチンでは、ロダン鉄法での CI 値が 1.06～2.83（相加～相殺効果）となり、システインとケルセチンとの併用でも CI 値 0.83～0.97（相加～弱相乗効果）の結果しか得られなかった。また、DPPH 法での相乗効果はシステイン＜グルタチオンであったが、ロダン鉄法では逆にシステインとの組合せでの相乗効果が強く出る傾向が認められた。以上、ロダン鉄法においてもチオール化合物と一部の抗酸化物は高い相乗効果を発現することが確認されたが、DPPH 法と大きく異なる傾向も確認され、反応系の違いが抗酸化物間での相互作用に大きく影響することが明示された。

Antioxidant, Combination effect, Lipid peroxidation

講演番号：2F22a09
講演日時、会場：3 月 27 日 10:38～ F 校舎 22 会場

焙煎コーヒーによるキサンチンオキシダーゼ阻害 - 酢酸エチル可溶画分の活性と活性物質 -

Xanthine oxidase inhibitory activity of the extract from roasted coffee beans, Inhibitory efficiency and active substances of the ethyl acetate-soluble fraction.

○本田 沙理[1]、西川 由華[1]、増田 晃子[2]、森山 顕登[2]、増田 俊哉[1] ([1]徳島大院・総合、[2]四国大・生活)

○Sari HONDA[1], Yuka NISHIKAWA[1], Akiko MASUDA[2], Kento MORIYAMA[2], Toshiya MASUDA[1] ([1]Tokushima Univ., [2]Shikoku Univ.)

【目的】2007 年，米国の Choi 等は，コーヒーを飲用することにより痛風発症が減少することを報告した。痛風は古くからある病気であるが，最近の食生活の変化により急激に罹患数が増えている生活習慣病である。痛風の原因は，過剰な血清尿酸によるものであり，Choi 等は，コーヒーがこの尿酸量を減少させることも報告している。しかしながら，現在までに，コーヒー中のどのような成分が，尿酸量を減少させ，痛風の軽減に寄与しているか明らかになっていない。我々は，尿酸生成はキサンチンオキシダーゼによることから，コーヒーのキサンチンオキシダーゼ阻害(XOI)活性について検討しており，昨年度の本大会にて，XOI 活性は，コーヒー生豆にはなく，焙煎したコーヒー豆にのみ認められ，さらにその焙煎豆の熱水抽出物の特徴成分であるクリプトおよびネオクロロゲン酸ラクトンの XOI 機能について報告した[1)]。本研究では，焙煎豆熱水抽出物の XOI 機能における上記クロロゲン酸ラクトンの寄与ならびにその他の活性物質について検討した。

【方法】焙煎豆の熱水抽出物自体の XOI 活性はそれほど高くないが，SEC 法により分画するとクロロゲン酸ラクトンを含む分画にその活性が顕著に表れることが判明している。[1)] そこで，熱水抽出物を各種の分画法に供し，活性物質を濃縮後， HPLC または LC-MS/MS 法でその特定を試みることにした。

【結果】コーヒー抽出物の Toyopearl HW-40 による SEC において，XOI 活性物質は担体吸着性と考えられたので，熱水抽出液の有機溶媒分画を試みた。その結果，酢酸エチル可溶部に顕著な活性が認められ，塩化メチレンや水可溶部ならびに不溶性部分には，活性が非常に弱いか見られなかった。なお，この酢酸エチル部にのみ，クリプトおよびネオクロロゲン酸ラクトン類が存在したが，その活性への寄与を確認するために，ODS カラムを用いた分取 HPLC にて，ラクトン溶出前画分，ラクトン画分，ラクトン溶出後画分に分画し，再度 XOI を評価したところ，ラクトン部のみならず，ラクトン溶出前や溶出後画分にも強い活性があることがわかった。しかし，これらの画分には特に主要な物質ピークはなかったため，LC-MS/MS による総成分分析に供したところ，溶出前画分には，クロロゲン酸ラクトンの異性体が，溶出後画分には，フェルラ酸，クマル酸のキナ酸エステルおよびそのラクトンならびにシキミ酸型に脱水したと考えられる多様な物質が存在することがわかった。現在それらの物質の XOI 活性への寄与について検討中であり，併せて報告する。

１）Honda, S. *et al*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.,* 12 (2014), in press.

roasted coffee beans, chlorogenic acid lactones, xanthine oxidase inhibition

講演番号：2F22a10
講演日時、会場：3 月 27 日 10:49～ F 校舎 22 会場

豚筋肉由来ペプチドの抗酸化作用―ラジカルによるオボアルブミン分解の抑制―
Antioxidant activity of peptides obtained from porcine myofibrillar proteins
○粂井 和奈、井上 航、江草(雑賀) 愛、西村 敏英（日本獣医生命科学大応用生命）
○Kazuna KUMEI, Wataru INOUE, Ai EGUSA, Toshihide NISHIMURA (Nippon veterinary and life science Univ.)

【目的】
これまでに、豚の筋原線維タンパク質（Mf）の加水分解物（MfP）が、脂質過酸化抑制作用や DPPH ラジカル捕捉作用などの抗酸化作用を有することを見出してきた。[1-2] また、各種活性酸素種（ClO・、OH・、ONOO・）によるオボアルブミン（OVA）の分解を MfP が抑制することも報告してきた。[3]
本研究では、MfP の添加による OVA のラジカル分解抑制作用に関して詳細な検討を行うことを目的とした。
【方法】
豚胸最長筋から、Mf を抽出した後、1/100 量（w/w）のパパインを加えて 37℃で 48 時間加水分解処理をした。4 倍容のエタノールを加え除タンパク処理した溶液の上清を、Mf 由来ペプチド（MfP）とした。MfP の OH・による OVA の分解抑制作用については、5、15、30、60、90、120 分間処理での経時変化を調べた。また、MfP は限外ろ過を行い、分子量 5000 以下の低分子画分と分子量 5000 以上の高分子画分に分け、それぞれの画分添加による OVA ラジカル分解抑制作用について調べた。強い抗酸化活性を示した画分は、ODS カラムを用いた HPLC で分画した。高分子画分におけるパパインの存在の有無をパパイン抗体を用いたウエスタンブロッティングで調べた。
【結果】
OVA を OH・で処理する時に、分子量分画した MfP 高分子画分を添加しても、OVA の分解が生じたことから、高分子画分には抗酸化作用が存在しないことが判明した。しかし、OVA に MfP の高分子画分だけを添加した時には、5 分後に OVA は一旦分解されたが、120 分後に一部の OVA が再合成された。高分子画分にはパパインの存在が確認されたことから、再合成は残存するパパインの活性部位によるプラステイン反応により引き起こされたと推定された。一方、低分子画分を添加した場合には、OH・による OVA の分解が強く抑制された。そこで、低分子画分をさらに HPLC で分画し、5 つの画分に分けた。そのうち、1 つの画分が最も強い抑制作用を示した。現在、ペプチドを単離し、同定を進めている。
1) Saiga, A. et al. J. Agric. Food Chem. 51 3661-3667 (2003), 2) Egusa Saiga, A. et al. Biosci. Biotech. Biochem. 77 2201-2204 (2013), 3) Inoue, W. et al. 2014 年度日本農芸化学会講演要旨 2B04a05

peptide, antioxidant activity, porcine muscle

講演番号：2F22a11
講演日時、会場：3 月 27 日 11:10～ F 校舎 22 会場

セロトニン由来キノン体のヒト LDL 修飾と細胞への作用
Modification of Human LDL by Quinone Derived from 5-Hydroxytryptamine :Effect on Cultured Cells

○菅 尚子[1]、石坂 朱里[1,2]、北元 憲利[1,2]、中村 宜督[3]、加藤 陽二[1,2] ([1]兵庫県大・環境人間、[2]兵庫県大・先端食科学研究センター、[3]岡山大院農・環境生命科学)
○Naoko Suga[1], Akari Ishisaka[1,2], Noritoshi Kitamoto[1,2], Yoshimasa Nakamura[3], Yoji Kato[1,2] ([1]Sch.Human Sci&Environ.,Univ.Hyogo, [2]RIFNS,Univ.Hyogo., [3]Grad.Sch.Environ.&Life Sci.,Okayama Univ.)

【目的】セロトニン（5HT）は生理活性物質であり、5-ヒドロキシインドール酢酸（5HIAA）に代謝され体外に排出される。たとえば5HTは、生体防御機構の一つとして働く酵素ミエロペルオキシダーゼ（MPO）の基質となることで、キノン体であるトリプタミンダイオン（TD）を生じる。In vitroにおいて、このキノン体はタンパク質のチオール基を付加修飾する（Kato et al., Chem. Res. Toxicol., 2009）。さらに、キノン体修飾タンパク質に対する特異モノクローナル抗体を用いたヒト動脈硬化病巣切片の免疫組織染色において、TD及びキノン5HIAA修飾物の蓄積が認められている。このことはセロトニンに由来するキノン体が動脈硬化の発症や進展に何らかの関与をしていることを示唆しているが、細胞や組織に与える影響は明らかにされていない。そこで本研究では、キノン体修飾LDLの細胞への取り込み、及び、食品成分によるLDL修飾阻害についての検討を行った。
【方法】アガロースゲル電気泳動を用いてキノン修飾LDLの移動度（電気陰性度）を調べ、さらにウエスタンブロットによりキノン修飾について解析した。マウス由来マクロファージ様細胞RAW264.7を用い、キノン修飾LDL（蛍光色素標識）の細胞への取り込みを継時的に調べた。in vitroにおけるLDL修飾阻害の検討では、SH化合物（グルタチオン（GSH、GSSG）及びN-アセチルシステイン（NAC））やポリフェノール（没食子酸及びケルセチン）などの抗酸化物質を試料として用いた。ELISA法及びウエスタンブロット法を用いてTDとLDLの付加反応及び阻害能を調べた。
【結果】共焦点レーザー顕微鏡により、キノン修飾LDLを標識している蛍光物質がRAW細胞に取り込まれたことを確認し、細胞からその蛍光物質を抽出して蛍光吸光度計により測定したところ、時間依存的なLDL取り込み量の増加が認められた。さらに修飾LDLの取り込みが細胞に与える影響について、遺伝子レベルで解析を検討中である。モデル実験ではSH化合物である GSH及びNACがTDのLDL修飾を顕著に阻害した。一方、没食子酸およびケルセチンでもLDL修飾を抑制する作用が認められ、没食子酸は濃度依存的にキノン修飾を抑制した。HPLC分析により、没食子酸とTDの反応液から付加体と考えられるピークが観察された。
　以上のことから、キノン修飾LDLがマクロファージの泡沫化を誘導する可能性が示唆された。またLDLへのキノン付加修飾を、チオール物質やフェノール性抗酸化物質が抑制できることを見出した。

LDL, serotonin, quinone

講演番号：2F22a12
講演日時、会場：3 月 27 日 11:21～ F 校舎 22 会場

宮崎県産シイタケおよびその加工品の抗酸化ストレス作用について

Studies on anti-oxidative stress of shiitake mushroom.

○近藤 知巳[1,2]、中島 有紀子[1]、渡辺 朋子[1]、吉山 佳世[1]、黒木 勝久[2]、福井 敬一[1]、水光 正仁[2]、榊原 陽一[2] ([1]（一社）宮崎県 JA 食品開発研究所、[2]宮崎大学大学院農学工学総合研究科)
○ Tomomi KONDO[1,2], Akiko NAKASHIMA[1], Tomoko WATANABE[1], Kayo YOSHIYAMA[1], Katsuhisa KUROKI[2], Keiichi FUKUI[1], Masahito SUIKO[2], Yoichi SAKAKIBARA[2] ([1]Miyazaki JA Food Research & Development, Inc, [2]Miyazaki Univ.)

【目的】宮崎県の生シイタケ生産量は、平成 21 年の統計では約 1,870 トンであり、菌床栽培を中心に生産量が増加している。また、干しシイタケの生産量は約 610トンとなっており、国内生産量の約 17%を占める全国 2 位の生産量となっている。生シイタケは、これまでに骨粗しょう症予防効果や抗腫瘍作用、抗血栓作用などの様々な生理作用が報告されており、抗酸化作用についてもカタラーゼなどの抗酸化酵素や熱に安定な化合物の存在が報告されている。しかしながら、シイタケの加工品による抗酸化ストレス作用の変化についての報告は無いことから、本研究では、宮崎県産のシイタケおよびその加工品の抗酸化ストレス作用について検討した。
【方法】宮崎県産シイタケを洗浄後、各種の加工を加えた物をフリーズドライ、エアドライまたは天日乾しに供した。それぞれ乾燥したシイタケは、ミルを用いて粉砕し、得られたシイタケ粉末 0.5g をメタノール 30ml で抽出した。その後、エバポレーターを用いて濃縮し、ジメチルスルホキシドに溶解した物をサンプルとした。これを、抗酸化剤応答配列（ARE）を導入したヒト肝がん細胞由来 HepG2-ARE ルシフェラーゼレポーターアッセイ系に供し、得られた発光強度の値から抗酸化ストレス作用を評価した。また、ウエスタンブロッティンングによりヘムオキシゲナーゼ-1（HO-1）の発現誘導について検討した。
【結果】レポーターアッセイの結果から、生シイタケおよび乾しシイタケのメタノール抽出物には、それぞれ抗酸化ストレス作用が確認された。また、シイタケは乳酸発酵によって、抗酸化ストレス作用が変化することが示された。ウエスタンブロティングの結果から、HO-1 の発現誘導が確認された。これらの結果より、シイタケは抗酸化ストレスを有し、加工や調理により変化することが示唆された。

anti-oxidative stress, shiiitake (L.edodes)

講演番号：2F22a13
講演日時、会場：3 月 27 日 11:32～ F 校舎 22 会場

植物オキシリピン 12-オキソ-フィトジエン酸の酸化ストレス誘発神経細胞障害に対する保護効果

Cytoprotective effects of 12-oxo phytodienoic acid, a plant-derived oxylipin jasmonate, on oxidative stress-induced toxicity in human neuroblastoma SH-SY5Y cells

○多木 - 中野 希[1,2]、小寺 淳[2]、太田 啓之[1] ([1]東工大・院生命理工学、[2]（株）田辺三菱製薬・探索研)
○Nozomi Taki-Nakano[1,2], Jun Kotera[2], Hiroyuki Ohta[1] ([1]Tokyo Tech., [2]Mitsubishi Tanabe Pharma Corp.)

ジャスモン酸類は、トマト等の野菜に含まれるアラキドン酸から産生されるオキシリピンで、植物内では酸化ストレス応答、病虫害応答、葯の開裂といった多様な生理作用を持つことが報告されている．ジャスモン酸類の構造は動物のプロスタグランジンとよく似ており，動物細胞においても何らかの生理的作用を持つ可能性が考えられるが，動物細胞におけるジャスモン酸類の作用はほとんど報告されていない．そこで本研究では，動物細胞におけるジャスモン酸類の酸化ストレスに対する作用を検討した．

ヒト神経芽細胞腫由来 SH-SY5Y 細胞に対して、ジャスモン酸類（12-オキソ-フィトジエン酸、ジャスモン酸、メチルジャスモン酸、ジャスモン酸イソロイシン、12-ヒドロキシジャスモン酸）を処理した後，過酸化水素刺激を行い、細胞生存率を測定したところ，12-オキソ-フィトジエン酸（OPDA）を処理した細胞でのみ過酸化水素刺激による細胞死が抑制された．さらに、OPDA は過酸化水素刺激によるミトコンドリア膜電位の低下ならびに活性酸素の産生を抑制し、酸化ストレスに対して保護的な作用を示した．OPDA の保護作用メカニズムを解明するために，動物細胞において酸化ストレス対する防御機構において重要な役割を担う転写因子 Nrf2 との関わりを検討したところ，SH-SY5Y 細胞において OPDA 処理により Nrf2 の核蓄積が認められた。また、Nrf2 下流に存在する抗酸化ストレス応答を担う遺伝子群の発現やそれに伴うグルタチオン合成の誘導が認められた。さらに SH-SY5Y 細胞へ Nrf2 の siRNA を導入したところ、OPDA による過酸化水素刺激に対する細胞死の抑制効果が減弱した．

以上の知見より，OPDA は動物細胞において Nrf2 経路を活性化することにより，酸化ストレスに対する保護作用を示すことが示唆された。OPDA を含む食品の摂取は、生体が受ける種々酸化ストレスに対して有効である可能性が考えられる。

＜参考文献＞

Cytoprotective effects of 12-oxo phytodienoic acid, a plant-derived oxylipin jasmonate, on oxidative stress-induced toxicity in human neuroblastoma SH-SY5Y cells.
Biochim Biophys Acta. 1840 (2014) 3413-22.

OPDA, Nrf2, oxidative stress

講演番号：2F22a14
講演日時、会場：3 月 27 日 11:43～ F 校舎 22 会場

ピロロキノリンキノン（PQQ）とその誘導体の生理活性の比較
Comparison of biological activities of pyrroloquinoline quinone (PQQ) and its derivatives
○中路 昌志[1]、池本 一人[2]、中野 昌彦[2]、山田 康枝[1] ([1]近畿大・院・工、[2]三菱瓦斯化学（株））
○ Masashi NAKAMICHI[1], Kazuto IKEMOTO[2], Masahiko NAKANO[2], Yasue YAMADA[1] ([1]Grad.Sch,of Engineering.Kinki Univ., [2]Mitsubishi Gas Chemical Co. Inc.)

【目的】ピロロキノリンキノン（PQQ）は母乳，キウイ，ピーマンなどの果物・野菜類に含まれ，多くの生理活性があることが知られており，医薬品，化粧品，サプリメントの有効成分としての使用が期待されている．その作用は，活性酸素及びラジカルの消去作用，細胞増殖促進作用，神経成長因子産生促進作用など多岐にわたっている．ミトコンドリアの増殖にも関与し，離乳マウスに PQQ を添加した餌を 4 週間与えると，PQQ を欠餌した離乳マウスと比べ肝細胞のミトコンドリア量が増加することが報告されている．しかし，作用機序は不明な点が多い．一方で，PQQ は非常に高い反応性を示すため，製剤を調製する際にアミノ基含有物質と容易に反応し，イミダゾール骨格を形成してイミダゾロピロロキノリン（IPQ）を形成することが報告されている．神経細胞は酸化ストレスに対して脆弱であるため，この脆弱性を改善できればパーキンソン病などの酸化ストレスに原因の一端があると考えられている病気の症状改善につながる．6-ヒドロシキドーパミン（6-OHDA）は神経細胞に特異的に作用する神経毒である．今回は，酸化型 PQQ，還元型 PQQ，IPQ，$IPQNa_3$ の，6-OHDA と活性酸素の一種である H_2O_2 によるヒト神経芽細胞腫株 SK-N-SH への毒性に対する細胞保護効果を検討した．また，PQQ によるミトコンドリア量の増加を見るために RT-PCR を用いてミトコンドリア量の指標となる human COX4/1 発現量を測定した．
【方法】SK-N-SH 細胞を 2.0×10^5 cells/ml に調整し 96well マイクロプレートに播種し，24 時間 37℃ 5%，CO_2 インキュベーター内で培養した．培養後，酸化型と還元型の PQQ，IPQ，$IPQNa_3$ を添加し 10 分間インキュベートし，6-OHDA を 50μM，100 μM 添加 24 時間後，または，H_2O_2 を 5 mM 添加 10 分後，MTT assay 法により細胞生存数を求め，6-OHDA と H_2O_2 に対する保護効果を検討した． PQQ 添加し，24 時間培養後，mRNA を抽出し，逆転写後，TaqMan プローブを用いて、GAPDH と human COX4/1 の発現量を RT-PCR を行い測定した．
【結果】6-OHDA による細胞死を，酸化型 PQQ，還元型 PQQ は 100 nM で抑制し，特に還元型 PQQ の方が高い保護効果を示した．一方，IPQ も PQQ と同様に 6-OHDA による細胞死からの保護効果が見られた．以上の結果から、IPQ も PQQ 同様に神経細胞保護効果を持つことが示された．また，ミトコンドリア量に関しては，保護効果の高い還元型 PQQ100 nM 存在下で human COX4/1 の発現量が増加した．PQQ が直接細胞に作用して，ミトコンドリア量を増加させている可能性が示唆された．

Pyrroloquinoline quinone, Imidazolopyrroloquinoline, 6-ohda

講演番号：2F22p02
講演日時、会場：3 月 27 日 14:11～ F 校舎 22 会場

カニクイザル由来 UDP-グルクロン酸転移酵素におけるポリフェノール類代謝能の解析

Functional analysis of cynomolgus monkey UDP-glucuronosyltransferase for polyphenol metabolism

○高平 梨可[1]、西川 美宇[1]、宇野 泰広[2]、池中 良徳[3]、石塚 真由美[3]、榊 利之[1]、生城 真一[1]([1]富山県大・工・生物工、[2]新日本科学、[3]北大院・獣医・環境獣医)
○ Rika TAKAHIRA[1], Miyu NISHIKAWA[1], Yasuhiro UNO[2], Yoshinori IKENAKA[3], Mayumi ISHIZUKA[3], Toshiyuki SAKAKI[1], Shinichi IKUSHIRO[1] ([1]Dep. of Biotech., Fac. of Engineer., Toyama Pref. Univ., [2]Shin Nippon Biomedical Laboratories, [3]Dep. of Env. Vet. Sci., Grad. Sch of Vet. Med., Hokkaido Univ.)

【目的】UDP-グルクロン酸転移酵素（UGT）は異物代謝第２相酵素であり、医薬品や食品中機能性成分であるポリフェノール化合物などの生体異物に対するグルクロン酸抱合を触媒する。この抱合反応による極性増大で体外への排出を促している。特にポリフェノールなどの機能性発揮にはその代謝が大きく寄与しており、体内動態を含めた代謝予測は生理活性の発現機構を解明する上でも重要である。遺伝子ファミリーを形成する UGT はヒトでは 22 種類の UGT 分子種が同定されており、それぞれの基質特異性、組織特異性は異なる。医薬品開発における非臨床試験ではげっ歯類、イヌ、サルなどの動物が利用されることが多く、中でもカニクイザル(mf)は分子系統的にヒトに最も近いことが知られており、食品成分の機能性を調べる上でもヒト代替動物として有用であると考えられる。本発表ではポリフェノール代謝予測における分子基盤としてカニクイザル由来 UGT1A 分子種のポリフェノール代謝能を解析した。
【方法】mfUGT1A 分子種９種（1A1, 1A2, 1A4a, 1A5a, 1A6, 1A7, 1A8, 1A9, 1A10）を自律複製型発現ベクターpGYR にそれぞれ組込み、出芽酵母 AH22 に酢酸リチウム法を用いて遺伝子導入した。それぞれの形質転換体によりミクロソーム膜画分を調製し、ウェスタンブロット法によってタンパク発現を確認した。さらに UDP-グルクロン酸供給系との同時発現によるグルクロン酸抱合能を有する酵母株の構築もそれぞれの分子種について行った。調製したミクロソーム膜画分と様々な基質を UDP グルクロン酸存在下で反応させることによって抱合能を解析した。
【結果・考察】mfUGT 発現酵母ミクロソームにおける C 末端共通領域に対するペプチド抗体を用いたウェスタンブロット解析より、それぞれの UGT1A 分子種が発現していることを確認した。また、いずれの分子種もモデル基質であるスコポレチンに対するグルクロン酸抱合能を示した。ケルセチンに対する抱合能（7,3,4',3' 位水酸基）はヒトと同様に腸管で発現している分子種（UGT1A1,1A8,1A9,1A10）が顕著な活性を示した。また、レスベラトロールを基質にした場合には 3 位の水酸基に対する抱合能を優位に示した。グルクロン酸抱合能を有する酵母株においても培地中にポリフェノールを添加することにより抱合体生成を直接検出することが可能であり、抱合体合成系としても有用である。以上のように、酵母発現系を用いた mfUGT1A 分子種の機能解析により、ヒト代替動物としてのカニクイザルにおけるポリフェノール類に対するグルクロン酸抱合能を UGT 分子種レベルで理解することが可能となった。

UDP-glucuronosyltransferase, Cynomolgus monkey, Polyphenol

講演番号：2F22p03
講演日時、会場：3 月 27 日 14:22～ F 校舎 22 会場

青森県産カシスの in vitro および in vivo 試験系によるゲノムディフェンダー活性評価

In vitro and In vivo Evaluations of the Genomedefender activities of blackcurrant produced in Aomori prefecture

○山本 歩[1]、廣内 篤久[2]、中嶋 奏[1]、川守田 早織[1]、奥谷 悠吾[1]、上平 好弘[3]、加藤 陽治[4]([1]八戸工業高等専門学校物質工学科、[2]環境科学技術研究所、[3]弘前大学地域共同センター、[4]弘前大学教育学部)

○Ayumi YAMAMOTO[1], Tokuhisa HIROUCHI[2], Kana NAKASHIMA[1], Saori KAWAMORITA[1], Yugo OKUYA[1], Yoshihiro KAMITAI[3], Yoji KATO[4] ([1]National Institute of Technology, Hachinohe College, [2]Institute for Environmental Sciences, [3]Center for Joint Research, Hirosaki University, [4]Hirosaki University)

これまでに著者らは出芽酵母 LOH 検出系（突然変異検出系）より青森県産カシスが種々の変異原（H_2O_2、MMS、UV）に対するゲノムディフェンダー活性を示すことを報告している（従来の「抗変異原性」より、一般の人により伝わりやすい言葉として「ゲノムディフェンダー」を提案する）。そこで、本年度はヒトリンパ芽球由来培養細胞株 TK6 を用いた H_2O_2 や放射線損傷に対するカシスの活性評価結果ならびにマウスを用いたマイトマイシン C に対する活性評価の結果を報告する。

TK6 を用いた *in vitro* 試験系では、H_2O_2 やγ線照射によって増加する小核発生頻度、突然変異発生頻度、細胞内活性酸素の上昇がカシスエキス（Blackcurrant extract；BCE）処理により抑制されることが明らかとなった。また、マウスを用いた *in vivo* 小核試験では、マイトマイシン C の腹腔内投与による小核発生頻度の上昇をカシスの強制経口投与により減少させることができることが明らかになった。

以上の結果より、カシスエキスは生体内でもゲノムディフェンダー活性を有する可能性が示唆された。

（本研究は科研費若手（B）24780136、および日本カシス協会研究助成、青森市農林水産部の御協力のもと遂行されました）

Blackcurrant, Genomedefender, Antimutagenic activity

講演番号：2F22p04
講演日時、会場：3 月 27 日 14:33～ F 校舎 22 会場

麹菌が産生する環状ペプチド　デフェリフェリクリシンによるマウス血清尿酸値の低減効果

Reducing effect on serum uric acid levels in mice by Deferriferrichrysin, a cyclic peptide produced by *Aspergillus oryzae*

○大浦 新、村上 直之、入江 元子、堤 浩子、秦 洋二（月桂冠総研）
○Shin OURA, Naoyuki MURAKAMI, Motoko IRIE, Hiroko TSUTSUMI, Yoji HATA (Res. Inst., Gekkeikan Sake Co. Ltd.)

【目的】デフェリフェリクリシン（Dfcy）は麹菌が産生する環状ペプチドであり，これが鉄をキレート結合したものが清酒の着色物質フェリクリシン（Fcy）である．Dfcy や Fcy は清酒や米麹としての食経験から，物性や安全性については公知であるが，その機能性や生理活性が研究対象になったのは最近のことである．当社では Dfcy の鉄キレート能や抗酸化活性に注目し，これに関連した各種機能性を探索している．その結果，腸管虚血再還流ラットにおける抗炎症作用 [1)] やヒト皮膚三次元モデルおける美白効果 [2)] などを確認するに至った．さらに *in vitro* 試験管モデル系で Dfcy が他のシデロフォアと同等以上の SOD 様活性を示したことから，キサンチンオキシダーゼ（XOD）阻害による優れた尿酸生成抑制作用が期待できると考えた．そこで今回，マウスに Dfcy を自由摂取させたときの血清尿酸値を調べることで，痛風予防に有効な健康食品素材としての可能性を検討した．
【方法】ddy マウス雄 5 週齢に対し，通常食 CE-2（日本クレア）と通常水を自由摂取させ，その後 n＝6 で 3 群に分けた．11 週齢に達した時点で I 群は通常水，II 群は 0.2%Dfcy 水，III 群は 1.0% Dfcy 水に切り替えて，2 週間自由摂取させた（短期試験）．引き続き I 群は通常水，II 群は試験を終了，III 群は 0.1%Dfcy 水に濃度を下げて，20 週齢まで自由摂取を継続させた（長期試験）．血清尿酸値は，Dfcy 投与 3 週間前，投与 1 週間後，2 週間後，9 週間後に尾部採血し，LCMS で測定した．また血清自体の XOD 酵素活性についても SOD 活性検出キット（和光純薬工業）で測った．
【結果】通常水 I 群の血清尿酸値は，8 週齢時に比べて 12 週齢時までに自然上昇しており，これ以降でほぼ一定値に達していた．短期試験では通常水の尿酸値に比べて，0.2%Dfcy 水が抑制傾向，1.0%Dfcy 水が有意な抑制効果を示した（dunnett 検定；$p<0.05$）．長期試験では通常水の尿酸値に比べて，0.1%Dfcy 水が有意な抑制効果を示した（t 検定；$p<0.05$）．また血清の XOD 活性を測定したところ，短期試験，長期試験とも Dfcy 投与では阻害されておらず，I 群から III 群まですべて同等の値を示した．さらに既存の尿酸低減剤アロプリノールについても，同様の試験系でマウスに投与したところ，血清 XOD 活性の顕著な低下が確認できた．以上の結果から，当初 *in vitro* 試験で見られた Dfcy の SOD 様活性は，XOD による O^{2-}生成を阻害したのではなく，O^{2-}消去の促進作用によるものだと考えた．このように Dfcy は従来の痛風改善薬とは異なり，XOD 阻害以外の新規メカニズムによって，尿酸値を下げる可能性が示唆された．
1)入江ら 2012 年日本農芸化学会大会講演要旨集　2B18a13
2)大浦ら 2012 年日本農芸化学会大会講演要旨集　2B18a14

Deferriferrichrysin, Serum uric acid levels, Gout treatment

講演番号：2F22p05
講演日時、会場：3 月 27 日 14:44～ F 校舎 22 会場

育毛効果を有するアーユルヴェーダハーブの探索

Screening for Ayurvedic herbs that show hair growth effect

○三木 健輔[1]、米倉 佑香[1]、高氏 裕貴[1]、Mohammad N HOSSAIN[2]、鮎沢 大[1,2]、藤井 道彦[1]（[1]横浜市大・生命ナノ、[2]イチバンライフ（株））
○ Kensuke MIKI[1], Yuka YONEKURA[1], Yuki TAKAUJI[1], HOSSAIN Mohammad N[2], Dai AYUSAWA[1,2], Michihiko FUJII[1] ([1]Yokohama City Univ., [2]ICHIBAN LIFE CORP.)

毛髪は毛根・毛球・毛包・毛母細胞などいくつかの組織から成り立っている。成長期の毛根の下部には球状をした毛球が存在し、その中は毛母細胞で満たされている。その毛母細胞に囲まれるようにして毛乳頭細胞が存在している。毛乳頭細胞は毛髪の成長に非常に重要な役割をもち、毛細血管から養分を受け取り毛母細胞に受け渡したり、様々な細胞増殖因子を産生したりする。毛乳頭細胞が産生した細胞増殖因子が毛母細胞を刺激して細胞分裂を促進させ、毛母細胞が分裂し角化することで毛髪となる。

薄毛の原因は、様々な要因が絡み合っている。これまでに、男性ホルモンであるテストステロンを５αリラクターゼがジヒドロテストステロンに変換し、このジヒドロテストステロンが男性の脱毛を引き起こす原因になることが報告されている。他にも、細胞の成長を促進し休眠状態にある毛乳頭細胞を活性化するＩＧＦ１、血管新生を促進する作用を持つＶＥＧＦ－Ａ、休止期にある毛包を成長期に導くＨＧＦ、脱毛に関係するＴＧＦ－β、発毛抑制作用を持つＦＧＦ１８など様々な遺伝子が報告されている。また頭皮の老化も関係している。

そこで本研究では、世界最大の植物利用学であるアーユルヴェーダに着目し、育毛効果があるとされているハーブから抽出液を作製し、毛乳頭細胞において様々なマーカーの発現量の変化を検証した。また、数種類のハーブ抽出液からなる育毛剤を作製し、マウスを用いて育毛試験を行ったので報告する。

Ayurvedic herb, Hair growth, Papilla Cell

講演番号：2F22p06
講演日時、会場：3 月 27 日 15:05～ F 校舎 22 会場

源生林あしたばの暑熱ストレスに対する精巣保護効果
Protective effect of Genseirin ashitaba on testicular dysfunction induced by heat stress
○國府 大智、阿部 友紀子、鈴木 望美、鈴木 志織、柏原 真一、吉田 滋樹、浅野 敦之、宮崎 均（筑波大生命環境）
○Daichi KOKUBU, Yukiko ABE, Nozomi SUZUKI, Shiori SUZUKI, Shinichi KASHIWABARA, Shigeki YOSHIDA, Atsushi ASANO, Hitoshi MIYAZAKI (Tsukuba Univ.)

［目的］畜産業において夏季の高温状態による繁殖障害が知られている。これは夏季不妊と呼ばれ雄雌両方に起因し、食肉、卵、牛乳の安定供給の面で大きな問題となっている。精巣は精子形成のため体温よりも低い温度を維持しているが、外部温度の上昇により精液量、精子数の減少、精子の運動性の低下、精子の奇形率の増加を引き起こすことが報告されている。本研究で用いるあしたば（*Angelica keisei*）は八丈島原産のセリ科植物で古くから食用や薬草として用いられている。特に源生林あしたばは耐寒性を備えた変異株で、機能性飼料をはじめ様々な活用法が期待されている。当研究室では、源生林あしたば及びその含有成分が暑熱ストレスによる卵巣の排卵障害を改善することを明らかにしている。そこで本研究では、暑熱ストレスに対する源生林あしたばの精巣保護作用の検討を行った。

［方法］8 週齢の雄 ICR マウスを対照区（33 ℃）と暑熱区（42 ℃）に分け、各温度の恒温槽で 20 分間暑熱処理を行った。精巣内酸化還元レベルの測定は、暑熱処理後 24 時間後に解剖し精巣をホモジェナイズして GSSG/GSH Quantification kit （同人化学)によって測定した。精子濃度、受精能の測定、及び抗酸化酵素の発現レベルの評価は、暑熱処理 28 日後に解剖を行い、精巣及び精巣上体を取り出し各測定を行った。また、組織学的に観察するため暑熱処理から 48 時間後に解剖を行い、精巣切片を作成し HE 染色を行った。各実験のあしたばパウダー投与群においては、暑熱処理前から解剖まで、あしたばカルコンパウダー（日本生物.科学研究所）を 75 mg/kg/day になるように投与した。

［結果］28 日後の解剖では、暑熱区の精巣内で GSH/GSSG 比率が低下していたことから、暑熱ストレスが酸化ストレスに変換されていることが示された。また、暑熱処理において精子濃度及び受精能が減少したが、あしたばパウダー投与により有意に改善された。さらに、あしたば投与群において精巣内の抗酸化酵素の発現レベルが上昇していた。精巣切片の観察においては、暑熱区で精巣内の損傷が大きいのに対し、あしたばパウダー投与群では改善されていた。これらの結果は、源生林あしたばが精巣内の抗酸化酵素の発現上昇を介して、暑熱ストレスに対する抵抗性を付与することを示唆している。以上より、源生林あしたばが雌雄両方の暑熱ストレスによる繁殖力低下の改善に有効であることが明らかとなり、家畜の夏季不妊対策の機能性飼料として期待できることが示された。

Angelica keiskei, Reproduction, Heat stress

講演番号：2F22p07
講演日時、会場：3 月 27 日 15:16～ F 校舎 22 会場

酸化ストレスと創傷への糖類の効果

Effects of sugers on oxidative stress and injury

○山田 康枝、鈴木 直人、安藤 正隆、片井 優二、中西 慧（近畿大工）
○ Yasue YAMADA, Naoto SUZUKI, Masataka ANDO, Yuji KATAI, Kei NAKANISHI (Kinki.Univ.)

【目的】酸化ストレスは，細胞の DNA，細胞膜上のリン脂質，蛋白を傷害し，生体の構造や機能を乱している．体内の酸化ストレスが増加すると，動脈硬化，心筋梗塞，糖尿病，癌など，さまざまな病気が発症すると考えられている．アルコールの代謝により生成される acetaldehyde（AcH）は肝細胞を障害し，過剰な場合，アルコール性肝硬変など，様々な肝障害を招くおそれがある．本研究では，AcH，エタノール（EtOH），過酸化水素（H_2O_2)を作用させた肝ガン細胞に対して酸化ストレスに対する保護効果がないかを主に糖類を用いて検討した．糖類の中にはエネルギー源としてだけではなく．抗ガン作用など．近年，様々な生理活性を持つものが知られてきている．トンガ王国産のモズクに含まれるフコイダンから作られたサプリメントであるリムベール SD(SD)，リムベール L-1(L-1)，リムベール HV-Free(HV)，日本酒に含まれるα-エチルグルコシド（α-EG)，グリコシルグリセロール(α−GG)，植物に含まれるガラクトシルグリセロール（β−GG）といった食品に含まれる糖類を添加して EtOH，AcH，H_2O_2 に対する効果をヒト肝ガン由来細胞株 HepG2 を用いて検討した．また．創傷治癒効果も検討するため．HepG2 およびヒト神経芽細胞腫株 SK-N-SH を用いてスクラッチアッセイを行った．

【方法】ヒト肝ガン由来細胞株 HepG2 に，EtOH 200 mM，AcH 50 mM，$H_2O_2$10 mM と α−EG，α−GG，β-GG，フコイダンを加え，EtOH 200 mM は 37℃，5%CO_2 インキュベータ内で 24h インキュベーションする．AcH 50 mM，$H_2O_2$10mM は 10 分間室温でインキュベーションし，MTT assay を用いて細胞生存率を測定した．また，抗酸化の指標としてアスコルビン酸 500 μM を用いた．また，創傷治癒効果を検討するため，コンフルエントの育った HepG2 および SK-N-SH 細胞にキズを入れて，スクラッチアッセイを行いその回復を測定した．

【結果と考察】EtOH による傷害に対するフコイダン，α−EG，α−GG，β-GG の細胞保護効果を検討した結果，リムベール L-1 15 μg/ml，リムベール HV-Free 15 μg/ml，，α−EG，α−GG，β-GG は 100 μM においてに有意に保護効果を示した．AcH と H_2O_2 に対する保護効果は見られなかった．

スクラッチアッセイにおいて，β-GG は HepG2 対する創傷治癒効果を示さなかったが，SK-N-SH 細胞では創傷治癒効果が見られた。酸化ストレス保護効果があり、創傷治癒効果が見られたことから、フコイダンやα−EG，α−GG，β-GG にも、エネルギー源としてだけでなく、生理活性があることが示唆された．

suger, fucoidan, oxidative stress

講演番号：2F22p08
講演日時、会場：3 月 27 日 15:27～ F 校舎 22 会場

ケラチノサイトのバリア機能に対するウシラクトフェリンの促進効果

The promoting effect of bovine lactoferrin on keratinocyte barrier function

○内田 良[1,2]、青木 玲二[1]、青木(吉田) 綾子[1]、田島 淳史[2,3]、鈴木 チセ[1]、高山 喜晴[1] ([1]農研機構・畜草研、[2]筑波大生物資源、[3]筑波大院生命環境)
○Ryo Uchida[1,2], Reiji Aoki[1], Ayako Aoki-Yoshida[1], Atsushi Tajima[2,3], Chise Suzuki[1], Yoshiharu Takayama[1] ([1]National Agriculture and Food Research Organization, [2]Univ. of Tsukuba, [3]Graduate School of Life and Environmental Science, Univ. of Tsukuba)

（目的）
ラクトフェリン（LF）は鉄結合性の糖蛋白質で、乳だけでなく生体内の外分泌液や好中球に多く含まれている。LF は強い抗菌性や抗炎症作用などの機能を持つほか、皮膚の繊維芽細胞と角化細胞の増殖や遊走の促進による創傷治癒促進機能も有していることが報告されている。しかし、LF の角化細胞の分化への影響はいまだ解明されていない。生体で、角化細胞は表皮の最下層で分裂し、成熟に伴い皮膚上層に移行していく。分化が進む事で角化細胞はタイトジャンクション（TJ）や周辺帯を形成し、細胞間の結合は高まる。本研究では、LF の角化細胞の分化に及ぼす効果をバリア機能の面から検討した。
（方法）
バリア機能の評価には細胞層を隔てた経上皮電気抵抗(Transepithelial electric resistance、TER)値を用いた。角化細胞のモデルとして、ヒト不死化角化細胞（HaCaT)を用い、セルカルチャーインサートに播種した。継代培養はダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)で行った。分化誘導は、培養液を一旦、増殖培地（CnT-07;CELLnTEC)に置換した後、コンフルエントになるまで培養し、分化培地[1.8 mM の $CaCl_2$ を添加した CnT-02 培養液(CELLnTEC)]に置換することで行った。ウシラクトフェリン（BLF）(5 μM,10 μM）は、分化誘導開始と同時に培養液に添加した。BLF を添加した培地で 2 日おきに培地の交換と TER の測定を行った。また、分化開始から 3 日目に、角化細胞の分化マーカーであるインボルクリンとフィラグリンの発現量をウェスタンブロッティングで測定した。
（結果・考察）
HaCaT の分化誘導に伴い TER 値の経時的な上昇が観察された。BLF を添加した HaCaT では、コントロールと比べ、早い段階での TER 値の上昇が認められた。またインボルクリン、フィラグリンの発現は BLF の濃度依存的に上昇した。これらの結果から、ラクトフェリンは角化細胞の分化誘導を促進することで、表皮のバリア機能を高める事が示された。

lactoferrin, keratinocyte, differentiation

講演番号：2F22p09
講演日時、会場：3 月 27 日 15:38～ F 校舎 22 会場

酵素合成グリコーゲンは、酸化ストレスを軽減することで炎症性腸疾患を改善する

Enzymatically synthesized glycogen inhibits colitis through decreasing oxidative stress

○三谷 塁一[1]、吉岡 泰淳[2]、古屋敷 隆[3]、芦田 均[1] ([1]神戸大院農、[2]神戸大自然科学、[3]江崎グリコ（株）健康科学研究所)
○Takakazu MITANI[1], Yasukiyo YOSHIOKA[2], Takashi FURUYASHIKI[3], Hitoshi ASHIDA[1] ([1]Grad. Sch. Agr. Sci., Kobe Univ., [2]Org. Adv. Sci. Tech., Kobe Univ., [3]Ezaki Glico Co., Ltd. Institute of Health Sciences)

【目的】酵素合成グリコーゲン（ESG）と天然由来グリコーゲンには、物理化学上の差異はない。ESG は、生体内のα-アミラーゼに対する耐性が比較的高く、一部が難消化性グリコーゲン（RG）となる。これまでに ESG は免疫賦活や抗腫瘍作用をもつことが報告されている。一方で、多糖類の中には、抗酸化作用をもつものが報告されているが、ESG が抗酸化作用をもつかについては不明である。そこで、本研究では、ESG の新たな機能を見出すことを目的として、炎症性腸疾患に対する ESG の抗酸化作用について検討した。
【方法】C57BL/6 マウスに 2%デキストリン硫酸ナトリウム（DSS）を 1 週間自由飲水させることで大腸炎を誘発させた。DSS の飲水開始 1 週間前から ESG（100 mg/day）を経口投与し、ESG が DSS により惹起される大腸炎に及ぼす影響を検討した。大腸上皮に存在するマクロファージ細胞を想定して、RAW264.7(マウスマクロファージ)細胞に ESG、RG もしくは天然由来グリコーゲンを添加して AAPH により発生した活性酸素種（ROS）の蓄積量および抗酸化遺伝子の発現量の変化を検討した。
【結果】DSS によって惹起されたマウスの大腸の萎縮は、ESG の摂取によって抑制された。大腸における酸化ストレスの指標である脂質過酸化物の蓄積量は DSS によって増加したが、ESG を摂取することで DSS 非投与群と同程度まで減少した。また ESG 摂取群では抗酸化タンパク質である heme oxygenase (HO)-1 の発現量の増加が認められた。RAW264.7 細胞において、ESG ではなく RG が HO-1 の発現量を濃度依存的に増加した。一方、天然由来グリコーゲンは HO-1 の発現量に影響を示さなかった。RG は、AAPH によって蓄積した ROS の蓄積を減少した。また、抗酸化遺伝子の発現を調節する転写因子である Nrf2 を siRNA でノックダウンすることで、RG による HO-1 の発現量の増加は抑制され、AAPH による ROS の蓄積抑制効果も解除された。
【結論】細胞系の実験で RG は、抗酸化作用を有することが示されたが、ESG は抗酸化作用を有しておらず、ESG は経口投与することで、抗酸化作用を発揮した。これらのことから、ESG のα-アミラーゼによる消化物である RG は、マクロファージ細胞に作用し、Nrf2 を介した抗酸化性タンパク質 HO-1 の発現量を増加することで ROS の蓄積を減少することで抗酸化作用を示すことが明らかとなった。

enzymatically synthesized glycogen, oxidative stress, heme oxygenase-1

講演番号：2F22p10
講演日時、会場：3 月 27 日 15:49～ F 校舎 22 会場

発酵乳ケフィアが筋肉細胞のエネルギー代謝に及ぼす効果

Effects of Kefir on energy metabolism in skeletal muscle cells

○原田 大輔[1]、松山 豪彦[1]、徳丸 浩一郎[2]、白畑 實隆[1,3]、照屋 輝一郎[1,3] ([1]九大院生資環、[2]日本ケフィア、[3]九大農院)
○ Daisuke HARADA[1], Hidehiko Matsuyama[1], Koichiro Tokumaru[2], Shirahata Sanetaka[1,3], Kiichiro Teruya[1,3] ([1]Grad. Sch. Biores. Bioenv. Sci., Kyushu Univ,, [2]Nihon Kefir Co. Ltd,, [3]Fac. Agr., Kyushu Univ,)

【目的】

メタボリックシンドロームは、内臓脂肪の蓄積などによりインスリン抵抗性が生じ、糖代謝異常や脂質代謝異常などの動脈硬化の危険因子が一個人に重積している状態である。当研究室では、発酵乳ケフィアのメタボリックシンドロームに対する有効性を研究しており、これまでにケフィアのグルコース取込み増強活性や脂肪酸β酸化増強活性などを確認してきた。そこで本研究では、ケフィアの抗酸化活性及び筋肉細胞のエネルギー代謝に及ぼす影響とそのメカニズムを検討することを目的とした。

【方法】

ケフィア標品は、日本ケフィア株式会社から提供されたケフィア粉末と製造法の異なる高タンパク質ケフィア粉末を使用した。抗酸化活性の評価は、DPPH ラジカル消去活性試験と ORAC 法により行った。また、分化誘導処理を行ったマウス C2C12 筋管細胞にケフィア処理を行い、WST-1 assay により細胞の呼吸活性の評価を行った。さらに、Western blotting より、エネルギー代謝ホメオスタシスの主要な調節因子である AMP 活性化プロテインキナーゼ（AMPK）とインスリンシグナル経路の Akt の活性化に及ぼすケフィアの影響を評価した。また、定量 PCR によりミトコンドリア生合成に関連する PGC-1αのmRNA 発現に及ぼす影響を評価した。

【結果・考察】

DPPH ラジカル消去活性試験と ORAC 法の結果から、ケフィアが抗酸化活性を有することが確認された。また WST-1 assay により、ケフィアが筋肉細胞のエネルギー代謝を亢進させることが確認された。特に高タンパク質ケフィアにおいてこれらの活性が高いことが確認された。さらに、Western blotting と定量 PCR の結果から、ケフィアにより AMPK と Akt が活性化され、PGC-1α のmRNA 発現が増加したことが確認された。以上より、ケフィアがエネルギー代謝の亢進を介してメタボリックシンドロームの予防・改善効果を有することが示唆された。

kefir, skeletal muscle, energy metabolism

講演番号：2F22p11
講演日時、会場：3 月 27 日 16:10～ F 校舎 22 会場

乳酸菌*Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ　ｐｌａｎｔａｒｕｍ*の脂肪酸代謝物による酸化ストレス防御機構の活性化

The activation of antioxidative response by fatty acid metabolites generated by lactic acid bacterium, *Lactobacillus plantarum*

○古元 秀洋[1]、ターナット ナンティルッチャナー[1]、久米 利明[2]、朴 時範[3]、北村 苗穂子[4]、岸野 重信[4]、小川 順[4]、平田 孝[1,5]、菅原 達也[1] ([1]京大院農 応用生物科学、[2]京大院薬、[3]京大院農 産業微生物、[4]京大院農 応用生命科学、[5]四條畷学園大)
○Hidehiro FURUMOTO[1], Nanthirudjanar THARNATH[1], Toshiaki KUME[2], Si-Bum PARK[3], Nahoko KITAMURA[4], Shigenobu KISHINO[4], Jun OGAWA[4], Takashi HIRATA[1,5], Tatsuya SUGAWARA[1] ([1]Division of Applied Biosciences, Graduate School of Agriculture, Kyoto Univ., [2]Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto Univ., [3]Industrial Microbiology, Graduate School of Agriculture, Kyoto Univ., [4]Division of Applied Life Sciences, Graduate School of Agriculture, Kyoto Univ., [5]Sijonawate Gakuen Univ.)

酸化ストレスは様々な疾患の要因の一つとして考えられており、酸化ストレスに対する防御は健康維持に重要とされている。転写因子Ｎｒｆ２は親電子性物質によって活性化され抗酸化遺伝子や第二相薬物代謝酵素の発現を誘導し、生体の酸化ストレス防御機構の中心的役割を担っている。したがってＮｒｆ２を活性化する食品成分は酸化ストレスに起因する疾患に対して予防的に働くことが期待される。我々は近年、乳酸菌の不飽和脂肪酸飽和化代謝によるヒドロキシ脂肪酸やオキソ脂肪酸などの希少脂肪酸産生を見出した（Ｋｉｓｈｉｎｏ，ｅｔａｌ.，*Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ.*，２０１３）。腸内細菌叢は宿主の免疫応答や脂質代謝に影響を与えることが明らかになってきており、乳酸菌にもプロバイオティクス作用など様々な機能が知られている。一方で、腸内細菌叢の脂質代謝産物が宿主に与える影響についてはこれまで充分な研究がなされていない。乳酸菌脂肪酸代謝物の一部が生体内においても検出されており、これらが生理機能を有している可能性も考えられる。そこで本研究では乳酸菌*Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ　ｐｌａｎｔａｒｕｍ*により産生されたヒドロキシ脂肪酸とオキソ脂肪酸がＮｒｆ２を介した酸化ストレス応答に与える影響について検証した。

ヒト肝癌由来細胞株ＨｅｐＧ２を乳酸菌*Ｌ．　ｐｌａｎｔａｒｕｍ*による様々な脂肪酸代謝物で処理し、過酸化水素による酸化ストレスを与えた時の細胞生存率を評価した。その結果、１０−ｏｘｏ−１１*Ｅ*−１８：１（ＫｅｔｏＣ）が最も強く過酸化水素による細胞生存率の低下を抑制した。ＫｅｔｏＣ処理によってヘムオキシゲナーゼ１などの抗酸化酵素の遺伝子発現が有意に増加した。またＮｒｆ２のタンパク質発現と転写活性をそれぞれウェスタンブロット法とレポーターアッセイで評価したところ、どちらもＫｅｔｏＣ処理によって有意に上昇した。生体におけるＫｅｔｏＣの効果を検証するため、ＩＣＲマウスにＫｅｔｏＣを経口投与し、各臓器における遺伝子発現を調べた結果、いくつかの抗酸化遺伝子の発現上昇が認められた。

以上の結果から、ＫｅｔｏＣはＮｒｆ２の活性化を介して抗酸化酵素の発現を促進することで、細胞の酸化ストレス防御を亢進させることが示され、酸化ストレスに起因する様々な疾患の予防や改善に有効な作用を示すことが期待された。また本研究で評価をおこなった他の脂肪酸代謝物はＮｒｆ２転写活性に影響を与えなかったことから、Ｎｒｆ２活性化作用にはＫｅｔｏＣ特有のエノン構造が関わっていると考えられた。

fatty acid metabolites, Nrf2, oxidative stress

講演番号：2F22p12
講演日時、会場：3 月 27 日 16:21～ F 校舎 22 会場

運動負荷および肥満がカドミウム体内分布におよぼす影響

Effects of exercise and obesity on the distribution of cadmium in mice

○吉城 由美子、西尾 尚子、村中 穂乃花、木村 愛、小櫻 沙貴（石川県大）
○Yumiko Yoshiki, Syouko Nishio, Honoka Muranaka, Ai Kimura, Saki Kozakura (Ishikawa Pref. Univ.)

[目的]

カドミウム（Cd）は重金属の一種であり、土壌中に広く分布している。そのため、食品にも微量ながら含まれ、我々は一般的な日常生活の中で常に Cd に暴露されている。これまで、日本では、Cd の長期摂取が原因となる公害病（イタイイタイ病）が報告されている他、Cd が肝臓、腎臓、脂肪細胞に蓄積しやすく、糖尿病、腎炎、高血圧を引き起こすことがわかっている。本研究では、Cd 摂取時における Cd の体内分布を調べ、運動負荷時の Cd 体内動態を明らかにすることを目的とした。

[方法]

C57BL/6J 系統マウス（雌、４週齢）を１週間の予備飼育後、標準食群（N 群）と高脂肪食群（H 群）に分けた。それぞれの半数に摂取量が 0.6 mg/kg/day となるように $CdCl_2$ を調製し、飲み水として Cd を投与した。(NC 群、HC 群)。また、各群に 2 回/week、水深 10cm、水温 23±2℃、30 分の遊泳を負荷した、運動負荷群を設けた（NE 群、NCE 群、HE 群、HCE 群)。体重測定とフンの採取を 1 回/week で行い、86 日間飼育した。解剖後、腎臓、肝臓、卵巣周囲脂肪、体毛、大腿骨、大腿四頭筋を採取し、Cd 測定は偏光ゼーマン原子吸光光度計（Hitachi）を用いて行った。血清 Glu、T-Cho、HDL-Cho、AST、ALT を分析した。腎臓 MT1,MT2、肝臓 IR, IRS、卵巣周囲脂肪 GLUT4 の mRNA 発現量を RT-PCR で測定した。

[結果]

体重は N 群と H 群で有意差が、また、臓器重量では卵巣周囲脂肪でのみ有意差（$p<0.01$）がみられた。これらのことから、本研究で使用した Cd 濃度による体重および臓器重量への影響はないと考えられる。血清 Glu は H 群が 168.7±24.8 mg/dL であったのに対し FE 群では 79.0±4.8 mg/dL と、運動による低減効果が見られた。しかし、Cd 投与群ではこの低減効果が妨げられた。卵巣周囲脂肪での GLUT4mRNA 発現量に差がなかったことから､Glu 取り込み以外での影響が関与していると考えられる。Cd 投与群で比較すると、腎臓、大腿骨の Cd 含量が N 群より H 群で高い値となった（$P<0.01$)。卵巣周囲脂肪の Cd 含量は N 群と H 群間に優位な差はないが、H 群の脂肪量が 5 倍近いことから、体内脂肪中の total Cd 含量が高く、肥満時では体内 Cd 蓄積量が増加することがわかった。

cadmium, exercise, obesity

講演番号：2F22p13
講演日時、会場：3 月 27 日 16:32～ F 校舎 22 会場

食事由来酸化コレステロールの生体内抗酸化システムへの影響

Effects of dietary oxidized cholesterol on antioxidant system in rats.

○関原 花会、木村 優、長田 恭一 (明治大農)
○HANAE SEKIHARA, YUU KIMURA, KYOICHI OSADA (Meiji Univ.)

【目的】加工食品中のコレステロールは、製造あるいは保存の過程で酸化変成して毒性を示す酸化コレステロール(Oxc)となる場合がある。生体内の Oxc レベルが上昇した結果、脂質代謝が変動したり抗酸化システムが損なわれるような有害な影響が惹起されることが報告されている。本研究では、ラットに Oxc を投与し、経時的な生体内の Oxc レベルの変化を調べるとともに生体内の抗酸化システムの変動についても検討した。

【方法】7 週齢の Wistar 系雄ラットを予備飼育した後に、脂質成分を含まない AIN76 純化飼料を 2 日間自由摂食させ、12 時間絶食させた後、Oxc を 50 mg 含むエマルションを経口投与した。投与後は、再び脂質成分を含まない AIN76 純化飼料を自由摂食させ、0、3、6、12、24、48 時間後に腹部動脈より採血死させ、肝臓と血漿の Oxc レベルおよび生体内抗酸化に関わる種々のパラメータを測定した。

【結果】肝臓の Oxc レベルは、Oxc を投与した後に除々に高まり、Oxc を投与して 12 時間後に最大濃度となった。なお、血漿については現在解析している段階である。生体内の様々な活性酸素種の除去に関わる酵素である CAT、SOD 及び Gpx の各酵素活性は、肝臓の Oxc レベルが比較的高くなった Ocx 投与 6～12 時間後に高くなる傾向を示し、その後除々に活性は低くなっていく傾向となった。一方、過酸化脂質レベルの一指標となる TBARS レベルについては、Oxc の投与で変化は認められなかった。

【考察】本研究では、Oxc の投与により肝臓の Oxc レベルは高くなっていったが、生体内の抗酸化に関わる酵素の活性にわずかな変動が認められたものの、過酸化脂質の上昇は認められず、Oxc の毒性に関連する抗酸化システムの急性的な変動は認められなかった。以上の結果から、Oxc の摂取による急性的な生体内の抗酸化システムの障害はなく、恒常的な Oxc 摂取による慢性的な障害が過去に報告した結果に繋がっていると考えられた。

oxidaized cholesterol, antioxidant system

講演番号：2F22p14
講演日時、会場：3 月 27 日 16:43～ F 校舎 22 会場

高脂肪食摂取は老化による脂質吸収能低下を抑制する

High fat diet intake inhibits the decrease of lipid absorption ability with aging

○山本 和史、都築 毅（東北大院農）
○Kazushi Yamamoto, Tsuyoshi Tsuduki (Tohoku Univ.)

【目的】老化とは加齢依存的に機能が低下することで、この老化を予防し、老後も QOL を維持して天寿を全うするためには、食生活と栄養のあり方が大きく影響する。近年、高齢者の低栄養状態が大きな問題となっている。最近我々は、この問題の要因の一つとして、高齢者の消化管吸収能の低下に着目し、マウスを用いて実験したところ、老化により脂質吸収能が低下することを示した［1]。加えて、マウスは老化が進行して死に至るとき、体重と内臓脂肪量が大きく減少することを認めている。そこで本研究では、老化によるこれらの現象を防ぐ方法として高脂肪食に着目し、老齢時の高脂肪食摂取が、脂質吸収能や体組成にどのような影響を与えるのか検討することとした。
【方法】実験動物として老化促進マウスである SAMP8 マウス（3 ヶ月齢、♂）を使用した。SAMP8 マウスの老化が始まる 6 ヶ月齢まで通常飼育食で飼育し、そのまま屠殺する 6C 群、12 ヶ月齢まで通常飼育食で飼育する 12C 群、6 ヶ月齢以降 12 ヶ月齢まで高脂肪食で飼育する 12F 群の計 3 群を用意した。屠殺前に、脂質吸収能を評価するために経口脂質負荷試験（OFTT）を行った。屠殺後は血液と各種臓器を採取して生化学的分析に供した。
【結果】終体重は 12F 群で高い値を示したが、内臓脂肪重量に群間で差は見られなかった。OFTT では、脂質吸収曲線に群間で大きな差は無かったが、曲線下面積（AUC）が 12C 群で低下傾向を示したが、12F 群は大きな変化が見られなかった。トリアシルグリセロール（TG）濃度は、血清と肝臓において 12F 群で有意に増加した一方、膵臓・小腸に差は見られなかった。また、肝臓・膵臓・小腸における TG 吸収関連遺伝子の発現量を測定したところ、群間で差は見られなかった。さらに、小腸をヘマトキシン・エオジン染色により、組織学的観察を行ったところ、老化による絨毛の退化が 12C 群では進行していたのに対して、12F 群では抑えられている様子が観察された。
【結論】老齢時からの高脂肪食摂取により、脂質吸収能の低下が抑制されることが明らかとなり、その理由の一つに、老化による小腸絨毛退化の抑制が考えられた。

【参考文献】

[1] K. Yamamoto, Y. Kitano, S. E, Y. Hatakeyama, Y. Sakamoto, T. Honma, T. Tsuduki. Decreased lipid absorption due to reduced pancreatic lipase activity in aging male mice. Biogerontology 2014; 15(5): 463-473.

aging, lipid absorption, SAMP8

講演番号：2F22p15
講演日時、会場：3 月 27 日 16:54～ F 校舎 22 会場

卵黄摂取によるマウス加齢性難聴の抑制　～若齢マウスを利用した老化の短期評価系～

Egg yolk prevents age-related hearing loss in young C57/BL6 mice

○大池 秀明、一法師 克成、小堀 真珠子 (農研機構/食総研)
○Hideaki OIKE, Katsunari IPPOUSHI, Masuko KOBORI (NARO/Food Research Institute)

マウスやヒトは加齢とともに聴力が低下することが知られている（加齢性難聴)。特徴として、高音域ほど進行が早く、ヒトの場合、モスキート音と呼ばれる 17kHz 程度の高音域はほぼ 10 代の若者にしか聞こえない。多くの実験系マウスにおいても、6 ヶ月齢あたりの若齢から顕著に高音域の聴力が低下する。また、この加齢性難聴の進行は、カロリー制限やコエンザイム Q10、α リポ酸などの抗酸化物質の摂取により抑制されることが報告されており、栄養・食品成分による老化予防効果の評価系として有効であることが期待される。ここでは、若齢の C57BL/6J マウスを利用して、鶏卵の食餌摂取による加齢性難聴予防効果について検討した結果を報告する。

＜方法＞10 週齢の C57BL/6J マウスを購入し、2 週間の予備飼育後、10 匹ずつ 6 群に振り分けた。1 群は若齢コントロール群（3 ヶ月齢）として、8, 16, 32kHz の音域における聴力を聴性脳幹反応試験（ABR）により測定した。残りの 5 群は、以下の 5 種類の食餌を与え 3 ヶ月間飼育し、6 ヶ月齢の時点で ABR による聴力測定を行った。①コントロール食 ②鶏卵（全卵）粉末 20%含有食 ③鶏卵（全卵）粉末 8%含有食 ④卵白粉末含有食（①の卵白相当量） ⑤卵黄粉末含有食（①の卵黄相当量)。

＜結果＞6 ヶ月齢のコントロール群の聴力は、若齢コントロール群（3 ヶ月齢）と比較して、8kHz の閾値は変化していなかったのに対し、16kHz, 32kHz の高音域では有意に聴力が低下しており、特に 32kHz の低下が著しかった。全卵もしくは卵黄を与えた 3 群はコントロール群と比較して、16、32kHz の聴力低下が有意に抑制され、特に 16kHz においては、若齢コントロール群と同等の聴力を保持していた。一方、卵白含有食群は、コントロール群と同程度に 16、32kHz の聴力が低下していた。

＜考察＞全卵もしくは卵黄の食餌摂取により聴力の低下が抑制されたことから、卵黄部に加齢性難聴抑制効果を示す成分があることがわかる。また、評価系に関しては、高音域の聴力測定を行うことで、若齢マウスを利用した 3 ヶ月間の試験により、老化の表現型の 1 つである加齢性難聴を充分に評価可能であることが示された。本評価系は、一般的な若齢野生型マウスを利用し、3 ヶ月間という比較的短期間で老化が評価可能であることから、抗老化食品のスクリーニング系として有用であると考えられる。また、加齢性難聴は聴覚神経細胞死に起因するため、スクリーニングで有効性が認められた栄養・食品成分は、神経系の老化全般にも有効であることが期待される。さらに、この評価系は非侵襲的であることから、同一個体で進行する加齢をリアルタイムで追跡することが可能であり、食餌効果のみならず各種ストレスによる老化の進行度の評価など様々な試験への応用が可能である。

Age-related Hearing Loss, Yolk, Aging

講演番号：2F22p16
講演日時、会場：3 月 27 日 17:15～ F 校舎 22 会場

光老化モデルマウスに対するラクトフェリンおよびラクトフェリン分解物投与によるしわ形成抑制効果

Oral administration of bovine lactoferrin and lactoferrin-hydrolysate suppresses UVB-induced wrinkle formation in hairless mice.

○村田 麻衣[1,2]、大久保 俊平[2]、柿田 ひとみ[2]、若林 裕之[1]、山内 恒治[1]、阿部 文明[1]、野村 義宏[2]([1]森永乳業・食基研、[2]東農工大農・硬蛋研)
○Mai MURATA[1,2], Shumpei OKUBO[2], Hitomi KAKITA[2], Hiroyuki WAKABAYASHI[1], Koji YAMAUCHI[1], Fumiaki ABE[1], Yoshihiro NOMURA[2] ([1]Morinaga Milk Industry. Co., Ltd., [2]Tokyo University of Agriculture and Technology)

【目的】
紫外線への曝露は、皮膚の乾燥、しわ、たるみなどの光老化を誘導する。我々は、牛乳由来機能性タンパク質ラクトフェリン（LF）を紫外線照射したヘアレスマウスに経口投与することにより、抗炎症作用を介して皮膚のバリア機能低下を抑制する効果を報告している（日本農芸化学会 2014 年度大会)。今回、我々は LF およびペプシンで分解したラクトフェリン分解物（LFH）を用いて、しわの形成に対する予防効果を検討した。

【方法】
ヘアレスマウス（Hos:HR-1、雄 6 週齢）を予備飼育後、紫外線非照射のコントロール群（UV-群)、紫外線照射のコントロール群（UV+群)、紫外線照射と同時に被検物質を投与する LF 群（UV+LF 群）および LFH 群（UV+LFH 群）に群分けした。紫外線（UVB）は週に 3 回、8 週間照射し皮膚の光老化を誘導した。LF あるいは LFH は、紫外線照射期間中に毎日胃ゾンデにより経口投与し、健康状態を毎日観察した。紫外線照射後に、背部皮膚の経表皮水分蒸散量（TEWL）の測定およびしわレプリカの採取を行い、皮膚バリア機能およびしわの形成状態を評価した。また、表皮の肥厚状態を組織学的に観察した。

【結果】
すべての群で試験期間中の体重変化に有意差は見られなかった。紫外線照射後に、UV+群では UV-群と比較して有意な TEWL の上昇が見られたのに対し、UV+LF 群および UV+LFH 群で有意な TEWL の低下が認められ、LF および LFH 投与により皮膚バリア機能が同等に維持されたことが確認された。また、採取したしわレプリカを用いて、三次元画像解析装置によるしわ形成状態の解析を行った。その結果、UV-群と比べ UV+群で最大しわ深さの増加が見られたのに対し、UV+LF 群および UV+LFH 群で低下が認められた。紫外線で誘導される表皮の肥厚も UV+LF 群および UV+LFH 群で抑制されていた。以上の結果から、LF および LFH の投与は、光老化における皮膚バリア機能の低下およびしわの形成を抑制することが明らかとなった。

wrinkle, UV, lactoferrin

講演番号：2F22p17
講演日時、会場：3 月 27 日 17:26～ F 校舎 22 会場

アロエステロール®含有 AVGP による皮膚弾力性低下予防作用のメカニズムの解明

Mechanism of inhibition of the decreasing of skin elasticity in UVB irradiation-induces skin aging model by AVGP containing Aloesterol®

○齊藤 万里江、田中 美順、三澤 江里子、姚 瑞卿、山内 恒治、阿部 文明（森永乳業・食基研）
○Marie SAITO, Miyuki TANAKA, Eriko MISAWA, Ruiqing YAO, Kouji YAMAUCHI, Humiaki ABE (Morinaga Milk Industry Co., LTD)

【背景】アロエベラゲルは、アロエベラの食用の葉肉部分で、ヨーグルトなどの食品素材として広く使用されている。我々はこれまでに、動物試験および乾燥肌の女性を対象とした臨床試験において、アロエステロール®含有アロエベラゲルパウダー（AVGP）経口摂取による、シワ深度の改善および皮膚水分量の増加作用を明らかにしている。今回、光皮膚老化モデルマウスを用いて、AVGP 経口摂取による皮膚弾力性に対する効果を確認するとともに、そのメカニズムを明らかにするために、皮膚組織の解析を行ったのでその結果を報告する。
【方法】10 週齢メス Hr-1 マウスに 0（対照）、または 0.3 % AVGP 添加飼料を 8 週間摂取させた。混餌投与開始 3 週間目から、3 回/週の頻度で紫外線 B 波（UVB）を照射した。照射量は、1 回あたり 48 mJ/㎠から開始し、段階的に 200 mJ/㎠まで増加させ、最終的に総線量で 2.3 J/㎠を照射した。照射 6 週目に皮膚粘弾性を評価し、照射 7 週間目に背部皮膚組織を採取した。採取した皮膚組織中の Matrix metalloproteinase（MMP）発現量を測定し、さらに皮膚組織中のヒアルロン酸量を測定するとともにヒアルロン酸合成酵素（Has）の遺伝子発現変化を解析した。また、血中アディポネクチンの測定を行った。
【結果】弾力性の指標である F3 は、UVB 照射により低下したが、AVGP 摂取群では有意に高値を示した。また、UVB 照射による MMP-2 発現量の増加が AVGP 摂取によって有意に抑制され、MMP-9 増加も抑制傾向が認められた。さらに皮膚中のヒアルロン酸量が UVB 照射によって低下したが、AVGP 投与群では有意に抑制され、Has2 の発現低下および血中アディポネクチン濃度の低下も阻害された。
【結語】光老化モデルにおける、AVGP 摂取で認められた皮膚弾力性低下予防作用は、①皮膚組織中のコラーゲン線維やエラスチン分解酵素である MMP-2 および-9 の、UVB 照射で誘導される過剰な発現増加の抑制を介した真皮層中の細胞外マトリックスの変性予防、ならびに②ヒアルロン酸合成低下の抑制によるものであることが示された。これらの結果より、アロエステロール含有®AVGP は、抗光皮膚老化作用を持つ食品成分として有用である可能性が示された。

Aloe vera, Photoaging, matrix metalloproteinase

講演番号：2F22p18
講演日時、会場：3 月 27 日 17:37～ F 校舎 22 会場

レスベラトロール配糖体を豊富に含むメリンジョ種子抽出物の皮膚老化に対するアンチエイジング作用

Resveratrol derivative-rich melinjo seed extract protects age-related skin atrophy

○渡辺 憲史[1]、澁谷 修一[1]、小澤 裕介[1]、岡本 直樹[2]、河村 和弘[2]、清水 孝彦[1]([1]千葉大学院・医先進加齢医学、[2]聖マリアンナ医科大学　産婦人科)
○Kenji WATANABE[1], Shuichi SHIBUYA[1], Yusuke OZAWA[1], Naoki OKAMOTO[2], Kazuhiro KAWAMURA[2], Takahiko SHIMIZU[1] ([1]Chiba Univ. Grad. Sch. of Med. Dept. of Advanced Aging Med., [2]St. Marianna Univ. Sch. of Med. Dept. of Obstetrics & Gynecology)

【目的】レスベラトロール (RSV)は *Sirt1* の活性化によるミトコンドリア機能向上や高脂肪食負荷マウスの寿命延長など様々なアンチエイジング作用が報告されている。しかし、皮膚老化に対する RSV の効果は報告されていない。そこで、B6 マウスに対して長期の RSV 経口投与を行い、組織中の Sirtuin (*Sirt1~7*)の発現変化を解析したところ、肝臓では Sirtuin の発現変化は見られなかったが、皮膚で *Sirt1* のみ特異的に発現増加していることが判明した。我々はこれまでに細胞質に局在する主要な抗酸化酵素である CuZn-superoxide dismutase (CuZn-SOD, SOD1)を欠損させたマウスは酸化傷害が亢進し、皮膚萎縮や骨量減少など様々な加齢様症状を呈し、老化モデルマウスとして報告してきた。また、MSE には RSV をはじめ RSV 二量体やその配糖体が豊富に含まれることが報告されている。このマウスに対して RSV および MSE の経口投与で皮膚病態を解析し、RSV の皮膚老化に対するアンチエイジング作用を明らかにすることを本研究の目的とした。
【方法】4 週齢の雄 SOD1 欠損マウスに 0.04% RSV と 0.1%および 0.5%メリンジョ種子抽出物 (MSE)混餌資料を 12 週間投与し、16 週齢で皮膚萎縮改善効果の有無を組織学的、生理学的に解析した。
【結果・考察】混餌飼料摂取による摂餌量や飲水量、空腹時血糖値の変動は認められなかった。しかし、混餌飼料投与によって SOD1 欠損マウスの血漿中酸化ストレスマーカーの減少し、さらに野生型マウスと同程度の皮膚厚を示すことから SOD1 欠損による皮膚萎縮の改善効果が示された。また、投与マウスの皮膚中で *Sirt1* の発現増加、コラーゲン合成遺伝子 *Col1a1* や老化関連遺伝子 *p53* の発現が正常化することも判明した。さらにマウス皮膚組織培養では RSV 投与によって細胞の増殖率が増加することも明らかとなった。以上の結果から、本研究によって RSV および MSE 経口投与による *Sirt1* 活性化を起因とした皮膚に対するアンチエイジング作用が明らかとなった。

Resveratrol, Melinjo seed extract, CuZn-superoxide dismutase

講演番号：2F22p19
講演日時、会場：3 月 27 日 17:48～ F 校舎 22 会場

DNA マイクロアレイ解析によるイミダゾールジペプチドの機能性及びその分子基盤の解明
Identification and functional evaluation of imidazole dipeptide by DNA microaray

○原田 額郎[1]、久恒 辰博[2]、松田 博史[3]、戸塚 護[4]、松本 貴之[5]、片倉 喜範[6] ([1]九大院シス生、[2]東大院新領域、[3]国立精神・神経医療研究センター、[4]東大院農生科、[5]日ハム中研、[6]九大院農院)
○ Gakuro HARADA[1], Tatsuhiro HISATSUNE[2], Hiroshi MATSUDA[3], Mamoru TOTSUKA[4], Takashi MATSUMOTO[5], Yoshinori KATAKURA[6] ([1]Grad. Sch. Sys. Life Sci., Kyushu Univ,, [2]Grad. Sch. Fro. Sci., Tokyo Univ,, [3]NCNP, [4]Grad. Sch. Agr&Life Sci., Tokyo Univ,, [5]R&D Center, Nippon Meat Pakers Inc, [6]Fac. Agric., Kyushu Univ)

目的

本研究では、高機能食品成分としてのイミダゾールジペプチドに着目し、その新たな機能性をヒト試験で明らかにすることを目的として研究を行った。これまでの 60 名の被験者を用いたヒト試験の結果から、イミダゾールジペプチドには脳萎縮改善効果や心理機能改善効果が認められている。そこで本研究においては、イミダゾールジペプチドを摂取した被験者の末梢血リンパ球を用い、その遺伝子発現を解析することで、イミダゾールジペプチドの機能性とその分子基盤を推測することを目的とした。

方法

二重盲検試験によりランダムに割り付けられた被験者 60 名（試験食群 30 名、プラセボ群 30 名）のイミダゾールジペプチド摂取前後に採取した末梢血リンパ球を用いた。それぞれから全 RNA を調製後、アジレント社の Human Whole Genome アレイを用いて DNA マイクロアレイ解析を行った。摂取前後で有意に変動した遺伝子を抽出するために、2 群の検定（t-test）を行い、$P < 0.05$ 及び遺伝子発現変動値（Δ値）を指標に有意性を評価した。抽出された遺伝子について、機能クラスター解析はオンラインソフトウェア DAVID を用い、またパスウェイ解析は KEGG パスウェイ情報をもとにバイオインフォマティクス解析を行った。

結果

イミダゾールジペプチド食あるいはプラセボ食を摂取した被験者の末梢血リンパ球を用いて DNA マイクロアレイ解析を行った結果、イミダゾールジペプチド摂取群特異的に発現変動する 2,650 個の遺伝子群を得た。さらに、Go term を付した機能クラスター解析を行った結果、各種のトランスポーター・レセプター分子群（272 遺伝子）、転写因子群（545 遺伝子）、分泌因子群（151 遺伝子）、炎症・老化関連分子群（151 遺伝子）が変動していることが明らかとなった。特に、ケモカイン系、炎症性サイトカイン系、カルシウム/CREB 系、DNA 修復系、ヒストン修飾系、長寿遺伝子系の遺伝子に有意な発現変動が認められた。今後は、イミダゾールジペプチドの機能性を規定する分子基盤について、定量 RT-PCR 解析等を併用しその遺伝子の同定を進める予定である。

DNA microaray, imidazole dipeptide

講演番号：2F26a02
講演日時、会場：3 月 27 日 09:11～ F 校舎 26 会場

粒子径制御技術を用いた抗酸化製剤の高反応性化

Activation of the Antioxidant Formulation using Particle Size Control Technique

○門脇 章夫、檜山 真一郎、大久保 泰宏（太陽化学株式会社）
○Akio KADOWAKI, Shinichiro HIYAMA, Yasuhiro OKUBO (Taiyo Kagaku Co.,Ltd.)

【目的】飲食品の製造および販売の場面において、熱や光が食品にダメージを与え、食品の嗜好的品質や栄養価値の低下を引き起こすことが知られている。特にレトルト殺菌などの製造時における高温処理においては、機能性成分の減衰や、異臭の発生などの風味劣化が問題となる場合がある。このような食品の変化は、食品中に含まれる脂質やタンパク質の酸化劣化が大きな原因となっている。我々はこれまでに、独自の乳化技術で脂溶性抗酸化素材と水溶性抗酸化素材を一剤化した抗酸化製剤を開発するとともに、抗酸化製剤の乳化粒子径制御による効率的な抗酸化効果の発現を確認した。本研究では抗酸化製剤の乳化粒子径制御による反応性コントロール手法を確立し、レトルト殺菌時の劣化抑制効果について検証を行った。

【方法】抗酸化素材および乳化粒子径の異なる種々の抗酸化製剤を調製し、ＡＢＴＳおよびＤＰＰＨラジカルに対する捕捉反応の速度論的解析から、各抗酸化製剤の反応性・持続性を評価した。また調製した抗酸化製剤はリノール酸メチルを乳化したモデル系に添加し、レトルト殺菌処理およびホモジナイズ処理を行った。レトルト殺菌により生じたリノール酸メチル酸化物はＨＰＬＣおよびＧＣ／ＭＳにより測定した。また、モデル系中の抗酸化製剤の乳化粒子径はレーザ回析・散乱法により測定し、レトルト殺菌およびホモジナイズ処理に対する製剤の安定性を評価した。

【結果】調製した各抗酸化製剤は、抗酸化素材の種類および乳化粒子径により反応性・持続性が大きく異なることを確認した。乳化粒子径については、平均粒子径が小さいほど反応性に富み、持続性が低下する傾向が認められた。以上の結果から、より反応性に優れた抗酸化製剤を新たに設計し、レトルト殺菌処理時の劣化抑制効果を検討したところ、抗酸化製剤の反応性に依存して劣化臭となるヘキサナールやデカジエナールの発生が抑制されることを確認した。一方で、リノール酸メチルに直接抗酸化素材を混合した系では十分な劣化臭の抑制効果が認められなかった。
本研究により、レトルト殺菌やＵＨＴ殺菌など製造時における高温短期的な酸化劣化による劣化臭発生に対しては、反応性に富む抗酸化剤が安定的にＯ／Ｗエマルションの水系に存在することが必要である可能性が示唆された。更に抗酸化素材の組合せから、現在より効果的な新規抗酸化製剤の開発を進めている。

antioxidant, particle size, appertization

講演番号：2F26a03
講演日時、会場：3 月 27 日 09:22～ F 校舎 26 会場

脂肪酸が苦味を抑制する機序の解明－脂肪酸と苦味物質の複合体が凝集することにより苦味が抑制される－

Aggregation of a bitter substance-fatty acid complex resulting in suppression of bitterness

○大木 伽耶子、山下 治之、寺田 透、石丸 喜朗、阿部 啓子、朝倉 富子（東大農）
○Kayako OGI, Haruyuki YAMASHITA, Tohru TERADA, Yoshiro ISHIMARU, Keiko ABE, Tomiko ASAKURA (Tokyo Univ.)

（背景及び目的） 苦味はコーヒーなどの一部の嗜好品を除いて本能的に忌避される味である。食材の持つ苦味や、加工中に生じる苦味を抑制することは食品加工において大きな課題の一つである。我々はチーズに含まれる脂肪酸に苦味抑制活性があることを見出し、脂肪酸は苦味物質とイオン相互作用・疎水相互作用の二つを介して結合することにより苦味を抑制していると推察している。しかしその詳細については不明な点が多い。昨年度の本大会で、苦味物質の N 原子と脂肪酸のカルボキシル基がイオン相互作用することで苦味物質の化学的環境が変化していることを、^{1}H NMR の解析から明らかにした。今回、さらに詳細な NMR 測定と分子モデリングにより、脂肪酸の苦味抑制機構について検討を行った。

（方法） 苦味物質は塩酸キニーネ(QHCl)、塩酸プロメタジン、塩酸プロプラノロール、脂肪酸はラウリン酸(C 12:0)、デカン酸(C 10:0)、オクタン酸(C 8:0)、ヘキサン酸(C 6:0)、酢酸(C 2:0)、ラウリン酸モノグリセリドを用いた。空間的な情報を得るために、上記三種の苦味物質及び苦味物質とラウリン酸の等モル混合物の noesy 測定を行い、分子モデルを構築した。また、どのような脂肪酸が QHCl と相互作用するのかを明らかにするため、QHCl 単独および QHCl と脂肪酸の等モル混合液について ^{1}H NMR の測定(溶媒:DMSO-d_6)を行った。

（結果及び考察） ラウリン酸添加時の三種の苦味物質の構造モデルから、大きな構造変化は起こらないことが示された。また、ラウリン酸モノグリセリド以外の全ての脂肪酸について、その添加によりキニーネの N 原子周辺の化学シフトが変化することが示された。すでに我々は、官能試験による苦味抑制活性と等温滴定カロリメトリー(ITC)で検出される熱量変化に相関があり、脂肪酸と苦味物質が熱量変化を伴う相互作用を示すには脂肪酸の 12 以上の鎖長が必要であることを報告している。今回、熱量変化が観測されず、苦味抑制活性がないと推測される鎖長 10 以下の脂肪酸と苦味物質の間にもイオン相互作用が存在していることが示された。この結果から、脂肪酸の苦味抑制活性には疎水相互作用の寄与が大きいことが推察された。脂肪酸の鎖長および二重結合の数が結合定数に影響することが ITC の測定結果から確認されており、疎水相互作用の寄与を支持していると考えられる。以上より、脂肪酸は苦味物質とイオン相互作用し、次に脂肪酸のアルキル基間の疎水相互作用により凝集することで苦味を抑制しているという機構を提示した。本研究の一部は、総合科学技術・イノベーション会議の SIP(戦略的イノベーション創造プログラム)「次世代農林水産業創造技術」によって実施された。

bitterness masking, fatty acids

講演番号：2F26a04
講演日時、会場：3 月 27 日 09:33～ F 校舎 26 会場

米の食味と糖含有量の関係について

Relationship to Eating Quality and Suger Contents of Rice

○横野 一歩[1]、高津 地志[2]、藤田 明子[2]、岡田 芳治[1]、野村 正人[1] ([1]近畿大・工、[2](株)サタケ)
○ Kazuho YOKONO[1], Kunimoto TAKATU[2], Akiko FUJITA[2], Yoshiharu OKADA[1], Masato NOMURA[1] ([1]Kinki Univ., [2]Taste Research Lab. Engi. Div. Satake Co.)

【目的】

米中の約 70%は炭水化物(糖と食物繊維)であり，糖は食味に影響を及ぼしている．その中でもおねばは炊飯米の表面の粘性物であり，一般的に溶出量が多いと食味に良い影響を与えるといわれているが，その裏付けはされていない．したがって，おねばの基礎的な知見を得ることは米のおいしさ解明につながると考えられる．そこで本研究では，報告例が少なく糖と食味の関係が明らかにされていないおねばに着目し，単糖，二糖および三糖の糖含有量を分析した．また，おねばと官能試験および食味鑑定団の結果との間に相関性がみられるか食味への影響についても検討した．

【方法】

試料として，平成 25 年度収穫米であるコシヒカリ（魚沼産），きらら 397（北海道産），ゆめぴりか（北海道産），ヒノヒカリ（広島産），つや姫（山形産），あきたこまち（秋田産），ひとめぼれ（宮城産）およびにこまる（長崎産）の 8 種類を用いた．精白米（歩留 90.5%）150 g を 20 秒間洗米し，炊飯（加水率:1.40 倍，浸漬時間:30 分，蒸らし:10 分）を行ない炊飯器内で 2 時間保温した．その後，飯粒 50 g を測り超純水 100 g を加え 2 分間撹拌し，茶こしで溶出液のみ採取した．この溶出液を濃縮乾固したものをおねばとした. 得られたおねば 10 g を精秤し, 50%EtOH を加え加熱還流抽出を行なった．その後，濃縮乾固したものに超純水 5 g 加えたものを試料とし，高速液体クロマトグラフィー（移動相：60mM NaOH，カラム：HAMILTON RCX-10）を用いて糖含有量を分析した．官能試験は評価項目を香り，外観，味，硬さ，粘りおよび総合評価の 6 項目とし，評価した．また，炊飯食味計，硬さ・粘り計，シンセンサの 3 機種（食味鑑定団）を用いて食味評価を行なった．

【結果・考察】

おねばから抽出した単糖，二糖および三糖の定量結果から高い糖含有量を有する米としてヒノヒカリ, にこまるであることがわかった. また, 低い糖含有量を有する米としてつや姫であることがわかった．一方で，おねばの糖含有量と食味鑑定団との間に相関性がみられるか検討した結果，マルトトリオース含有量と硬さ評価との間で負の相関（R^2=0.49）を示した．また，スクロース含有量と粘り評価との間で正の相関（R^2=0.51）を示した．このことから，硬さ・粘りにおいて，マルトトリオース，スクロースが食味に影響しているものと考える．

Rice, Eating quality, Suger contents

講演番号：2F26a05
講演日時、会場：3 月 27 日 09:44～ F 校舎 26 会場

マウスリック試験を用いた甘味錯覚効果の客観的評価

The objective estimation of taste illusion among sweeteners by mice brief-access tests.

○河合 崇行、日下部 裕子（農研機構・食品総合研究所）
○Takayuki KAWAI, YUKO KUSAKABE (NARO National Food Research Institute)

サッカリンナトリウム、アセスルファムカリウム、スクラロース、スクロースをブレンドした際に表れる甘味相乗効果の大きさを、マウスリック試験を用いて客観的に数値化した。前述甘味料の単独溶液に対するリック試験を行い、同程度の甘味を示す濃度を算出したところ、サッカリンナトリウム、アセスルファムカリウムはスクロースの約 20 分の 1、スクラロースは約 70 分の 1 であった。甘味の認知閾値で調べた既知甘味度の数値とは一致しないが、ヒトと同じ順序であった。次に、2 甘味料を選び、同程度の甘味強度となるように調整し、それらを混和したブレンド溶液についてリック試験を行った。その結果、サッカリンナトリウム＋アセスルファムカリウム、スクラロース＋スクロースの組み合わせでは相加効果しか見られなかったが、サッカリンナトリウム＋スクラロース、アセスルファムカリウム＋スクラロースでは、強い相乗効果が認められた。また、サッカリンナトリウム＋スクロース、アセスルファムカリウム＋スクロースでも相乗効果が認められた。この現象は培養細胞の実験系では見られないことから、脳内で起こる一種の錯覚に起因するものではないかと考えられる。甘味ピーク時間差のある甘味料をブレンドすると、そのピーク間を補完するように甘味を感じる可能性がある。スクロースより甘味ピークがやや遅く表れるスクラロースとブレンドした方が大きい甘味相乗効果が表れたのは、ピーク間補完量が大きくなったからであろうと推察している。

sweet, taste, lick

講演番号：2F26a06
講演日時、会場：3 月 27 日 10:05～ F 校舎 26 会場

モデルメラノイジン分解微生物の探索と分解生成物の性質

Screening of microbes to degrade model melanoidin

松井 芳光[1]、中西 康博[1]、山本 祐司[1]、保坂 好江[2]、猪子 諒[1]、能見 祐理[2]、大塚 譲[2]、○本間 清一[2] ([1]東京農業大学応用生物学科、[2]お茶の水女子大学生活環境教育研究センター)
Yoshimitsu MATSUI[1], Yasuhiro NAKANISHI[1], Yuji YAMAMOTO[1], Yoshie HOSAKA[2], Ryo INOKO[1], Yuri NOMI[2], Yuzuru OTSUKA[2], ○Seiichi HOMMA[2] ([1]Department of Applied Biology and Chemistry, Tokyo University of Agriculture, [2]Institute of Environmental Science for Human Life, Ochanomizu University)

目的

還元糖とアミノ酸とのメイラード反応で生成するメラノイジンは両性の重合高分の性質がある。しかし、この高分子の化学構造は未祥である。この分野は低分子物質の解明から高分子像に着実に迫る低分子から高分子への研究方向が主流である。本研究は、メラノイジンが重合高分子であることに着目し、メラノイジンの構造に化学的繰り返し単位構造が存在していると想定し、温和条件下で、微生物により高分子メラノイジンンの低分子化を図るものである。

方法及び結果

メラノイジンの調製　モデル系のメラノイジンは、グルコースとグリシン（各 0.1M)、ジャーファーメンターで 60℃に保ち、反応時間中に NaOH で pH7±0.05 に調整しつづけた。反応終了後、透析膜で透析し、内液を濃縮し冷凍保存した。

微生物の探索と単離　沖縄諸島のサトウキビ畑、長年にわたりモラセスが廃棄されていた土地の土壌や近辺の河川の汚泥、さらにマングローブ林の周辺から土壌・植物検体を採取した（平成 24､25 年)。微生物の培養は、GYP 培地にメラノイジンを溶かし、収集した土壌等を加え、30℃に静置した。培養液は肉眼で脱色や変色が起こっていると観察できるものを選抜し、二次培養に供した。培養液を濾過除菌後、３D-HPLC（200~500nm 検出）にかけて選抜した。HPLC は TSKG3000、6000PWH カラムを用い、水(95%)―アセトニトリル(5%)の溶出液を用いた。

微生物分解物の性質　クロマトグラフ全体のパターンを微生物を接種していないコントロールと比較した。コントロールのクロマトグラフィーでは認められなかった保持時間 5～15 分のボイドボリュウムに近い成分が減少・変化させる菌 10 株が最後の選抜に残り、単離した。16 r RNA 塩基配列の解析結果から活性の強い菌株の内、３株は乳酸菌（*Lactobacillus plantarum*）であった。

Cell free 系での検討　菌体を集め、超音波破砕機にて pH7 リン酸緩衝液とホモジネートにし、モデルメラノイジンを添加し。30℃に静置した。反応液の３D-HPLC は、ボイドボリュウムに近いメラノイジン主成分を減少させるものと、濃度は低いがテイリングの部分に相当する生成物をだすものとがあった。

以上の結果は、メラノイジン分解菌は高分子の主鎖と低分子の側鎖を作り出す酵素系の存在を想起させる。

Maillard reaction, melanoidin, microbiological degradation

講演番号：2F26a07
講演日時、会場：3 月 27 日 10:16～ F 校舎 26 会場

耐熱性 *Geobacillus* sp.のプルラナーゼ遺伝子の取得と大腸菌での発現について
Expression of Pullulanase of Thermotrelant *Geobacullus* by *E. coli*
○内野 昌孝[1]、入澤 友啓[2]、高野 克己[1] ([1]東京農大、[2]理研)
○Masataka Uchino[1], Tomohiro Irisawa[2], Katsumi Takano[1] ([1]Tokyo Univ. Agric., [2]RIKEN)

【目的】
食品加工において、微生物由来の酵素が広く利用されており、耐熱性酵素を利用することで、酵素反応と殺菌を同時に行うことが可能である。また、1 種類の微生物から製造で用いられる酵素を取得することで、反応の温度、pH の調整をせずに複数の工程を一度に行うことができる。
甘味料として使われる異性化糖も微生物由来の酵素を利用して製造されているが、その供試菌株が異なるため、工程ごとに温度、pH を変更しなければならない。そこで、今回異性化糖製造に利用する酵素の供試菌株として、当研究室で長時間保温により異臭の発生した米飯から分離、保存した耐熱性微生物 *Geobacillus* sp. ZO-10 株を得た。この耐熱性微生物から異性化糖製造工程、液化、糖化、異性化で用いられるα-アミラーゼ、プルラナーゼ、グルコースイソメラーゼの大量発現系の構築を目指し、本研究ではプルラナーゼに着目し、大腸菌による発現を試みたので報告する。
【方法】
ZO-10 プルラナーゼ遺伝子の前後に 50bp ずつ延長したプライマーを用い、ZO-10 株から抽出した DNA を鋳型とし PCR にて増幅した。次にこの増幅産物を鋳型とし Forward 側に *Nde* I 配列(CATATG)、Reverse 側に *Not* I 配列(CGCCGGCG)または *Xho* I (GAGCTC)を付加した ZO-10 プルラナーゼ遺伝子増幅用プライマーを用い、PCR にて増幅を行った。PCR 増幅後の遺伝子産物を Ligation-Convenience Kit を用いてプラスミド pET21αにライゲーションし、*E. coli* BL21(DE3)に形質転換を行った。形質転換後、菌体をアンピシリン入りの LB 寒天培地に塗沫し、培養後に生育したコロニーをより目的株の選抜を行った選抜にはコロニーPCR および電気泳動での確認により進めた。
次に、選抜された形質転換株の酵素活性を確認するため、培養した菌体を超音波破砕し、得られた粗酵素の酵素活性をプルランを基質とし、反応産物である還元糖量をソモギーネルソン法で測定した。なお､酵素単位は 1 分間にマルトースとして 1 μg/ml の還元糖を遊離する力価を 1 単位とした｡また、この時のタンパク質量をブラッドフォード法で測定した。
【結果および考察】
上述の流れで試験を進めた結果、プルラナーゼ活性を示す形質転換体を得た。本菌体の該当活性は確認されたものの、最適温度は 60℃と耐熱性は確認されなかった。

Thermotorelant bacteria, Geobacillus, Pullulanase

講演番号：2F26a08
講演日時、会場：3 月 27 日 10:27～ F 校舎 26 会場

アミロース含量の異なるいくつかの大麦澱粉の構造と性質

Structure and physical properties of some barley starches with different amylose contents

○井ノ内 直良[1]、高橋 飛鳥[2]、増原 大成[1]、中浦 嘉子[1]、吉岡 藤治[2]([1]福山大生命工、[2]近中四農研セ)
○Naoyoshi Inouchi[1], Asuka Takahashi[2], Taisei Masuhara[1], Yoshiko Nakaura[1], Touji Yoshioka[2] ([1]Fukuyama Univ., [2]WeNARC)

【目的】大麦は、細胞壁多糖の一種である(1,3;1,4)-β-グルカン(以下、βグルカンと省略)を多く含む。大麦のβグルカンは、様々な健康維持機能が認められており、近年研究が盛んに行われている。また、モチ性(*wax*)や高アミロース遺伝子(*amo1*)など、澱粉合成に関わりβグルカン含量を高める遺伝子を持つ系統が育成されてきているが、澱粉本体の性質についてはあまり研究がなされていない。そこで本研究では、アミロース含量の異なる澱粉を持つ大麦試料を用いて、その澱粉の構造と物性を明らかにすることを目的とした。【方法】アミロース含量が異なる裸性大麦試料［四国裸糯 127 号(*wax*, *amo1*)、四 R 系 1870(やや低アミロースのモチ性)、四 R 系 3102(*amo1*)、およびイチバンボシ(標準品種)］を実験試料として用いた。大麦穀粒を精白し、除タンパク、脱脂処理を行うことにより澱粉を精製した。精製した大麦澱粉のヨウ素・澱粉複合体吸収曲線の 680nm における吸光度(青価)と最大吸収波長(λmax)、イソアミラーゼで枝切りした生成物の中圧ゲル濾過(GPC)によるアミロース含量とアミロペクチンの側鎖長分布、示差走査熱量計(DSC)による糊化温度と糊化熱量、Rapid visco analyzer(RVA)による粘度曲線、生澱粉分解酵素ダビアーゼ K-27 による酵素消化性について測定を行った。また澱粉粒の顕微鏡観察を行った。【結果】ヨウ素吸収曲線より測定した青価、λmax ともに、四 R 系 3102＞イチバンボシ＞四 R 系 1870＞四国裸糯 127 号の順に高かった。GPC により測定したアミロース含量は四 R 系 3102 が 48.1%、イチバンボシが 31.1%、四 R 系 1870 で 11.7%、四国裸糯 127 号で 8.0%であり、イチバンボシと比較して、*amo1* を持つ四 R 系 3102 は高アミロースタイプ、モチ性の四 R 系 1870、および *wax* と *amo1* の遺伝子を合わせ持つ四国裸糯 127 号は低アミロースタイプであった。DSC による糊化温度はイチバンボシが最も低く、四国裸糯 127 号が最も高かった。糊化熱量は四国裸糯 127 号が最も高かった。RVA により得られたピーク粘度はイチバンボシが最も高く、高アミロースタイプの四 R 系 3102 が最も低かった。一方、RVA のセットバックは澱粉の老化のしやすさとの相関関係があることが知られているが、アミロース含量の低い四 R 系 1870 と四国裸糯 127 号で低く、アミロース含量の高いイチバンボシと四 R 系 3102 で高かった。ダビアーゼ K-27 を用いた酵素消化性は、アミロース含量の低い四国裸糯 127 号と四 R 系 1870 で高く、アミロース含量の高い四 R 系 3102 とイチバンボシで低い傾向が観察された。澱粉のアミロース含量と生澱粉分解酵素に対する消化性との間の関係は他の植物澱粉で観察される傾向と同様であったが、生澱粉分解酵素に対する消化性は澱粉粒の大きさの影響も考えられた。

barley, starch, amylose

講演番号：2F26a09
講演日時、会場：3 月 27 日 10:38～ F 校舎 26 会場

エリスリトールは *Porphyromonas gingivalis* 分岐鎖アミノ酸代謝経路に作用する

Erythritol alters branched-chain amino acids metabolic pathways of *Porphyromonas gingivalis*.

○橋野 恵衣[1]、久保庭 雅恵[1]、坂中 哲人[1]、長 洋[2]、天野 敦雄[1] ([1]阪大歯、[2]三菱化学フーズ)
○Ei HASHINO[1], Masae KUBONIWA[1], Akito SAKANAKA[1], Hiroshi CHO[2], Atsuo AMANO[1] ([1]Osaka Univ., [2]Mitsubishi-Kagaku Foods Co.)

【目的】糖アルコールのひとつであるエリスリトールは、口腔内初期付着菌 *Streptococcus gordonii* および歯周病菌 *Porphyromonas gingivalis* により構成される歯周病原性バイオフィルムモデルの微細構造を変化させ、またその形成に抑制的な影響を及ぼすことが我々の一連の研究によって明らかになっている。また，その抑制機序には、核酸合成阻害による増殖抑制や特異的タンパク質分解酵素の活性阻害による栄養獲得阻害などが関与することを報告している。本研究では、エリスリトールが *P. gingivalis* の代謝に及ぼす影響を、同じく糖アルコールであるソルビトール存在下での変化と比較検討することにより、同物質が作用するより特異的な代謝経路を探索・同定することを目的とした。
【材料および方法】トランスウェルを用いて、*S. gordonii* DL1 培養上清中にて *P. gingivalis* ATCC33277 を培養した。培地には、10% meso-エリスリトールまたは D-ソルビトール添加 PBS、あるいは糖質非添加 PBS 用いた。回収した *P. gingivalis* 菌体より抽出した菌体内イオン性代謝物質をキャピラリー電気泳動 - 飛行時間型質量分析計によるメタボローム解析に供し、代謝産物の同定および相対的比較定量解析を実施した。さらに、取得したメタボロームデータを多変量解析に供した。
【結果】メタボローム解析の結果、*P. gingivalis* の菌体内より 176 の代謝物質が同定された。主成分分析(PCA)および直交部分最小二乗法判別分析(OPLS-DA)の結果、ソルビトール添加群および糖質非添加群と比較して、エリスリトール添加群のメタボロームプロファイルに分岐鎖アミノ酸代謝物（2-オキソイソ吉草酸、4-メチル-2-オキソ吉草酸、2-オキソ酪酸）が強く関連づけられた。メタボローム解析による定量結果より、これらの代謝物の基質である分岐鎖アミノ酸（バリン、ロイシン、イソロイシン）は糖アルコール添加した二群ともに糖質非添加群に対し各々0.3-0.5 倍に有意に減少した。一方で、前述の分岐鎖アミノ酸代謝物は糖質非添加群に対し、エリスリトール群では 3.6-4.0 倍に著しく増加したが、ソルビトール群では同様の現象は見られなかった。これらの結果より、エリスリトールストレスにより分岐鎖アミノ酸代謝経路に特異的な変化が生じ、糖アルコール存在下における *P. gingivalis* の表現型発現の差異に寄与する可能性が示唆された。

erythritol, *Porphyromonas gingivalis*, metabolome

講演番号：2F26a10
講演日時、会場：3 月 27 日 10:49～ F 校舎 26 会場

食用海藻に含まれる単糖及び二糖の HPLC による分析

Seaweed saccharide analysis by HPLC

○垣田 浩孝、小比賀 秀樹（産総研健康工学）
○Hirotaka Kakita, Hideki Obika (AIST)

【緒言】糖質は最も多量に存在する有機化合物の一群として知られている。糖質は動物、植物、微生物に広く分布しており、高等植物や海藻の中には乾燥重量の約 40%も糖質を含んでいる種も存在する。食用海藻あるいは海藻由来食品の開発においても海藻中の糖質分析方法の確立が重要である。糖質分析方法として最も知られている分析方法の一つは高速液体クロマトグラフィー（HPLC）である。HPLC が実用化された 1975 年以来、単糖及び二糖の HPLC として順相分配（HILIC)、配位子交換、イオン交換 HPLC が広く用いられている。順相分配（HILIC）HPLC は比較的短時間で糖質溶離ができ、かつ単糖間の分離が高い点で他の HPLC モードより優れている。本研究では順相分配 HPLC における単糖及び二糖の溶出挙動を調べると共に、食用海藻中の糖質分析に HPLC を応用することを目的とした。
【方法】順相分配 HPLC カラムとして TSKgel NH2-100 及び TSKgel Amide-80 を用いた。カラムサイズは 4.6 mm I.D. × 15 cm 及び 4.6 mm I.D. × 25 cm を使用した。粒径は 3 μm 及び 5 μm を用いた。送液ポンプ 2 台、示差屈折計、オートサンプラー、カラムオーブンを組み合わせた HPLC 装置で分析を行った。アセトニトリルと水の混合液を移動相として用い、流速 1 ml/min、試料注入量 10 μl 及び 20 μl で行った。カラム温度は TSKgel NH2-100 については 25°C、TSKgel Amide-80 については 80°C に設定した。各種糖質の保持時間、検量線のダイナミックレンジ、保持時間の安定性、単糖間の分離能、分析時間について評価した。食用海藻の乾燥粉末に関しては水抽出した抽出液を分析試料とした。天然海域で採取した食用海藻については蒸留水で洗浄後、乾燥した藻体を海藻試料とした。
【結果】保持時間の安定性は TSKgel NH2-100 よりも Amide-80 の方が優れていた。類似の食品として販売されている海藻粉末３種類に関して、単糖及び二糖の含有量に違いが見られた。
【考察】一部の単糖間については分離の悪い結果が得られたものの、検討した単糖及び二糖について糖質間の分離は２つのカラムとも良好であり、食品中の単糖及び二糖の分析に適用可能であった。順相分配ＨＰＬＣは食用海藻中の単糖及び二糖の分析に有用であった。

seaweed, saccharide, macroalga

講演番号：2F26a11
講演日時、会場：3 月 27 日 11:10～ F 校舎 26 会場

日本食の脂肪酸組成が内臓脂肪蓄積に及ぼす影響

Effects of fatty acid composition of the Japanese food on the visceral fat accumulation

○坂本 有宇、都築 毅（東北大院農）
○Yu Sakamoto, Tsuyoshi Tsuduki (Tohoku Univ.)

【目的】日本は 1980 年代に平均寿命が世界第 1 位となり、健康長寿国として知られている。健康長寿の要因として日本食の影響が考えられている。日本食に含まれる特徴的な成分については数多く研究されているが、日本食そのものが健康状態に及ぼす影響についてはほとんど研究されていなかった。我々は先の研究で、日本食は米国食に比べてストレス性が低く、旺盛な代謝が繰り返され、肥満になりにくいことを明らかとした。さらに、食の欧米化などの食生活の変化が健康へ与える影響を検討するため、現代の食事と過去の食事を比較した。1960 年、1975 年、1990 年、2005 年の日本食（国民健康・栄養調査に基づいて作製し、凍結乾燥、粉末化したもの）をマウスに与えたところ、1975 年の日本食が最も健康維持に有益であり、その効果はタンパク質・脂質・炭水化物のエネルギーバランスに依存しないことを明らかとした [1]。そこで本研究では、日本食の有益性を解明するために脂質成分に注目し、様々な年代の日本食の脂肪酸組成の違いが、内臓脂肪蓄積に与える影響を検討した。
【方法・結果】様々な年代の日本食を調理再現し、凍結乾燥粉末化したものから脂質を抽出し、ガスクロマトグラフィー分析に供したところ、n-6 / n-3、飽和脂肪酸 / 一価不飽和脂肪酸 / 多価不飽和脂肪酸 の値はそれぞれ 1960 年で 5.0、1.0 / 1.3 / 1.1、1975 年で 4.4、1.0 / 1.3 / 0.9、1990 年で 5.0、1.0 / 1.2 / 0.7、2005 年で 4.0、1.0 / 1.2 / 0.7 であった。これらの割合通りに様々な油脂を混ぜて、試験油脂を調製した。AIN-93G 組成の油脂をそれぞれの試験油脂に置換し、ICR mice (5wk、♂) に 4 週間与えたところ、内臓脂肪量に大きな影響は見られなかった。そのため、脂肪酸組成に加えてタンパク質・脂質・炭水化物の割合も考慮した試験食を与えて検討を行った。AIN-93G 組成を改変し、各年代のタンパク質・脂質・炭水化物の割合と脂肪酸組成を再現した試験食を ICR mice (5wk、♂) に 4 週間与えた。その結果、1975 年型試験食を摂取したマウスにおいて、内臓脂肪蓄積が有意に抑制され、脂肪細胞サイズも小さかった。以上により、日本食の内臓脂肪蓄積抑制効果は、脂質の量と脂肪酸組成が大きく影響することが示唆された。

【参考文献】
[1] Y. Kitano, T. Honma, Y. Hatakeyama, Y. Jibu, Y. Kawakami, T. Tsuduki, K. Nakagawa, T. Miyazawa. Effects of Historical Differences in Components of the Japanese Diet on the Risk of Obesity in Mice. J. Jpn. Soc. Nutr. Sci., 2014; 2: 73-85.

Japanese food, fatty acid composition, PFC ratio

講演番号：2F26a12
講演日時、会場：3 月 27 日 11:21～ F 校舎 26 会場

琉球在来豚（アグー）の脂肪分析：脂肪酸組成の特長
Fatty acid composition of Ryukyu pig "Agu" fat
○伊良部 寛規[1]、藏屋 英介[2]、田中 博[3]([1]沖縄高専専攻科、[2]沖縄高専技術室、[3]沖縄高専生物資源)
○Hiroki Irabu[1], Eisuke Kuraya[2], Hiroshi Tanaka[3] ([1]National Institute of Technology, Okinawa College, Advanced Course, [2]National Institute of Technology, Okinawa College, Science and Technology Division, [3]National Institute of Technology, Okinawa College, Bioresources Engineering)

【背景・目的】
琉球在来豚の「アグー」は沖縄で古くから飼育され、食されてきた。沖縄県アグー豚ブランド推進協議会（沖縄県庁畜産課内）は、「琉球在来豚の脂は一般肉豚（LWD）の脂に比べて融点が低く、口の中に入れると脂がとろける」と報告している。また、「アグー」には在来豚同士を掛け合わせた純系のアグーと、在来豚の雄と西洋種の雌を掛け合わせた交雑種アグーが知られている。そこで本研究では、純系アグーと交雑種アグーの脂肪酸組成を比較し、特に純系アグーの脂の特長を明らかにすること目的とした。
【実験方法】
１．脂試料
純系アグー脂は「金城アグー」から採取し、屠殺直後と屠殺後 1 週間氷温で保存した脂を試料とした。交雑種アグー脂には 2 種類の試料（交雑種 A、交雑種 B）を使用した。
２．脂肪酸分析
① 脂試料：それぞれの脂について 3 ヵ所から試料を採取し、それぞれの試料を 3 連で分析した。
② 脂質抽出：豚肩ロース脂を 100 mg 採取し、tert-ブチルメチルエーテル 1 ml に溶解した。
③ メチルエステル化：三フッ化ホウ素-メタノール法を用いた。
④ 脂肪酸分析：内部標準物質にはヘプタデカン酸を使用し、GC-MS により分析した。
⑤ 脂肪酸組成解析：純系と交雑種、および純系の氷温保存前後の脂肪酸組成を、分散分析と多重比較を用いて解析した。
【結果・考察】
すべての脂は、主要な脂肪酸として C14:0、C16:0、C16:1、C18:0、C18:1、C18:2 を含有した。
１．純系と交雑種の比較：純系アグーにおいて、リノール酸（C18:2）の組成比が 2 種類の交雑種の組成比よりも有意に高いことが示唆された。
２．純系アグー脂の氷温保存前後の比較：氷温保存後にパルミトレイン酸（C16:1）の組成比が有意に上昇し、また不飽和脂肪酸（C16:1、C18:1、C18:2）の組成比も上昇する傾向が確認された。
以上の結果から、純系アグーと交雑種の脂にはリノール酸の組成比に差異があることが示された。さらに、氷温保存により純系アグーの脂肪酸組成比が変化する可能性が示唆された。

Ryukyu, pig, fatty acid composition

講演番号：2F26a13
講演日時、会場：3 月 27 日 11:32～ F 校舎 26 会場

ヨメガカサガイの生殖腺から見いだされたΔ5,9 ジエン酸の構造と分布特性

Δ5,9 Fatty aids in gonads of an archaeogastropod limpet, *Cellana toreuma*

○川島 英城（岩手県立大学宮古短期大学部）
○Hideki Kawashima (Iwate Pref. Univ.)

【目的】演者は、原始腹足類のひとつである食用カサガイ類に存在するユニークな不飽和脂肪酸・コレステロール前駆体の構造や分布特性を明らかにしてきた。[1)]その中で、多様な位置異性体を占めるΔ5,9 不飽和脂肪酸グループの一部は、カイメン類に存在する不飽和脂肪酸の構造と酷似していた。また、これまでにカイメン類から見いだされた炭素数 23 及び 24 のΔ5,9 ジエン酸は、結核菌や大腸菌の脂肪酸合成酵素に対する阻害活性を示すことが報告されている。[2)]興味深いことに、これら活性を有する脂肪酸もカサガイ類には少量ながら認められた。[3)]そこで、演者は、新たなΔ5,9 ジエン酸の存在や分布特性を明らかにするため、ヨメガカサガイ（*Cellana toreuma*）の生殖腺から得られた脂質画分を用いて、GC-MS によるジエン酸の構造を解析した。
【方法】常法に従って、*Cellana toreuma* の生殖腺から全脂質を抽出後、分取用 TLC を用いて中性脂質・極性脂質にそれぞれ分画した。これらの画分を methyl ester 誘導体に調整後、硝酸銀 TLC で不飽和度に応じた脂肪酸の分取を行い、目的のジエン酸画分を得た。さらに、二重結合の位置を決定するために、得られた画分を 3-pyridylcarbinol ester 誘導体に調製し、EI-GC-MS によるジエン酸誘導体の構造解析を行った。
【結果】*Cellana toreuma* の生殖腺からは、合計 8 種類の Δ5,9 ジエン酸が検出され、偶鎖、奇数鎖及び分枝鎖を含む 7 種類（Δ5,9-18:2, Δ5,9-20:2, Δ5,9-21:2, Δ5,9-22:2, 21-methyl-Δ5,9-22:2, Δ5,9-23:2, Δ5,9-24:2）を同定した。これらは、極性脂質における主要なジエン酸グループを構成し、その中で最も豊富なジエン酸はΔ5,9-22:2 であった。また、腹足類から 21-methyl-Δ5,9-22:2 が今回初めて見いだされたが、上述のΔ5,9 ジエン酸は *Cellana grata* の生殖腺から報告されている 6 種類（Δ5,9-18:2, Δ5,9-20:2, Δ5,9-21:2, Δ5,9-22:2, Δ5,9-23:2, Δ5,9-24:2）[3)]と一致した。しかし、炭素数 20、21 及び 22 を有するジエン酸の位置異性体組成は両者で大きく異なっていた。すなわち、*Cellana toreuma* の生殖腺におけるΔ5,9 ジエン酸の占める割合は、極めて高かった。

[1] New Food Industry 56 (4), 1–8 (2014). [2] Bioorg. Med. Chem., 15 (21), 6834–6845 (2007). [3] Lipids 43, 559–567 (2008).

fatty acid, limpet, Cellana toreuma

講演番号：2F26a14
講演日時、会場：3 月 27 日 11:43～ F 校舎 26 会場

柑橘類の搾汁残渣に含まれるグルコシルセラミド分子種の LC-MS/MS による分析（温州ミカンと柚子について）

LC-MS/MS analysis of glucosylceramide molecular species from citrus (Citrus unshiu and Citrus junou) pomace

柳川 大樹[1]、木下 幹朗[2]、大西 正男[3]、○今井 博之[1] ([1]甲南大統合ニューロバイオ研、[2]帯広畜産大食品科学、[3]藤女子大人間生活)
Daiki Yanagawa[1], Mikio Kinoshita[2], Masao Ohnishi[3], ○Hiroyuki Imai[1] ([1]Inst. for Integrative Neurobiol., Konan Univ., [2]Dept. of Food Sci., Obihiro Univ. of Agric. and Veterinary Medicine, [3]Dept. of Food Sci. and Human Nutrition, Fuji Women's Univ.)

【目的】柑橘類の搾汁残渣の多くは廃棄物として処理されている現状において、この搾汁残渣を機能性素材として積極的に活用する技術の開発が望まれている。私たちは最近、植物に存在するグルコシルセラミド(GlcCer)の分子種組成の解析に関して、LC-MS/MS を使用することによって、精製せずに、より低コストで簡便に同定・定量する方法を開発・報告ている[1)]。本研究では、この分析方法を使用し、柑橘類の搾汁残渣の有効利用法を検討する一環として、温州ミカンおよびユズにおいて搾汁残渣となる果実部位（外果皮、内果皮、種子など）の GlcCer を解析した。

【方法】試料をクロロフォルム-メタノール溶液でホモジナイズし、全脂質を抽出した。全脂質を弱アルカリ処理し、生じた遊離脂肪酸を Sep-Pak Plus Silica Cartriges(Waters)で除いた後、GlcCer を含む脂質画分を LC-/MS/MS によって分析した。GlcCer 試料の分離には、SUPERIOREX ODS カラム(炭素含量 24%、粒子径 5 μm、2.0 mm I.D. x 250 mm、資生堂)を直列に 2 本つないだ条件で行った。また、溶離液として、A液：メタノール/ギ酸(1,000/1, v/v)、B液：水/ギ酸(1、000/1、 v/v)を使用し、0.2 ml/min の流速でグラジエント分析を行った。GlcCer 分子種の同定・定量は、タンデム四重極型質量分析計 ACQUITY® TQD (Waters)を使用した。また、GlcCer 分子種のプロダクトイオンの検出は長鎖塩基の部分で行った。

【結果】温州ミカンおよびユズの外果皮に存在する GlcCer 分子種は、2-ヒドロキシパルミチン酸(16h:0)と 4,8-スフィンガジエニン[d18:2(4,8)]からなる分子種が主成分であった。一方、ユズの内果皮（若干の砂じょうも含む）においては、上記の分子種の他に、2-ヒドロキシリグノセリン酸(24h:0)と 4-ヒドロキシ-8-シス-スフィンゲニン[t18:1(8c)]からなる分子種が 2 割程度含んでいることが分かった。

1) Imai, H., Hattori, H. and Watanabe, M. *Lipids* 47: 1221-1229 (2012).

glucosylceramide, Citrus, LC-MS/MS

講演番号：2F26a15
講演日時、会場：3 月 27 日　11:54～ F 校舎 26 会場

解析モデルの効率的運用による複合基質を用いた酵素的配糖化メカニズムの可視化

Visualization method of alpha-amylase-catalyzed transglycosylation reaction system containing amylose and glycolipid as substrate complexation: Effective utilization of some proposed models based on the subsite theory

○伊藤 博、小林 厚志、野口 真人、正田 晋一郎（東北大院工）
○Hiroshi ITO, Atsushi KOBAYASHI, Masato NOGUCHI, Shinichiro SHODA (Tohoku Univ.)

研究背景：多糖加水分解酵素であるα-アミラーゼは、水溶媒下では主に加水分解反応を触媒するが、同時に糖転移反応や縮合反応を触媒することも知られている。我々はこれまでにアミロースを糖供与体とする基質溶液に対し糖受容体として糖脂質（*n*-octyl β-D-glucopyranoside,C8G1）を添加することで、α-アミラーゼ酵素製剤(*Aspergillus oryzae*)による C8G1 に対する配糖化反応を確認した。この反応により得られた生成物は、種々の重合度を有する C8G1 への配糖体（アルキルポリグリコシド：APG）ならびに加水分解によるオリゴ糖群の混合物であった。また、反応初段階でのみ高重合度 APG を確認した実験的事実から、本酵素系は高重合度 APG 生成を起点とする反応機構（図 1）であると仮定した。

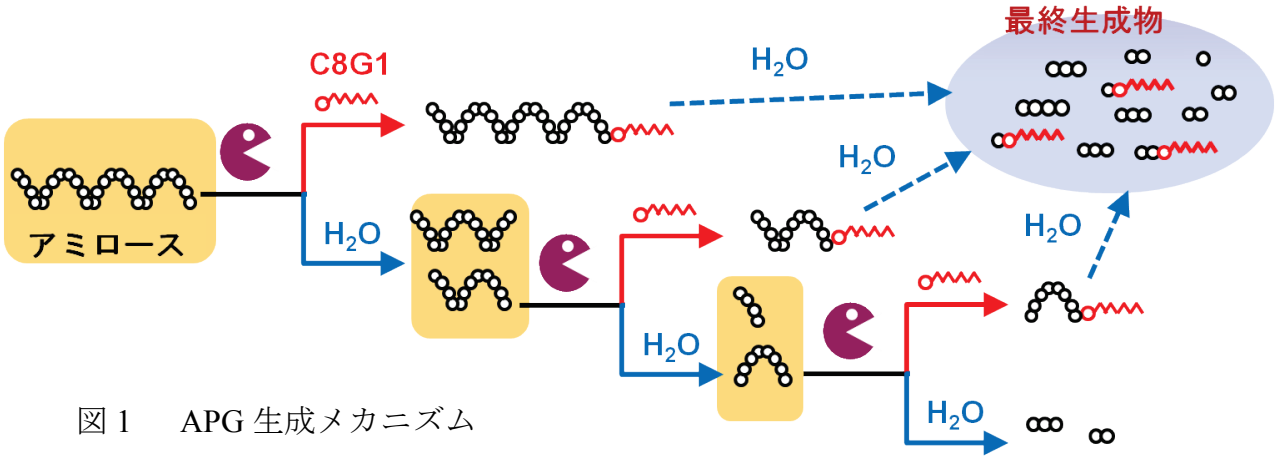


図 1　APG 生成メカニズム

解析モデルの活用による反応条件最適化：図 1 の反応機構に従うならば、APG の重合度はアミロースの分解挙動に大きく依存している可能性がある。そこで、我々は既存のアミラーゼによるアミロースの加水分解解析モデルを活用することで、本酵素反応系において重要な鍵となる高重合度 APG 生成の為に有利な反応条件について検討を行った。その結果、計算により得られた知見から、初期反応物濃度比率（アミロース：C8G1：酵素 ≈ 100,000 : 100,000 : 1）を設定した。この条件で実験検証を行ったところ、図 1 のような反応推移に対する APG の重合度依存性を質量分析により確認することに成功した。さらに我々は、より正確に反応系内を可視化する為に、加水分解反応のみならず、糖転移、縮合を考慮した既存の解析モデルの運用を検討した。今回、本実験系に対する既存の解析モデルの適合性について、APG の生成挙動の特性評価とともに議論する予定である。

enzyme mechanism of alpha-amylase, computer simulation, substrate complexation

講演番号：2F26p01
講演日時、会場：3 月 27 日 14:00～ F 校舎 26 会場

植物由来スフィンゴ脂質代謝物が腸管モデル細胞のアポトーシス関連因子に及ぼす影響
Effect of plant springolipid metabolite on apotosis-rrelated factor in Caco-2 cells
○木下 幹朗[1]、坪谷 朗行[1]、間 和彦[3]、山下 慎司[1]、大西 正男[2] ([1]帯広畜大・食品、[2]藤女子大、[3]日本製粉)
○Mikio KINOSHITA[1], AKIYUKI TSUBOYA[1], KAZUHIKO AIDA[3], SHINJI YAMASHITA[1], MASAO OHNISHI[2] ([1]Obihiro Univ., [2]Fuji Women's Univ., [3]Nippon Flour Mill)

【背景・目的】近年、経口摂取したスフィンゴ脂質によるヒトへの機能性についての知見が数多く集積され、これまでにスフィンゴ脂質の摂取による効果として大腸腺腫発症抑制効果、アレルギー性皮膚炎症状緩和作用、大腸ガン細胞に対するアポトーシス誘導作用などの報告がなされており、機能性食品素材としての注目も高まっている。また摂取されたスフィンゴ脂質は消化管内で加水分解され，セラミド少なくとも一部は基本構成成分であるスフィンゴイド塩基にまで分解されることが分かっている。しかしながら、それ以降の消化吸収率は極めて低く，上記の機能発現における詳細な作用機序についても不明な点が多くある。
本研究では、スフィンゴ脂質代謝物を用いてヒト消化管モデル細胞のアポトーシス誘導因子に与える影響について評価するとともに、スフィンゴ脂質の消化管への機能との連関について検討を行った。

【実験方法】動物由来のスフィンゴイド塩基(スフィンゴシン、フィトスフィンゴシン)は市販品を、植物由来のスフィンゴイド塩基については、トウモロコシ由来グルコシルセラミドからアルカリ分解、分取 TLC ならびに逆相 HPLC を用いて調整し、セラミド画分はスミス分解法に基づいて調整した。腸管モデル細胞にはヒト結腸ガン由来細胞株 Caco-2 細胞を 1 週間または分化誘導のため 3 週間 10%FBS 添加 DMEM で前培養した後使用した。その後無血清培地に調整した各種スフィンゴ脂質代謝物を加えた試験培地に切り替え培養した後各試験に用いた。細胞増殖測定は MTT 法に準拠した方法で行い、アポトーシス関連分子ならびにサイトカインの定量はヒトサイトカインおよびヒトアポトーシス抗体アレイキットを用いて行い、その後 ImageJ にて各サイトカイン等の発現について解析した。

【結果と考察】スフィンゴ脂質代謝物の添加により未分化型 Caco-2 細胞では細胞死が誘導された。一方、分化型 Caco-2 細胞においては未分化型 Caco-2 細胞と比較してスフィンゴ脂質代謝物により細胞死誘導は抑制されていることが確認された。またアポトーシス関連分子の誘導について解析したところ、正常状態の腸管細胞に近い分化型 Caco-2 細胞においては、動物由来スフィンゴイド塩基による発現の変動はコントロールと比較して確認されなかった。一方で植物由来スフィンゴイド塩基を添加した場合では抗アポトーシス因子である Bcl-x の発現亢進が確認され、アポトーシス促進因子である Cytochrome c や Pro-Caspase-3 において発現が抑制されている傾向がみられた。

sphingoid base, caspase, caco-2

講演番号：2F26p02
講演日時、会場：3 月 27 日 14:11～ F 校舎 26 会場

食物繊維摂取による小腸絨毛伸長作用の機構解明
A potential mechanism for the intestinal structural changes induced by dietary fiber
○伊藤 千弘[1]、西田 光貴[2]、北口 公司[3]、植木 章晴[3,4]、石田 秀治[3]、木曽 真[3,4]、東 恭平[5]、戸井田 敏彦[5]、五十嵐 一衛[5,6]、森 雄一郎[7]、山元 宏貴[7]、伊神 孝生[7]、矢部 富雄[3]（[1]岐阜大院・応生科・応用生命、[2]岐阜大院・連農・生物資源、[3]岐阜大・応生科・応用生命、[4]京都大・iCeMS、[5]千葉大学院・薬、[6]（株）アミンファーマ研、[7]三基商事（株））
○ ITO CHIHIRO[1], Mitsutaka NISHIDA[2], Koji KITAGUCHI[3], Akiharu UEKI[3,4], Hideharu ISHIDA[3], Makoto KISO[3,4], Kyohei HIGASHI[5], Toshihiko TOIDA[5], Kazuei IGARASHI[5,6], Yuichiro MORI[7], Hiroaka YAMAMOTO[7], Takao IKAMI[7], Tomio YABE[3] ([1]Grad. Sch. of Appl. Biol. Sci., Gifu Univ., [2]Unit. Grad. Sch. of Agric. Sci., Gifu Univ., [3]Fac. of Appl. Biol. Sci., Gifu Univ., [4]iCeMS, [5]Grad. Sch. of Pharm. Sci., Chiba Univ., [6]Amine Pharma Res. Inst., [7]MIKI Corp.)

【背景および目的】食物繊維は腸内細菌叢の維持や，有害物質を外に排出する優れた健康効果をもち，特に大腸での効果に注目した研究が進んでいる。一方で，食物繊維は小腸では効果を発揮しないと考えられていた。しかし，動物実験において食物繊維を与え続けると小腸絨毛が伸長することが多数報告されている。こうした報告は，食物繊維が小腸で効果を発揮する可能性を示唆するものと考えられるが，いまだ食物繊維が小腸絨毛の伸長させる仕組みは明らかにされていない。この仕組みを明らかとするために，私たちは水溶性食物繊維のペクチンを小腸上皮様細胞に与え，メタボローム解析によりその代謝産物の変化を調べた。そして，食物繊維によって細胞内のポリアミン量が変化することを見出した。小腸絨毛の伸長には小腸幹細胞の増殖が関与すると考えられるため，細胞増殖に関わるポリアミンの量が食物繊維によって変化することで，小腸絨毛の伸長を引き起こしている可能性が考えられた。そこで本研究では，食物繊維が小腸絨毛を伸長させる仕組みの解明を目指し，小腸の細胞増殖に関与する候補因子としてポリアミンに注目し，その細胞内動向を調べた。【方法】プルーン(*Prunus domestica* L.)エキスから単離したペクチンを小腸上皮様細胞 Caco-2 に与え，ポリアミン代謝に関連する酵素の mRNA 発現量をリアルタイム RT-PCR により解析し，添加時間を変えて細胞内のポリアミン量を測定した。また，ポリアミンの一種であるスペルミジンから *N*[1]-アセチルスペルミジンを合成し，未分化小腸上皮細胞 IEC-6 に与え，細胞増殖活性を確認した。【結果】プルーンペクチンを小腸上皮様細胞に添加すると，ポリアミンの合成に関わるオルニチン脱炭酸酵素(ODC)の mRNA 発現量が増加した。この時，細胞内のポリアミン量はスペルミジンが 5.81 nmol/mg protein(1.6 倍)，スペルミン 5.25 nmol/mg protein(1.3 倍)に増加し，また，細胞内のポリアミンをアセチル化して細胞外に排出するスペルミジン・スペルミン *N*[1]-アセチル基転移酵素(SSAT)の mRNA 発現量も増加していることが明らかとなった。そこで，食物繊維により細胞外に積極的に排出されたと考えられる *N*[1]-アセチルスペルミジンを未分化小腸上皮細胞に添加し，細胞増殖活性試験を行った。その結果，*N*[1]-アセチルスペルミジンは細胞増殖に関与しないことが明らかとなった。現在，小腸上皮細胞内でポリアミンの蓄積が細胞の分化に与える影響を検討している。

Pectin, Polyamine, Intestine

講演番号：2F26p03
講演日時、会場：3 月 27 日 14:22～ F 校舎 26 会場

ペクチンのムチン分泌促進作用とその活性部位同定の試み
Pectin and Its Hydrolysates Stimulate Intestinal Mucin Secretion
○日野 真吾、寺崎 史高、森田 達也（静大院農）
○Shingo HINO, Fumitaka TERASAKI, Tatsuya MORITA (Shizuoka Univ.)

【目的】一般に，水溶性食物繊維（SDF）の摂取は，その消化管内での粘性に応じて小腸杯細胞数を増加させることでラット小腸ムチン量を増加させる。一方，低メトキシペクチン（LPC）は例外的な挙動を示し，その摂取は小腸杯細胞数とは無関係に小腸ムチン量を増加させる。また，リンゴ由来の LPC，高メトキシペクチン（HPC）はともにヒト杯細胞株である HT-29MTX 細胞のムチン分泌を促進する。これらの結果は，ペクチンの持つ特定の化学構造がムチン分泌を促進する可能性を示唆している。本研究では，ペクチンの持つムチン分泌促進作用が SDF の中でも例外的であることを再検証するとともに，ペクチン分解物の分画を進めることでペクチン活性部位の同定を試みた。**【方法】実験 1:** HT-29MTX 細胞（1×10^6 cells/well）を 6 well plate に播種し，血清培地を用いて 7 日間培養した。次いで，70% エタノールで滅菌した LPC を含む 18 種類の SDF（各 100 mg/L）を各々添加した無血清培地で細胞を培養し（24h），培養上清中の MUC5AC 量（ELISA）および *MUC5AC* 発現量を測定した。**実験 2:** 実験 1 と同様に, 由来（リンゴ, シトラス, オレンジ）, メトキシ化度（15-59%）, 分子量（15,000, 45,000，150,000）の異なるペクチンおよびガラクツロン酸オリゴ糖（分子量 500）のムチン分泌促進作用とその濃度依存性（6-100 mg/L）を解析した。**実験 3:** シトラス由来低分子化 LPC 1 g を 50 mL の酢酸バッファー（pH 4.5）に懸濁後，75 μL のガラクツロナーゼを加え 50℃で 6 時間反応させた。反応溶液を蒸留水に対して透析後，水溶性画分を凍結乾燥により濃縮し DEAE-cellulose カラムにより分画した。溶出は水，0.1-0.4 M NaHCO3，0.1 M NaOH で行った。実験 1 と同様に，各画分のムチン分泌促進作用について濃度依存性（0.1-30 mg/L）および時間依存性（1-24h）を解析した。**【結果・考察】** HT-29MTX 細胞に対するムチン分泌促進作用はペクチンでのみ認められ, 他の SDF にこの作用は認められなかった。ペクチンはガラクツロン酸オリゴ糖を除き，その由来，分子量およびメトキシ化度に関わらずムチン分泌を促進した。ガラクツロナーゼ分解物は， 0.1- 0.3 M $NaHCO_3$ 溶出画分に主要な 3 ピークを示し，すべての画分が濃度依存的なムチン分泌促進作用を示した。各画分の最小作用発現濃度は 0.3（0.1 M $NaHCO_3$ 画分），3（0.2, 0.3 M $NaHCO_3$ 画分），1（0.4 M NaHCO3 画分）mg/L であり，ペクチンと比べて作用発現濃度が大幅に低下した。また，0.1 M $NaHCO_3$ 画分では経時的な分泌量の増加と一過性の MUC５AC 発現量の増加が観察された。ガラクツロン酸オリゴ糖に作用が認められないこと，また，ガラクツロナーゼ分解物に活性が認められることから，ペクチンのムチン分泌促進には hairy region が関与すると推定された。

pectin, mucin, goblet cell

講演番号：2F26p04
講演日時、会場：3 月 27 日 14:33～ F 校舎 26 会場

コンドロイチン硫酸が前駆軟骨細胞の増殖や分化に与える影響

Effects of chondroitin sulfates on the proliferation and differentiation of pre-chondrocytes

○柿崎 美里、中谷 祥恵、古旗 賢二、和田 政裕（城西大学）
○Misato KAKIZAKI, Sachie NAKATANI, Kenji KOBATA, Masahiro WADA (Josai Univ)

【目的】
コンドロイチン硫酸（CS）は、関節軟骨のヒアルロン酸（HA）に結合しているアグリカンの主糖鎖である。CS は軟骨細胞で産生され、HA と同様に水分保持機能を有するため、関節の物理的刺激を緩和している。しかし、加齢に伴う関節軟骨の CS 量の減少が報告されている。CS を経口摂取させた際、関節軟骨の CS 量が増加することが複数の動物実験で報告されている。しかし、その詳細なメカニズムは不明である。そこで本研究では、前駆軟骨細胞株（ATDC5）を用いて CS のグリコサミノグリカン（GAG）量を増加させるメカニズムについて検討した。
【方法】
ATDC5 に CS（1000 μg/mL）を添加し、培養を行った。細胞増殖は WST-1 法、初期分化の指標となるアルカリフォスファターゼ（ALP）染色法、GAG 量をアルシアンブルー（AB）染色法、石灰化をアリザリンレッド（AR）法を用いて評価した。また、CS の ALP への直接的影響を評価するために、ウシ由来 ALP の活性に及ぼす CS の影響を調べた。
【結果】
CS の添加は ATDC5 の細胞増殖には影響を与えなかったが、ALP 染色面積を約 1/20 倍に有意に減少させた。さらに、CS の添加は総 GAG 量を Control と比べて約 1.6 倍、硫酸基特異的 GAG 量を約 1.3 倍に有意に増加させた。また、CS の添加は ATDC5 の石灰化を Control と比べて約 1 /2 倍に抑制した。しかし、CS はウシ由来 ALP の酵素活性には影響を与えなかった。
【考察】
軟骨細胞は、間葉系幹細胞から増殖軟骨細胞、成熟軟骨細胞、肥大化軟骨細胞を経て、最終的に石灰化軟骨細胞へと分化する。成熟軟骨細胞は GAG を産生するが、石灰化軟骨細胞は GAG 産生能を失う。今回の培養細胞系の結果から、CS が ALP 活性を減少させたが、これは酵素に対する直接的な影響ではなかった。このことから、CS はシグナル因子として働き、間接的に ALP の発現を減少させている可能性が示された。この ALP の減少が石灰化を誘導する無機リンの生成を抑えて後期分化を抑制し、GAG の産生期間（成熟軟骨細胞）が延長したと考えられる。その結果、GAG 量が増加し、石灰化が抑制したと考えられる。

Chondroitin sulfate, Alkaline phosphatase

講演番号：2F26p05
講演日時、会場：3 月 27 日 14:44～ F 校舎 26 会場

プロテオグリカンは皮膚線維芽細胞の基質産生を増加させる

Proteoglycans increase the matrix production of skin fibroblast

○渡邊 准子、中谷 祥恵、古旗 賢二、和田 政裕 (城西大学)
○Noriko WATANABE, Sachie NAKATANI, Kenji KOBATA, Masahiro WADA (Josai Univ.)

【目的】

皮膚や軟骨などの結合組織は、ヒアルロン酸(HA)にプロテオグリカン(PG)が結合した構造体を多く含む。PG は、タンパク質に複数のコンドロイチン硫酸(CS)が結合した構造体である。HA や CS は、生体内において強く負に荷電しているために高い保水能力を有しており、関節の可動性維持や皮膚の保水性に寄与している。近年、遊離の HA が繊維芽細胞の細胞外マトリックス(ECM)関連遺伝子の発現を調節し、ECM 産生を増加させることで皮膚の恒常性を維持していることが報告されている。また当研究室で遊離の CS が､繊維芽細胞の遺伝子発現を介して基質産生を増加させることを明らかにしてきた。しかしこの効果が、CS 単体により発揮しているのかは明らかにされていない。また、CS の高次構造体である PG については研究されていない。そこで本研究は、CS と PG が線維芽細胞の ECM 産生に与える影響を検討した。

【方法】

市販の鶏膝軟骨を粉砕し水により抽出することで PG、コアタンパク質、HA が高次構造体を形成せている ECM を含む粗 PG 画分を調製した。粗 PG 画分をアルカリ溶液およびプロテアーゼによる分解を行い、HA やタンパク質、CS が遊離している粗 CS-HA 画分を調製した。標準品として精製されたサメ由来 CS(MW.113 kDa)を使用した。ヒト皮膚線維芽細胞(HDF)に各画分を添加し培養した。細胞増殖は WST-1 法、総グリコサミノグリカン(GAGs)量は Alcian Blue(pH2.5)染色法、硫酸基特異的 GAGs 量を Alcian Blue(pH1.0)染色法、コラーゲン量は AZAN 染色法を用いて測定した。

【結果および考察】

細胞増殖は、Control と比較して粗 PG 画分および粗 CS-HA 画分の添加において有意に促進した。総 GAGs 量は、Control および CS の添加と比較して粗 PG 画分および粗 CS-HA 画分の添加において有意に増加した。しかし、硫酸基特異的 GAGs 量には影響を与えなかった。コラーゲン量は、Control および CS と比較して粗 CS-HA 画分の添加において有意に増加した。本研究の結果、多糖構造体である CS よりも高次構造体である PG が、皮膚恒常性の維持に重要であることが示唆された。今後、PG 体が CS 同様、遺伝子発現の調節を介して基質産生能を高めている可能性を検討していく。

Skin fibroblast, Proteoglycans, Chondroitin sulfate

講演番号：2F26p06
講演日時、会場：3 月 27 日 15:05～ F 校舎 26 会場

フコイダン摂取によるエタノール・アセトアルデヒドの低減作用

Effects on metabolism of ethanol by fucoidan intake.

○川本 仁志[1]、阿部 直[1]、笠木 健[1]、平松 喜美子[2]、池口 匡[2]([1]海産物のきむらや、[2]鳥取大医)
○ Hitoshi KAWAMOTO[1], Sunao ABE[1], Takeshi KASAGI[1], Kimiko HIRAMATSU[2], Tadasu IKEGUCHI[2] ([1]Marine Products Kimuraya, [2]Tottori Univ.)

【目的】フコイダンとはモズク、コンブ、メカブなどの褐藻類に含まれるフコースを主な構成糖とする硫酸化多糖である。フコイダンについては、抗がん作用、抗炎症作用、抗ウイルス作用などの生理作用が報告されているが、飲酒時における影響については十分な検討はされていない。本研究はフコイダンがエタノール摂取に与える影響を血液検査と呼気成分分析で評価することを目的とした。
【方法】健康な成人 21 名(年齢；20～60 代)を対象として、フコイダンの経口摂取による呼気及び血中の状態変化を評価した。試験過程は、まず試験開始 6 時間前に参加者に同一の食事内容を摂取させ、試験開始時は空腹になるようにした。そしてアルコールを負荷する前(飲酒 0 時間後)に、呼気及び血液を採取した。その後に日本酒 2 合を 10 分以内に摂取させ、飲酒 2、4、6、14 時間後に、呼気及び血液を採取した。フコイダンの摂取は飲酒 30 分前に行った。また、試験開始 2 時間後の呼気及び採血終了後に、参加者に試験開始前とは異なる同一の食事を摂食させた。血液検査では、一般的な生化学値とエタノールとアセトアルデヒド濃度を分析した。呼気についてはエタノールとアセトアルデヒドをガスクロマトグラフィーで測定した。統計処理は t 検定で行い、有意水準は 5%とした。本研究は国立大学法人鳥取大学医学部倫理審査委員会の承認を得て実施した(承認番号 1203)。
【結果】試験参加者のうち、試験途中での脱落者及び血液検査の結果から飲酒以外の影響で異常値を示した者を除外した残りの 10 名に対して解析を進めた。フコイダンを摂取することによってエタノール･アセトアルデヒドともに濃度が各測定時間においても総量(積算量)においても低減されていることを確認した。特に顕著だったのは呼気中アセトアルデヒドの 4 時間と呼気中エタノールの 2 時間においてであり、フコイダンの有無で有意差がみられた($p<0.05$)。また血清中アセトアルデヒドの 6 時間と血清中エタノールの 2 時間においてもフコイダンの有無によって有意差がみられた($p<0.05$)。
【考察】フコイダン摂取の有無により飲酒 14 時間後の呼気及び血中のエタノールとアセトアルデヒド及び生化学値に差がなく、フコイダン摂取のタイミングを検討した試験で飲酒直前や飲酒後でのフコイダン摂取で差がなかったことから、フコイダン摂取がエタノールの吸収を遅延させることで、アセトアルデヒドが体内で大量に生じず、悪酔い等の症状が軽減されることが考えられた。
【結論】フコイダンには呼気中エタノール・アセトアルデヒドの濃度を低減する効果が確認された。
なお、本研究は公益財団法人鳥取県産業振興機構の平成 20 年度次世代・地域資源産業育成事業により、鳥取大学との共同研究で行った。

fucoidan, ethanol

講演番号：2F26p07
講演日時、会場：3 月 27 日 15:16～ F 校舎 26 会場

フコイダン添加によるアルコール飲料の風味改善作用
Flavor-improving effect of alcohol by fucoidan addition
○舟越 稔、阿部 直、川本 仁志、笠木 健 (海産物のきむらや)
○Minoru FUNAKOSHI, Sunao ABE, Hitoshi KAWAMOTO, Tskeshi KASAGI (Mrine Products Kimuraya)

【目的】フコイダンとはモズク、コンブ、メカブなどの褐藻類に含まれるフコースを主とする硫酸化多糖である。フコイダンについては、抗がん作用、抗炎症作用、抗ウイルス作用などの生理作用が報告されているが、フコイダンそのものが持つ物性が生体を介さずに及ぼす反応についてはあまり検討されていない。本研究はフコイダンとアルコール飲料の官能変化をアンケート調査と味認識装置と pH で、揮発量の変化を GC/MS で評価することを目的とした。
【方法】アンケート調査はクローズドパネルテスト(n=5)で行った。対象はビール、ワイン、日本酒、焼酎(水割り・ストレート)、ウイスキー(水割り・ストレート)とし、試験項目は清酒の香味に関する品質評価用語体系をもとに香り・外観・味について項目を設定し、自筆評価をさせた。味認識装置(TS-5000Z)では 8 項目(酸味、苦味雑味、渋味刺激、旨味、塩味、苦味、旨味コク)を検査項目とし、芋焼酎へ各濃度でフコイダン添加したものと基準液を比較した。またフコイダン添加による日本酒、芋焼酎、ワインでの pH 変化を測定した。フコイダンを添加した有機酸水溶液について GC/MS で揮発量を測定した。
【結果】サンプル間で試験項目の変化率の標準偏差を比較したところ、焼酎ストレートが最も変化がみられた。全体的な傾向として蒸留酒(ウイスキー、焼酎)において試験項目の変化が顕著だった。次に試験項目間でサンプルを比較したところ、主に味の項目、具体的には後味の向上ときめの改善がみられた。また香りの項目ではあまり変化はみられなかったが、いわゆる悪臭の抑制傾向がみられた。味認識装置においては酸味の抑制と旨味の増強傾向がみられた。芋焼酎にフコイダンを添加することで pH5 程度まで中和される傾向がみられた。有機酸の中でもイソ酪酸、イソ吉草酸、カプロン酸にフコイダンを添加した場合に揮発量が低下する傾向がみられた。
【考察】官能と揮発量の変化を踏まえると、フコイダン添加によりアルコール飲料の pH が上昇して高濃度では悪臭を呈するイソ酪酸、イソ吉草酸、カプロン酸などの有機酸の揮発量が低下して酸味と悪臭が抑制されることで、醸造酒よりもアルコール度数が高く含有成分が少ない蒸留酒において、より顕著に後味の向上ときめの改善がみられることが考えられた。
【結論】フコイダン添加によるアルコール飲料の風味改善作用を確認した。

fucoidan, alcohol

講演番号：2F26p08
講演日時、会場：3 月 27 日 15:27～ F 校舎 26 会場

フコイダン塗布による虫刺傷の掻痒軽減効果

Pruritus relief effect of insect stings by fucoidan apllicaition

○阿部 直[1]、川本 仁志[1]、笠木 健[1]、山本 陽子[2]、深田 美香[2] ([1]海産物のきむらや、[2]鳥取大医)
○Sunao ABE[1], Hitoshi KAWAMOTO[1], Takeshi KASAGI[1], Yoko YAMAMOTO[2], Mika FUKATA[2] ([1]Marine Products Kimuraya, [2]Tottori Univ.)

【目的】フコイダンモズク、ワカメ、メカブ、昆布などの褐藻類やナマコ、ウニ、ヒトデなどの棘皮動物等に多く含まれる硫酸化フコース含有多糖類である。フコイダンについては、抗がん作用、抗炎症作用、抗ウイルス作用などの生理作用が報告されているが、皮膚との相互作用についての検討は不十分である。本研究はフコイダン塗布によって虫刺傷に関連した掻痒反応がどのように変化するかをアンケート調査及びモデル動物によって行動評価することを目的とした。
【方法】アンケート調査では、蚊による症状について自筆評価で記入させた。虫刺されモデルマウス(雄性 ICR マウス、1 群につき n=6)に対してプリックテストによる掻き回数と掻き時間の変化を、ビデオによって記録し、起痒物質の投与前後における 15 分間の行動を評価した。さらに同一個体に対して起痒物質の投与後にフコイダンを塗布し同様に評価した。起痒物質はヒスタミン、サブスタンス P、コンパウンド 48/80、ブラジキニンを使用した。かゆみ軽減物質のコントロールとしてヒスタミン投与後に抗ヒスタミン剤を塗布し症状を評価した。解析においては、起痒物質の投与前との掻き回数の差を比較して、投与後に掻き行動が誘導されなかった個体を除外した。誘導された個体数は、サブスタンス P が 6 匹、コンパウンド 48/80 が 4 匹、ブラジキニンが 4 匹、ヒスタミンが 5 匹だった。本研究は公益財団法人鳥取県産業振興機構における動物実験安全委員会の承認を得て実施した(承認番号 A-011)。
【結果】アンケート調査では、蚊による症状が軽減される傾向が示唆された。モデルマウスの行動評価では、フコイダンの塗布でヒスタミンよりもサブスタンス P とコンパウンド 48/80 とブラジキニンにおいてかゆみによる掻き回数の減少と掻き時間の短縮がみられ、かゆみ軽減効果が確認された。
【考察】かゆみには、細胞内でいくつかの物質を介した経路があり、ヒスタミンを介した直接的な経路とアラキドン酸を介した経路がある。アラキドン酸はさらにプロスタグランジンとロイコトリエンをそれぞれ体内に放出させ、ロイコトリエンを介してかゆみが生じる。サブスタンス P や蚊刺しによるアレルギーはロイコトリエンを介したかゆみに関与している。またコンパウンド 48/80 はヒスタミンとアラキドン酸の双方を介してかゆみを生じさせる。本研究では 4 つの起痒物質の刺激に対するフコイダンの作用の違いを比較することで、アラキドン酸を介した経路に作用することが考えられた。
【結論】フコイダン塗布での虫刺傷による掻痒反応の軽減作用が確認された。

fucoidan, insect stings, polysaccharide

講演番号：2F26p09
講演日時、会場：3 月 27 日 15:38～ F 校舎 26 会場

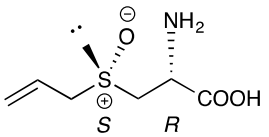
X 線結晶構造解析による Alliin 中の *S*-オキサイドの絶対立体配置の決定

Determination of absolute configuration of *S*-oxide in Alliin by X-ray crystallography

○小山 亮祐[1]、谷田 瑞希[1]、羽賀 知美[1]、袴田 航[1,2]、平野 貴子[1]、熊谷 日登美[1,2]、西尾 俊幸[1,2] ([1]日大生資科・生命化、[2]日大院生資科)
○Ryosuke KOYAMA[1], Mizuki TANIDA[1], Tomomi HAGA[1], Wataru HAKAMATA[1,2], Takako HIRANO[1], Hitomi KUMAGAKI[1,2], Toshiyuki NISHIO[1,2] ([1]Chem. and LIfe Sci., College of Bioresource Sciences. Nihon Univ., [2]Graduate Schools of Bioresource Science, Nihon Univ.)

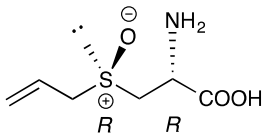
【歴史的背景と目的】ニンニクの香気成分は、様々な生理活性を示すことが数多く報告されている。1909 年、その香気成分前駆体が配糖体であることが提唱され “Alliin” と命名された。1948 年、香気成分前駆体は配糖体ではなくアミノ酸誘導体（下図左）であり、アリイナーゼにより分解され香気成分を生成することが報告された。1951 年、Alliin の 4 つの立体異性体を全て合成・単離したのち、アリイナーゼとの反応性が評価され、ニンニク中の Alliin は *L*-システインの誘導体であり右旋性を示すことが報告された。1956 年、Alliin のアリル基をメチル基とした誘導体において preliminary（原文のまま）な X 線結晶構造解析がなされ、メチル誘導体の 4 つの立体異性体の硫黄原子における絶対立体配置が報告された。1968 年、Alliin のアリル基の二重結合を還元しプロピル基とした誘導体において、旋光分散（ODR）スペクトルに基づいた硫黄原子の絶対立体配置が報告された。1969 年、Alliin とプロピル誘導体では、硫黄原子の立体配置が同じであっても ODR スペクトルの向きが逆になることが報告された。1971 年にも同様の報告がなされ、ニンニク由来 Alliin の硫黄原子上の絶対立体配置が *S* であることが示された。2005 年には、Alliin の硫黄原子上の絶対立体配置が *R* である *allo* Alliin（下図右）がニンニクに含まれていることが報告されている。しかし、これら結論は preliminary な結晶構造解析とアリイナーゼとの反応性に基づいて Alliin の立体配置を示したものであり、Alliin の絶対立体配置の完全な決定はなされていない。そこで我々は、X 線結晶構造解析法を用いた Alliin の絶対立体配置の完全な決定を試みた。

【方法と結果】 *L*-システインメチルエステルを出発原料としチオールアリル化により Deoxyalliin を得た。次に過酸化水素水により *S*-オキサイドとし、カラムクロマトグラフィーにより 2 つのジアステレオマーを単離した。得られたジアステレオマーをそれぞれ Boc 修飾し再結晶を行った。得られた結晶の X 線構造解析を行った結果、非常に高い分解能で *allo* Alliin 誘導体の 2 つの不斉中心の絶対立体配置を決定した。本結果とニンニク由来 Alliin の機器分析結果を比較することによって、Alliin の絶対立体配置の決定を行ったので報告する。



Alliin, (*Rc, Ss*)-*S*-allyl-*L*-cystein sulfoxide

Natural: Major component



allo alliin, (*Rc, Rs*)-*S*-allyl-*L*-cystein sulfoxide

Natural: Minor component

alliin, synthesis, absolute configuration

講演番号：2F26p10
講演日時、会場：3 月 27 日 15:49～ F 校舎 26 会場

にんにくを原料とした S-アリルシステイン（SAC）の新規製造方法

A novel production process of S-allylcysteine (SAC) from garlic

○高柳 勝彦、名和 和恵、向井 克之（ユニチカ（株）　中央研究所）
○Katsuhiko TAKAYANAGI, Kazue NAWA, Katsuyuki MUKAI (UNITIKA Ltd., R&D Center)

【緒言】

にんにくは、古代エジプトにおいてピラミッドの建設に携わった労働者が食していたことが知られるなど、古くから滋養強壮をはじめとする健康増進効果が知られていた。これらの効果はにんにくに含まれるアリインをはじめとする様々な含硫化合物によると言われている。

S-アリルシステイン（SAC）はアリインに類似した構造の含流アミノ酸である。SAC には様々な機能性が報告されており、また高い安全性も確認されている。しかしながら食品中の含有量は極めて少なく、長期熟成にんにくやその抽出物（AGE）中にわずかに見出されるのみであった。そこで、我々はにんにくを原料とした SAC の新しい製造方法について検討を行った。

【材量及び方法】

皮と台座（根の根元）を除去した青森県産にんにく（福地ホワイト）を加熱してアリイナーゼを完全に失活させた後、等倍の水と共にミキサーで処理してにんにくペーストを得た。pH を 8.0 に調整した後、所定の温度で一定時間保温した。遠心分離により上清を回収し、移動相に 10mM リン酸カリウム（pH2.5）を使用した HPLC 法（CAPCELL PAK SCX：資生堂）により SAC を分析した。

【結果】

にんにくペーストを 35℃の水浴で保温したところ、アリインの減少に伴い SAC が増加し、24 時間後には 3.6mg/ml の SAC が生成した。反応終期にアリインを添加すると、添加したアリインは経時的に減少し、それに伴い再び SAC が生成したことから、SAC はアリインが還元されて生成することが示唆された。そこで、にんにくペーストに各種還元性物質を加えて SAC 産生に及ぼす影響を調べたところ、システインやグルタチオンの添加により SAC 産生が促進されることを見出した。SAC はにんにく中のアリインが、内在性のシステイン等により還元されて生成していることが示唆された。

【結語】

従来の SAC 製造方法は、熟成に長時間が必要であり、さらに産生量が非常に少なかったが、アリイナーゼを失活させた後、加熱保温することにより、従来よりも高濃度の SAC を短時間で得ることが可能となった。また、この SAC はアリインの還元により生じていることが示唆された。

garlic, s-allylcysteine, SAC

講演番号：2F26p11
講演日時、会場：3 月 27 日 16:10～ F 校舎 26 会場

３－デオキシキシロソン由来架橋性メイラード反応後期段階生成物の同定

Identification of 3-deoxyxylosone-derived crosslinked glycation products.

○鳥海 春香[1]、石渡 まどか[1]、臼井 照幸[2]、渡辺 寛人[1]、早瀬 文孝[1]([1]明治大農、[2]女子栄養大栄養)
○Haruka TORIUMI[1], Madoka ISHIWATA[1], Teruyuki USUI[2], Hirohito WATANABE[1], Fumitaka HAYASE[1] ([1]Meiji Univ., [2]Kagawa Nutrition Univ.)

【背景・目的】

アミノ化合物とカルボニル化合物の反応であるメイラード反応では、中間体としてα-ジカルボニル化合物（α-DC）が生成する。α-DC はグルコースなどに比べて反応性が高く、タンパク質の分子間や分子内の架橋に大きく関わる重要な化合物である。これまでにα-DC とリジンから glyoxal-derived lysine dimmer（GOLD）、methylglyoxal-derived lysine dimmer（MOLD）等の架橋性イミダリウム化合物が生成することが報告されている。本研究ではα-DC である 3-deoxyxylosone（3DX）とリジンから同様の架橋性イミダゾリウム化合物が生成するかについて検討を加えた。

【実験方法】

(1) 3DX と Nα-Acetyl-L-lysine (AcLys)をそれぞれ 20 mM になるように 0.2 M リン酸バッファー（pH 7.4)に溶解し、37℃で 6 時間インキュベートした。同様に formaldehyde (FA)を 20 mM となるよう加えた溶液も調製した。反応溶液を固相抽出により脱塩し、LC-ESI-Q-TOF-MS で分析した。また RP-HPLC を用いて 3DX-AcLys-FA 系より生成する主要反応生成物を単離・精製した。単離した化合物を NMR、LC-ESI-Q-TOF-MS などに供し、化学構造を同定した。
(2) 3DX, AcLys, ^{13}C-FA をそれぞれ 20 mM となるよう 0.2 M リン酸バッファー（pH 7.4）に溶解し、37℃で 24 時間インキュベートした。固相抽出により脱塩した後、LC-ESI-Q-TOF-MS に供し、主要化合物を同定した。

【実験結果及び考察】

3DX, AcLys のみの系ではイミダゾリウム化合物は生成しなかった。FA を共存させた系からはイミダゾリウム化合物である 3-deoxyxylosone-derived lysine dimmer (XOLD)が主要反応生成物として同定された。LC-ESI-Q-TOF-MS の結果より ^{13}C-FA を用いた系では XOLD の 2 位の炭素はすべて FA 由来炭素であった。従って、FA は触媒ではなく自身がとりこまれることでメチン架橋に直接関与し、イミダゾリウム環を形成することが明らかとなった。これらのことより XOLD は短鎖カルボニル化合物の共存下で主に生成されることが示唆された。

Maillard reaction, 3-deoxyxylosone, Advanced glycation end products

講演番号：2F26p12
講演日時、会場：3 月 27 日 16:21～ F 校舎 26 会場

メイラード反応を利用したβ-コングリシニン-糖質複合体の創出
Preparation of β-Conglycinin-Saccharide Conjugate by the Maillard Reaction.
○友野 美怜、高橋 良平、好田 正、服部 誠（東農工大農）
○Misato TOMONO, Ryohei TAKAHASHI, TADASHI YOSHIDA, MAKOTO HATTORI (Tokyo Univ.Agric. Tech.)

【目的】大豆タンパク質の主成分であるβ-コングリシニンは必須アミノ酸を豊富に含む良質のタンパク質であり、食品加工の際に有用な乳化性・気泡性・ゲル化性などの機能特性を発揮し、また、血中コレステロール低下作用、血圧上昇抑制、抗酸化作用、肥満防止効果などの生理機能を持つ有用な食品素材である。一方で、このタンパク質は酸性条件下で等電点により不溶化してタンパク質機能特性が低下するため、食品の調理・加工・保存における大豆タンパク質の利用の障害となっている。また、大豆アレルギーの原因物質であることも問題となっている。以上の事から、β-コングリシニンの機能を改変する事には大きな意義がある。

そこで本研究では、β-コングリシニンの食品中における機能特性を向上させつつ低アレルゲン化の達成することを目的として、実際の食品に応用可能なメイラード反応により、β-コングリシニンと酸性多糖のカルボキシメチルデキストラン(CMD)を複合体化させることで、β-コングリシニンの機能特性の向上と低アレルゲン化を達成する事を目的としている。

【方法】β-コングリシニンは、等電点沈殿と Q-Sepharose Fast Frow (2.5 ID×50 cm, GE Healthcare Bio-Science AB)を用いた陰イオン交換クロマトグラフィーにより、脱脂大豆粉末から抽出・精製した。CMD はデキストラン（10 kDa）を水酸化ナトリウム存在下でモノクロロ酢酸と 40℃、48 時間反応させ、カルボキシメチル基を付加させて調製した。精製β-コングリシニンの Lys 残基と CMD のカルボキシメチル基のモル比が 1：10 となるように混合し、50℃、RH79%、0～7 日間反応させて、最適時間条件を検討した。最適条件で調製したβ-コングリシニン-CMD 複合体を SDS-PAGE に供し、分子量の変化を確認した。さらに、複合体中のβ-コングリシニンの量を測定し、機能特性の評価として、様々な pH における溶解性を測定した。

【結果】メイラード反応により、高分子のβ-コングリシニン-CMD 複合体が得られた。幾つかの反応条件を検討した結果、メイラード反応の最適反応時間は 7 日間である事が明らかとなった。溶解性測定により、β-コングリシニン-CMD 複合体はβ-コングリシニンと比較して pH 5.0 における溶解性が改善していることが確認された。これは CMD の結合により等電点が酸性側にシフトしたこと、および親水性が付与されたことによるものであると考えられる。溶解性が高まることにより他の機能特性も発揮されやすくなると考えられる。以上のように、本研究の手法によりβ-コングリシニンの食品素材としての応用の可能性を広げることができた。

β-conglycinin, functional improvements, the Maillard Reaction

講演番号：2F26p13
講演日時、会場：3 月 27 日 16:32～ F 校舎 26 会場

米澱粉粒表層タンパク質とα-amylase の相互作用性について

The interaction of the rice starch granule surface protein and α-amylase

○塩野 弘二[1]、辻井 良政[2]、野口 智弘[3]、高野 克己[2]([1]東京農大院・農・農芸、[2]東京農大・応生・化学、[3]東京農大・応生・食加技セ)
○ Kouji Shiono[1], Yoshimasa Tsujii[2], Tomohiro Noguchi[3], Katsumi Takano[2] ([1]Agrichem.,Agr.,Grad.Sch.,Tokyo Univ.Agric., [2]Dept.Appl.Biol.chem.,Fac.Biosci.Tokyo Univ.Agric., [3]Fac.Biosci.,FPC,Tokyo Univ.Agric.)

【目的】

デンプン粒表層にはタンパク質(Starch Surface Protein:SSP)が存在し、我々はトウモロコシデンプン粒では SSP を除去するとα-amylase による分解性が低下すること、デンプンの起源によって SSP 量が異なり SSP 量と同 amylase による生デンプンの分解性に関係性があることを報告している。このことから SSP とα-amylase との間に相互作用性が推察されるため、本報告では SSP 含量が多い米デンプン粒を用いて検討を行った。

【方法】

SSP 抽出は米デンプン(SIGMA 社)10g に 10 倍量の 1% SDS 溶液を加え振とう（30℃、一晩）した。その後、遠心分離を行い得られた上澄液をアセトン濃縮処理し米 SSP を調製した。SSP とα-amylase の相互作用性の確認は活性染色法およびα-amylase 抗体を用いた Far western blot 法にて行った。活性染色法は SSP 溶液（2.5mg/ml）にα-amylase(*Bacillus* sp. SIGMA 社)1mg/ml を加え、静置（4℃、1 時間）した。その後、SDS-PAGE 処理液(Me+)を加え還元変性処理（4℃、一晩）を行った後、SDS-PAGE に供した。泳動後のゲルは 1%可溶性デンプンを含む 10mM MES-NaOH 緩衝液(pH6.0)を加え振とう(25℃、8 時間）を行った後、0.1%ヨウ化カリウムを含む 0.01%ヨウ素溶液にて染色を行った。抗原抗体反応試験は SSP 溶液（2.5mg/ml）を SDS-PAGE(Me+)に供し、泳動終了後のゲルを PVDF 膜にブロッティングを行った。その後、ベイトタンパク質としてα-amylase を PVDF 膜に浸漬させ、SSP と相互作用性を示したα-amylase を抗原抗体反応(Anti-α-amylase; *Bacillus amyloliquefaciens*、 ROCKLAND 社)にて検出した。

【結果】

SSP とα-amylase を混合すると、SDS-PAGE 上の 55kDa に見られたα-amylase バンドが消失し、80kDa に新たなバンドが確認された。活性染色でも SSP とα-amylase を混合すると同様に 55kDa の活性バンドが消失し、80kDa に新たな活性バンドが検出された。さらに Far western blot 法の結果、SDS-PAGE 上で異なる分子量に数種確認された SSP の内、15kDa のタンパク質に対しα-amylase 抗体のシグナルバンドが検出され、SSP とα-amylase 間に相互作用性が認められた。

α-amylase, Starch surface protein, interaction

講演番号：2F26p14
講演日時、会場：3 月 27 日 16:43～ F 校舎 26 会場

アラニンスキャニング法を用いた味覚修飾タンパク質ネオクリンによるヒト甘味受容体活性化機構の解析

Characterization of the molecular mechanisms of human sweet taste receptor activation by alanine-scanning mutagenesis of taste-modifying protein neoculin

○小泉 太一、寺田 透、中島 健一朗、三坂 巧（東大院農生科）
○Taichi KOIZUMI, Tohru TERADA, Ken-ichiro NAKAJIMA, Takumi MISAKA (The Univ. Tokyo)

【背景・目的】ネオクリンはマレーシア産の食用果実クルクリゴより発見された甘味タンパク質で、それ自身が甘味を呈するだけでなく、酸味を甘味に変換する「味覚修飾活性」というユニークな性質を持つ。この性質は、酸味物質を味わうことで口腔内pHが酸性側に傾いたとき、このタンパク質自身の甘味が強くなるために生じるとされるものの、その詳細な分子メカニズムは解明されていない。

我々はネオクリンがタンパク質であるゆえに、構造機能相関に着目してきた。これまで、ネオクリン分子がpH依存的にその立体構造を変えることで自身の甘味強度を変化させると予想し、NMR法を用いて立体構造変化の様子をしらべた。その結果、pHに依存して立体構造変化を生じうるアミノ酸残基を網羅的にスクリーニングできた。本研究ではこれらのアミノ酸残基の中に、ネオクリンのpHに依存した甘味強度変化の鍵となる残基が複数存在すると考え、変異体解析により検証を行った。

【方法】NMR解析によりスクリーニングされたアミノ酸残基を中心とし、計14種類のアミノ酸残基を対象とした変異体解析を実施した。各残基をAlaに置換したネオクリン点変異体を、大腸菌発現系で生産した。リフォールディング後、各種クロマトグラフィに供することで精製タンパク質を取得し、その甘味活性を評価した。この際、ヒト甘味受容体を一過的に発現させた培養細胞評価系を用いることで、各変異体によるヒト甘味受容体の活性化強度およびそのpH依存性を定量的に評価し、甘味活性の指標とした。

【結果】(1) pHセンサーとして機能することが示されているHis残基を含む4種類のアミノ酸残基をAlaに置換すると、pH依存性が消失し、pHに依らずヒト甘味受容体を強く活性化するようになった。これより4種類のアミノ酸残基はネオクリンのpHに依存した甘味強度変化を制御していることが示唆された。(2) 別の4種類のアミノ酸残基をAlaに置換すると、pH依存性への影響は観られなかったものの、酸性条件下においてヒト甘味受容体を活性化させる強度が増加または減少した。同時に、中性条件下においてネオクリンは特定の甘味物質によるヒト甘味受容体の活性化を競合的に阻害するが、この阻害活性も増加または減少した。これより当該する4種類のアミノ酸残基は、ネオクリンのヒト甘味受容体に対する親和性決定に寄与していることが示唆された。(3) 上記2群のアミノ酸残基はこのタンパク質の分子表面上で立体構造上異なる場所に位置しており、また二重変異体解析の結果が相加的であったことから、「ネオクリンの甘味活性が異なる２つのパラメーターにより独立に制御されている」という、味覚修飾活性に関する新たな知見を得ることができた。

sweet, taste-modifying protein, pH dependence

講演番号：2F26p15
講演日時、会場：3 月 27 日 16:54～ F 校舎 26 会場

コメプロラミンの溶解性に寄与する構造要因の解析

Analysis of structural factors contributing to solubility of rice prolamin

○田中 俊裕、裏出 令子、丸山 伸之（京大院農・農学）
○Toshihiro TANAKA, Reiko URADE, Nobuyuki MARUYAMA (Kyoto Univ.)

【目的】 コメは炊飯して食するだけではなく、コメ粉などとしても食品利用される。コメには乾燥重量に対して約 7%程度のタンパク質が含まれており、それらのタンパク質化学的な性質に関する基礎的知見を蓄積することが、コメの多様な食品利用に寄与すると考えられる。コメタンパク質は、緩衝液には不溶性であり、希アルコールに対して可溶性を示すプロラミンを主要な構成成分としている。コメプロラミンには、分子量に基づき、10 kDa、13 kDa、16 kDa などの分子種が存在している。一方、ピーナッツなどにおいて主要な貯蔵タンパク質である 2S アルブミンはコメプロラミンと同様のスーパーファミリーに分類されるが、プロラミンと異なり水に可溶な性質を示す。本研究では、組換えタンパク質を用いて、コメプロラミンの溶解性を分子種レベルで解析するとともに、2S アルブミンと比較することにより、コメプロラミンの特殊な溶解性に寄与する構造要因を解明することを目的とする。
【方法】1) 10 kDa および 13 kDa プロラミンに対する発現ベクターを構築し、酵母(*Pichia Pastoris*)に形質転換した。抗生物質で選抜後、培養し、1% 2-mercaptoethanol (2-ME) を含む 60% 1-プロパノールを用いて抽出した。さらに、Ni アフィニティーカラムにより組換え型プロラミンを精製した。2) コメを粉砕し、性質の異なる溶媒を用いてコメタンパク質を分画することにより、プロラミン(天然型プロラミン)を調製した。3) ピーナッツ 2S アルブミン(Ara h 6)について大腸菌で発現させ、10 mM 2-ME を含むリン酸緩衝液で抽出したのち、Ni アフィニティーおよびゲル濾過クロマトグラフィーによって組換え型 Ara h 6 を精製した。
【結果】調製した各サンプルについて、プロパノール濃度に対する溶解度について解析した。サンプルを希釈することによりプロパノール濃度を調節した後、各濃度条件において可溶化しているタンパク質濃度を分析したところ、組換え型 10 kDa および 13 kDa プロラミンは共に、プロパノール濃度が 30% (v/v) 付近より低くなると、溶解度が顕著に低くなることが示唆された。このような溶解度の傾向は天然型プロラミンと類似していた。一方、組換え型 Ara h 6 は水に対して可溶性を示し、コメプロラミンと対照的にプロパノール濃度が上昇するに従って溶解性が低下した。現在、コメプロラミンとの構造の比較に基づいて、Ara h 6 を部分的に改変した組換えタンパク質を作成し、それらの溶解性を調べることで、プロラミンの溶解性に寄与する構造要因について検討している。

Rice, prolamin, solubility

講演番号：2F26p16
講演日時、会場：3 月 27 日 17:15～ F 校舎 26 会場

パイナップル酵素による卵・牛乳アレルゲンの分解
Degradation of egg and milk antigen by pineapple enzym
○友竹 浩之、伊藤 瑠美、志摩 妃沙、中村 未来、山原 愛理 (飯田女子短期大学)
○Hiroyuki Tomotake, Rumi Ito, Hisa Shima, Miku Nakamura, Airi Yamahara (Iida Women's Junior College)

【目的】　近年、食物アレルギー患者は増加傾向にあり、原因食品として、卵、牛乳、小麦が挙げられている。アレルギー治療の原則はアレルゲンを含む食品の摂取回避であるが、治療に必要な食品除去の程度は、症状によって異なり、抗原性の低減化により摂取可能となる軽症例も存在する。しかしながら、卵アレルゲンの卵白オボムコイドや牛乳アレルゲンの乳清βラクトグロブリンは、熱や消化酵素に対する抵抗性が高く、低減化しにくい。本研究では、卵または牛乳をパイナップル果肉と均質化することにより、アレルゲンタンパク質を分解するための調理条件を検討することを目的とする。

【方法】　牛乳 200ml と市販のパイナップルキューブ（果肉）2 個を電動ミキサーで均質化し、経時的にサンプリングした後、沸騰水中で酵素反応を停止した。卵液（1 個分）はキューブ 1 個と均質化し、同様に処理した。各試料から PBS を用いてタンパク質を抽出し、SDS-PAGE によりタンパク質の分解の様子を調べた。調理条件を検討するため、パイナップル果肉と均質化して、30 分反応させた牛乳および卵を用いて、ホットケーキ、クレープ、ドーナツ、ビスコッティ等を作成した。官能試験を実施し、評価の高かった食品からタンパク質を抽出し、SDS-PAGE で分析した。

【結果と考察】パイナップル果肉で処理した牛乳および卵は時間とともに物性が変化した。
また、牛乳および卵の構成タンパク質は時間とともに分解し、30 分経過後は SDS-PAGE で観察できるバンドが少なくなった。調理条件を検討した結果、パイナップル果肉で処理した牛乳や卵を用いた場合、卵の気泡性はもちろんのこと、小麦粉の物性にも影響するため、パン、ケーキなど膨化を必要とする食品には適さないことがわかった。ホットケーキおよびクレープ中のタンパク質を抽出し、分析した結果、未処理の食品に比べて、全てのタンパク質バンドの量が減少していた。今後は、卵および牛乳の主要アレルゲンに対する特異抗体を用いて、検討を進める予定である。

pineapple, antigen, degradation

講演番号：2F26p17
講演日時、会場：3 月 27 日 17:26～ F 校舎 26 会場

ペプシンによるコラーゲン分解反応の解析
Analysis of collagen digestion by pepsin
○銭 鈞[1]、岡田 夕佳里[1]、小倉 孝之[2]、田中 啓友[2]、服部 俊治[2]、滝田 禎亮[1]、保川 清[1]([1]京大院農、[2]株式会社ニッピ・バイオマトリックス研究所)
○Jun Qian[1], Yukari Okada[1], Takayuki Ogura[2], Keisuke Tanaka[2], Toshiharu Hattori[2], Teisuke Takita[1], Kiyoshi Yasukawa[1] ([1]Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]Nippi Research Institute of Biomatrix)

【目的】I 型コラーゲンは 2 本の α1 鎖と 1 本の α2 鎖から成る 3 量体分子で、分子内部に三重らせん領域を、N 末端と C 末端にテロペプチドをもつ。I 型コラーゲンは 3 個の Tyr 残基（2 個が N 末端、1 個が C 末端のテロペプチドに存在）をもち、Trp 残基をもたない。I 型コラーゲンの 2 本のα鎖のテロペプチドは N および C 末端間で、一定の割合で Lys 残基が架橋されており、還元条件下の SDS-PAGE で複数のバンドを示す。コラーゲンにペプシンを作用させると、テロペプチドの特定の部位が切断され、本バンドのパターンが変化する[1)]。本研究では、本分解反応に伴う Variant β11 鎖（V-β11：2 本の α1 鎖が N 末端および C 末端テロペプチドの両方で架橋されている）のバンドの減少を指標として、速度論的解析を行った。さらに、本分解に伴うコラーゲンの構造変化を調べた。
【方法】1. 分解反応：0.63 M 酢酸緩衝液（pH 4.0）、0.4−2.8 mg/ml ウシ真皮由来酸抽出コラーゲン（ASC）（ニッピ）、5 μM ブタ膵臓由来ペプシン存在下、30–65℃で反応を行った。経時的に反応液を採取し、3 M Tris-HCl 緩衝液（pH 7.5）を 20%（v/v）加えて反応を停止させた。これを還元条件下の 5%SDS-PAGE にかけ、CBB で染色後、V-β11 鎖のバンドの濃さを画像解析ソフト Image J で定量化し、その減少速度を反応速度（v_0）とした。2. 蛍光および CD スペクトル：ASC、1.0 mg/ml ASC を 37°C で 1 時間反応を行い、反応を停止させたもの（PASC）およびウシ真皮由来ペプシン抽出コラーゲン（PSC）（ニッピ）の蛍光発光（励起波長 280 nm）および CD スペクトルを測定した。
【結果と考察】①反応の温度依存性：v_0 は ASC 濃度に対してミカエリス・メンテン型のプロフィールを示した。37°C での K_m は 1.5±0.2 mg/ml、k_{cat} は 0.12±0.01 min^{-1} であり、ともに反応温度の上昇に伴い増加し、65°C では 3.4±0.1 mg/ml、0.34±0.01 min^{-1} に達した。 ②アレニウスプロット：活性化エネルギーは 30−40℃では 11±2 kJ mol^{-1} であったが、50−65℃では 28±2 kJ mol^{-1} であった。この違いは 50℃以上で三重らせん構造が減少したと考えられた。 ③反応の pH 依存性：K_m と k_{cat} は pH の上昇とともに減少し、pH 2.1 での K_m は 4.2±0.8 mg/ml、k_{cat} は 0.38±0.05 min^{-1} であった。 ④分解に伴う構造変化：PASC の SDS-PAGE パターンは PSC と同じで、ASC と比べて V-β11 鎖のバンドが消失し、β11、β12、α1 鎖のバンドのサイズが減少した。ASC、PASC、PSC は類似した蛍光（300 nm にピーク）および CD（202 nm に極小、222 nm に極大）スペクトルを示した。以上のことから、コラーゲンの三重らせん構造はペプシンによる分解で大きく影響を受けないと考えられた。
【文献】1. Sato, K. et al. (2000) *J. Biol. Chem.,* **275**, 25870-25875

type I collagen, pepsin, triple helical structure

講演番号：2F26p18
講演日時、会場：3 月 27 日 17:37～ F 校舎 26 会場

赤身牛肉の熟成による遊離アミノ酸量の変化に関する研究

Study of free amino acid in aging of beef

○杉岡 和貴[1]、田崎 司[1]、堺 久弥[2]、家入 誠二[2]、荒木 朋洋[1] ([1]東海大農、[2]熊本県農研セ)
○Kazutaka SUGIOKA[1], Tsukasa TASAKI[1], Hisaya SAKAI[2], Seizi IEIRI[2], Tomohiro ARAKI[1] ([1]Tokai Univ., [2]Kumamoto Pref. Agric. Res. Center)

【目的】

近年，健康志向から赤身牛肉の評価が高まりつつある．そこで，本研究では褐毛和牛，特に赤身牛肉に含まれる遊離アミノ酸について，熟成中の変化の特徴を明らかにし，赤身牛肉に適した熟成期間について，肉のうまみに重要なファクターを与える熟成の指標作成を目的とした．

【方法】

褐毛和種の赤身牛肉を氷冷下で２日間，９日間，２０日間，４０日間，熟成しサンプルとした．これらのサンプルを乳鉢でホモジナイズ後に，１ｇを量り取り１０mL の蒸留水で抽出を行い，遠心分離後の上清を粗抽出液とした．粗抽出液は５％トリクロロ酢酸を等量加え除タンパク操作を行った．遠心分離後の上清はメンブレンフィルターで濾過後，自動アミノ酸分析計により遊離アミノ酸組成分析を行った．遊離アミノ酸の分析の結果は赤身牛肉１グラム中のアミノ酸量として計算し熟成期間別で比較した．

【結果】

各熟成期間の遊離アミノ酸量の比較の結果，熟成日数の経過にしたがいタンパク質を構成するアミノ酸を中心に変化が見られた．これらのアミノ酸では熟成日数に応じて，増加するアミノ酸が多く見られ，そのアミノ酸量は熟成日数２０日から４０日の間で特に大きな増加が見られた．この中で，グルタミン酸，ロイシンは含量も多く，安定しているため指標になりうると考えられた．また，これらの増加した遊離アミノ酸には甘味や苦味などの呈味アミノ酸が多く含まれていることから，熟成によって赤身牛肉の味に変化があると考えられた．しかし，タンパク質構成アミノ酸でも，グルタミンおよびアラニンに関しては安定した増加が見られず極めて変動が大きかった．一方で，非タンパク性アミノ酸であるタウリン，アンセリン，カルノシンでは熟成日数の経過によるアミノ酸量の増加は見られなかった．そこで，熟成日数の経過にしたがい大きくアミノ酸量が増加したロイシンと熟成日数の経過でアミノ酸量がほとんど変化しないアンセリンの２種のアミノ酸の値を使い熟成日数の経過によるアミノ酸の増加の基準となるファクターを求めた．このファクターを用いて赤身牛肉の熟成評価を行うことができると考えられた．

beef, aging, free amino acid

講演番号：2F26p19
講演日時、会場：3 月 27 日 17:48～ F 校舎 26 会場

SDS-PAGE による牛肉タンパク質の変動と同定
Identification of the beef protein by SDS-PAGE

○細澤 知香[1]、廣田 楓[1]、杉岡 和貴[1]、堺 久弥[2]、家入 誠二[2]、荒木 朋洋[1] ([1]東海大農、[2]熊本県農研セ)
○Chika HOSOZAWA[1], Kaede HIROTA[1], Kazutaka SUGIOKA[1], Hisaya SAKAI[2], Seizi IEIRI[2], Tomohiro ARAKI[1] ([1]Tokai Univ., [2]Kumamoto Pref. Agric. Res. Center)

【目的】牛肉は熟成により味や食感が変化することが知られている．これは肉中のタンパク質が熟成中に分解されることにより起きていると考えられる．そのため肉中の熟成メカニズムを解明するには熟成によって変動するタンパク質の同定が必要である．そこで本研究ではアミノ酸組成分析を用いて牛肉のタンパク質の同定を試みた．
【方法・結果】赤身牛肉 1 g に 10 ml の蒸留水を加え，粗抽出液を調製した．SDS-PAGE を用いタンパク質を分離した．泳動後のゲル中のタンパク質は PVDF 膜へブロッティング後に CBB 染色を用いて検出した．得られたバンドを切り出し，試験管内で 0.05%β-メルカプトエタノールを含む混合酸（6M 塩酸：トリフルオロ酢酸=2:1）0.5 ml を加え減圧下で封管した．その後 110℃で 24 時間加水分解した．加水分解完了後，混合酸を乾固し 0.02 M 塩酸 200μl でアミノ酸を再溶解した．得られた試料をメンブレンフィルターでろ過し L-8500A 型アミノ酸分析計（日立製作所製）を用いて分析した．タンパク質同定にはアミノ酸組成による同定システム（ver1.2 ； 特開 2010-96501）を使用した．アミノ酸組成分析のデータを本システムに読み込ませることによりアミノ酸組成比（mol%）を求め，データベース上に存在するタンパク質のアミノ酸配列から算出された組成比の理論値との比較によってタンパク質を同定した．データベースは SWISS-PROT 上に登録されている全タンパク質アミノ酸配列情報を利用した．またこれらと N 末端配列分析を用いたタンパク同定結果を比較した．N 末端配列分析での同定は，同様に SDS-PAGE 後ブロッティングしたタンパク質バンドをエドマン分解法によって配列決定した． NCBI の BLAST サーチプログラムを使用し配列の検索を行い，配列相同性のあるタンパク質を同定した．N 末端配列分析およびアミノ酸組成により得られたタンパク質同定結果を比較した結果，N 末端が翻訳後修飾されていることで配列分析できなかったタンパク質においても，アミノ酸組成分析を用いて同定することができた．このことから本手法は翻訳後修飾されたタンパク質同定にも有効であると考えられる．今回のタンパク質同定より牛肉中の熟成中に変動するタンパク質は Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase であることがわかった．

beef protein, protein identification, amino acid analysis

講演番号：2F26p20
講演日時、会場：3 月 27 日 17:59～ F 校舎 26 会場

ローヤルゼリータンパク質アピシンの精製と定量

Purification and quantitative analysis of the royal jelly protein apisin

○古澤 貴子、新井 靖子、加藤 健司、市原 賢二 (アピ（株）長良川リサーチセンター)
○TAKAKO FURUSAWA, YASUKO ARAI, KENJI KATO, KENJI ICHIHARA (Nagaragawa research center, API Co., Ltd.)

【背景・目的】アピシンは、ローヤルゼリー (RJ) に含まれる特有の糖タンパク質で、major royal jelly protein 1（MRJP1）とアピシミンから構成されるタンパク質複合体として、RJ タンパク質の中に最も多く含まれている。これまでアピシンの定量法、特に簡易で汎用性の高い高速液体クロマトグラフィ（HPLC）を用いた定量法は確立されていない。この要因として、定量分析に使用可能な高純度のアピシン標準品が得られていないことが挙げられる。そこで本研究では、アピシンの単離精製およびその保存方法を検討し、アピシンの標準品を作製するとともに HPLC により RJ 中に含まれるアピシン量の測定を試みた。

【方法】生 RJ30 g を超純水 1000 mL で希釈し、10%NaOH で pH4.8 に調整したものを遠心分離（3,000 rpm、4℃、30 分）し、アピシンを含む沈殿物を得た。得られた沈殿物に 0.3 M NaCl を含む 0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液（pH7.2）を加えて懸濁したものをろ紙ろ過し、ゲル濾過クロマトグラフィ（Sephacryl S-300HR）により分画した。アピシンの純度確認は、HPLC（PROTEIN KW-803）および SDS-PAGE で行った。精製したアピシン溶液を脱塩後、トレハロースを添加して凍結乾燥させ、アピシン粉末を調製した。この調製したアピシン粉末を標準品として HPLC 分析を行い、絶対検量線法により生 RJ および凍結乾燥 RJ 中のアピシンの定量を行った。

【結果・考察】等電点沈殿およびゲル濾過クロマトグラフィによりアピシンを単離精製し、HPLC 分析で単一ピークであることを確認した。さらに SDS-PAGE 分析で、構成タンパク質である MRJP1 とアピシミンのみが検出されたことから、精製したアピシンは、高純度で標準品となり得ることが示唆された。そこで、この高純度アピシン溶液にトレハロースを加えて凍結乾燥し、-20℃および 4℃保存で少なくとも 9 ヶ月間は安定なアピシン粉末を作製した。得られたアピシン粉末を標準品とし、HPLC 絶対検量線法により生 RJ および凍結乾燥 RJ 中のアピシンを定量した結果、それぞれ 3.3~3.9 w/w%と 8.7~9.4 w/w%であった（N=6）。本研究では、アピシン標準品の調製法および HPLC によるアピシンの定量法を確立した。さらに、RJ には一定量のアピシンが含まれていることが明らかとなり、アピシンは、RJ の品質規格成分として定量されているデセン酸（10-Hydroxy-*trans*-2-decenoic acid）に並ぶ新たな品質規格成分になり得ることが示唆された。

apisin, royal jelly protein, HPLC analysis

講演番号：2F28a01
講演日時、会場：3 月 27 日 09:00～ F 校舎 28 会場

乳化 d-リモネン噴霧乾燥粉末からの d-リモネン徐放挙動

Release characteristics of d-limonene from emulsified d-limonene spray-dried powder

○高重 至成、四日 洋和、吉井 英文（香川大農）
○shisei TAKASHIGE, hirokazu SHIGA, hidehumi YOSHII (Kagawa Univ.)

[目的] 近年，種々の粉末香料が食品の嗜好性を強化するために用いられている．噴霧乾燥による粉末香料の作製において，噴霧乾燥時のフレーバー及び，粉末回収率に加え，作製した粉末からのフレーバー徐放性，粉末貯蔵時のフレーバーの酸化安定性などが重要となる．フレーバーの徐放速度は，環境の温湿度のほか，賦形剤の分子物理化学的特性(分子構造やガラス転移温度(T_g)など)が関係することが解っている．賦形剤としてマルトデキストリン(MD)を用いた場合，MD の Dextrose Equivalent (DE) によってフレーバーの徐放挙動が異なることが指摘されているが，現在，その詳細な機構は明らかとなっていない．よって，本研究では *d*-リモネンの徐放挙動に及ぼす MD の DE 値の影響を明らかにすることを目的として，ショ糖(Suc)，α-ラクトース(Lac)，マルトデキストリン(DE-25，19)を用いて乳化 *d*-リモネン噴霧乾燥粉末を作製し，定速湿度増加法(湿度ランプ法)による粉末からの *d*-リモネン徐放挙動について検討した．

[方法] 蒸留水に賦形剤として，Suc，Lac，または MD(DE-25，19)，乳化剤としての乳蛋白質加水分解物(エマルアップ，森永乳業)，抗酸化剤としてアスコルビン酸ナトリウムをそれぞれ加えて溶解した後，*d*-リモネンと中鎖脂肪酸トリグリセリド(アクター M-2，理研ビタミン)の混合溶液を添加し，攪拌して乳化液を作製した．次いで，乳化液を噴霧乾燥機(L-8 型，大川原化工機製)で乾燥し，各種乳化 *d*-リモネン噴霧乾燥粉末を調製した．作製した粉末は，目開き 212，150，106 および 75 μm の篩で分級し，徐放試験に供した．*d*-リモネンの徐放挙動は，湿度ランプ法により評価した．15 mL バイアル瓶(φ16 x 80 mm)に *d*-リモネン粉末 約 0.1 g を加え，50℃に設定した空気恒温槽に静置した後，所定の湿度に調整した N_2 ガスを 100 mL/min の流速でサンプルに導入した．関係湿度を 22.5℃/h の速度で増加させながら，サンプルからの出口空気 5 mL を経時的に採取し，ガスクロマトグラフィー(GC-14A，島津製作所)により N_2 ガス中に含まれる *d*-リモネン濃度を分析した．

[結果および考察] 乳化 *d*-リモネン噴霧乾燥粉末からのフレーバーは，特定の湿度から *d*-リモネンが徐放し始め，湿度の増大によって著しく増大した． *d*-リモネンの徐放が開始する湿度は賦形剤によって異なり，それぞれ，Suc では 50%，Lac 60%，MD(DE=25) 70%，MD(DE=19) 80%RH 付近であった．これら湿度と徐放速度に及ぼす湿度の影響として、吸湿によるガラス転移温度の低下が大きな要因として推察される。また、徐放開始湿度と各賦形剤の T_g の大小にはそれぞれ相関が見られた．

flavor, spray-dried powder, release

講演番号：2F28a02
講演日時、会場：3 月 27 日 09:11～ F 校舎 28 会場

デキストロース当量が乳化魚油噴霧乾燥粉末の包括特性に及ぼす影響

Effect of dextrose equivalent on the encapsulation properties of spray-dried fish oil powders

○足立 早映[1]、四日 洋和[1]、安達 修二[2]、吉井 英文[1] ([1]香川大農、[2]京都大院農)
○Sae ADACHI[1], Hirokazu SHIGA[1], Syuji ADACHI[2], Hidefumi YOSHII[1] ([1]Kagawa Univ., [2]Kyoto Univ.)

［目的］近年,乳幼児や高齢者向けの機能性食品として n-3 系多価不飽和脂肪酸（PUFA）を多く含む魚油が注目されている.しかし,PUFA は容易に酸化し異臭を放つため,食品に用いる際には油脂の安定化が不可欠である.油脂の安定化手法の一つとして,噴霧乾燥法によるマイクロカプセル化がある.酸化安定性に優れた噴霧乾燥粉末を作製するには,粉末表面に露出した油の割合（表面油率）を少なくすることが重要である.既往の研究において,我々は,ナノエマルション化により表面油率を大幅に低減できることを報告している.一方，賦形剤の物性が粉末の酸化安定性に影響を及ぼすことが指摘されているが,その詳細は分かっていない.そこで,本研究では，乳化魚油粉末の酸化安定性に及ぼすマルトデキストリン(MD)の Dextrose Equivalent(DE)値の影響について検討した.

［方法］乳化魚油噴霧乾燥粉末は,賦形剤に DE 11, 19 または 25 の MD,乳化剤にカゼイン Na をそれぞれ用いて魚油乳化液を調製し,それを噴霧乾燥して作製した.乳化液の固形分組成は魚油(40wt%),MD(57wt%),カゼイン Na(3wt%)とした.作製した粉末の酸化安定性は，試験管に粉末 4 または 8 g を加え,105℃のヒートブロックで所定時間加熱し,粉末の表面油分および包括油分,全油分の過酸化物価(POV)の経時変化をそれぞれ確認して評価した.粉末の表面油量は,粉末をヘキサン洗浄し,上澄み液を薄層クロマトグラフィー検出装置(TLC-FID)により測定した.包括油量はヘキサン洗浄後の粉末をジメチルホルムアミド(DMF)に溶解後,ヘキサン抽出液を TLC-FID で測定した.また,表面油分および包括油分の POV は,各ヘキサン抽出液を濃縮後,AOCS 公定法のクロロホルム/酢酸法により決定した.

［結果］噴霧乾燥粉末の表面油率は，DE25 および DE19 で作製した粉末に比べて DE11 の粉末の方が顕著に高かった.走査型電子顕微鏡により各粉末の切断面を確認したところ，DE 値の低い MD ほど,中空粒子を形成し易いことが分かった.これら結果を基に,空孔径/粉末径の比,d_i/d_p と表面油率の関係について解析したところ,d_i/d_p と表面油率には良好な相関性がみられることが明らかとなり,中実粒子の形成が表面油分の低減に有効であることが示唆された.次に,各粉末の 105℃における酸化安定性を確認した.DE11 は他の DE と比べて高い酸化性を示した．各粉末の表面油，包括油，及び全油の POV 変化は、初期に表面油の POV が増加するのに対して包括油の POV は殆ど変化しなかった.この表面油の POV 増加速度は、DE11 の粉末の場合が DE19,25 に比べ倍程度大きかった.これは、DE11 の乳化魚油粉末の表面油率が大きいためと推察された.

fish oil, spray dry, encapsulation

講演番号：2F28a03
講演日時、会場：3 月 27 日 09:22～ F 校舎 28 会場

Release of allyl sulfide from spray-dried powder containing allyl sulfide in palm oil

○THEERADON THEINHIRAN, HIROKAZU SHIGA, HIDEFUMI YOSHII (Kagawa Univ.)

[Purpose] Allyl sulfide is volatile compound that can be found naturally in garlic. To control the release and protect the oxidation of flavors, the flavor encapsulation by spray drying has been undergoing development in the beverage, food and industry. Spray-dried powder containing allyl sulfide is used in the addition of this flavor to various foods. There are few reports for the effects of powder composition and formation condition of spray-dried powder on the release behaviors of ally sulfide. In this study, effect of the melting temperature (m.p.) of palm oil as dilution solvent of ally sulfide and oil droplet size on the retention of allyl sulfide during spray drying and the release behavior from spray-dried powder and solubilized powder solution.
[Materials and Methods] Allyl sulfide and Maltodextrin (MD, Pindex#4 DE:19) were purchased from Wako Pure Chemicals (Osaka, Japan). and from Matsutani Chemical Industry Co,.LTD, respectively. Sodium-caseinate(SC) was used as emulsifier, and palm oils with various melting points were used as dilution solvent of allyl sulfide. The feed solution was composed of 37 wt% MD, 10 wt% palm oil with 10,000 ppm allyl sulfide, and 3 wt% SC, and then was homogenized by using a Polytron homogenizer (PT-6100, Kinematica, Littau, Switzerland) at 8000 rpm for 1 min and/or further by high-pressure homogenizer (Starburst Mini, Sugino Machine LTD.) at 100 MPa 2 pass. To transform to the powder, the emulsion was feed into an Ohkawara-L8 spray dryer (Ohkawara Kakouki, Yokohama, Japan) The operational conditions of the spray drying were: air inlet temperature of 150 °C, air outlet temperature of 100 °C, feed rate of 25 mL/min and air flow rate of 70 kg/h. The rotational speed of the atomizer was controlled at 10,000 rpm. Oil and particle droplet size distribution of the feed liquid emulsions and spray-dried powder were analyzed using a laser scattering nano particle size analyzer (SALD-7100, Shimadzu, Kyoto, Japan). Allyl sulfide extracted in spray-dried powder was measured by a gas chromatography (GC-2010, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan).
[Results and Discussion] The retentions of allyl sulfide in spray-dried powder for larger oil-droplet above 1 μm were lower than those for smaller oil-droplet diameter (near 0.1 μm). At 44 ºC incubation of spray-dried powder, the stability of allyl sulfide with the high m.p. (about 45 ºC) of palm oil was higher than that with low m.p. (about 20 ºC). the m.p of palm oil did not have a huge effect to the release rate of allyl sulfide in the solubilized solution of spray-dried powder.

flavour, spray-dried powder, release

講演番号：2F28a04
講演日時、会場：3 月 27 日 09:33～ F 校舎 28 会場

植物油の固化過程の速度論的検討
Solidification kinetics of vegetable oil
○宮川 弥生、小川 剛伸、中川 究也、安達 修二（京大院農）
○Yayoi MIYAGAWA, Takenobu OGAWA, Kyuya Nakagawa, Syuji Adachi (Kyoto Univ.)

【目的】 油脂を含有する食品において，その結晶（固体脂）は物性や安定性に大きく寄与するため，油脂結晶の生成や成長の動力学を理解することは食品の品質管理において重要である．油脂の結晶化の挙動は多く検討されているが，結晶化に至るまでの時間，すなわち結晶化の誘導期に関する検討は少ない．そこで本研究では，低温下での食品の保存を想定し，常温で液体である植物油を曇点以下で保存した際の固化挙動を検討して得られた誘導期に関する基礎的知見を報告する．
【方法】 菜種油，大豆油およびこれらを 1 : 3，1 : 1 または 3 : 1 の重量比で混合した油を試料とし，ガラス製円筒容器（18 mmϕ × 90 mm）に充填した．容器の中心部に熱電対を固定し，試料を曇点以下で冷却保持したときの試料の中心部の温度変化を経時的に測定した．また，油脂の結晶化を促進または抑制する作用をもつ 4 種の親油性乳化剤を添加した菜種油についても同様の測定を行い，乳化剤が油脂の固化挙動に及ぼす影響を検討した．
【結果】 試料を曇点以下に保持すると，数十分～数時間後に試料の固化による発熱に起因すると考えられる温度変化が観測された．発熱が認められるまでの時間（誘導期）は，冷却保持温度が低いほど短くなる傾向を示したが，–25℃前後で保持した場合には，–20℃と比較して誘導期が延長し，発熱の傾向が異なった．また，同一の温度で冷却保持した場合には，菜種油が最も誘導期が短く，大豆油の混合割合が高いほど長い誘導期を示した．植物油の結晶化を抑制する乳化剤を加えた場合には，–20℃保持では誘導期が延長したが，–25℃ではその程度はわずかであった．また，–30℃以下では乳化剤の種類によらず，いずれの乳化剤を添加した場合についても誘導期が短縮した．これらの結果より，結晶化に影響を及ぼすとされる乳化剤は，植物油を保存する温度によって固化の誘導期に及ぼす作用が異なることを確認した．
【謝辞】本研究は，「京都大学・岐阜大学・日清製粉グループ 穀物科学コンソーシアム」の一部として実施した．

solidification, vegetableoil, kinetic

講演番号：2F28a05
講演日時、会場：3 月 27 日 09:44～ F 校舎 28 会場

微結晶セルロースの乳化作用について

Emulsification properties of micro-crystalline cellulose

○合谷 祥一、吉岡 凌太 (香川大農)
○Shoichi Gohtani, Ryota Yoshioka (Kagawa Univ.)

1. 緒言

微結晶セルロース製剤は界面活性を示さないと考えられるにもかかわらず乳化性を示すことが知られている。本研究では、分散、乳化、懸濁、耐熱性などの安定剤としての機能を示す微結晶セルロース製剤（セオラス® DX-3）の乳化性について調べた。

2. 実験方法

微結晶セルロース製剤（セオラス® DX-3 以後 DX-3 と略す。)、この成分である微結晶セルロース、加工デンプン、キサンタンガム、マルトデキストリン（いずれも旭化成ケミカルズ（株）より入手)、アラビアガム（ナカライテスク(株)製 Gum Arabic）及びポリグリセリン脂肪酸エステル（阪本薬品工業(株)製 ML-500）を水に分散あるいは溶解し、これに市販の食用油（日清オイリオ：サラダ油）を全量に対して 10%含む様に調製した。これを、高速ディスパーサーで 15,000rpm、1 分間攪拌し、乳化性、クリーミング安定性を調べ、分散状態を位相差顕微鏡で観察した。水溶液及び分散液/食用油系の界面張力を Wilhelmy 法により、水溶液及び分散液の粘度はコーンプレート型粘度計（東機産業 TV-20）により測定した。小角Ｘ線散乱測定(（株）リガク、Nano-Viewer)により分散液中の高次構造の有無を評価した。

3. 結果及び考察

DX-３及び微結晶セルロースは乳化性を示し、それ以外の添加物は使用濃度では乳化性を示さなかった。ML-500 及びアラビアガムとの比較では、DX-3 及び微結晶セルロースは、これらより高いクリーミング抑制作用を示した。また、DX-３及び微結晶セルロースは水/食用油の界面張力を低下させなかった。水分散状態では、キサンタンガムよりも DX-３及び微結晶セルロースの方が低粘度であった。小角 X 線散乱測定から、微結晶セルロースは水分散液中で特別な高次構造をとらないと考えられた。これらから、油滴の隙間に散在する結晶セルロースの固い粒子が、クリーミングや合一を物理的に阻害することにより、乳化安定性を示しているのではないかと推測した。

micro-crystalline cellulose, emulsification, creaming stability

講演番号：2F28a06
講演日時、会場：3 月 27 日 10:05～ F 校舎 28 会場

界面前進凍結濃縮による生食用ブドウ（ルビーロマン）濃縮果汁を用いたワインの製造と品質評価
Production of wine from progressive-freeze-concentrated grape "Ruby roman" juice and its quality evaluation

○三輪 章志[1]、石崎 佳奈[1]、笹木 哲也[2]、武 春美[2]、松田 章[2]、北野 滋[3]、表 千晶[4]、小柳 喬[4]、宮脇 長人[4]([1]石川農林総研、[2]石川工試、[3]明和工業(株)、[4]石川県大生資環)
○Shouji Miwa[1], Kana Ishisaki[1], Tetsuya Sasaki[2], Harumi Take[2], Akira Matsuda[2], Shigeru Kitano[3], Chiaki Omote[4], Takashi Koyanagi[4], Osato Miyawaki[4] ([1]IshikawaAFRC, [2]IRII, [3]Meywa Co.,Ltd., [4]Ishikawa Pref. Univ.)

【目的】現在、液状食品の濃縮には主に蒸発法が用いられている。しかし、蒸発法は高温で濃縮するため、食品の香気成分の損失や栄養成分の変質が避けられない。これに対して凍結濃縮法は各種成分の保持率が高いことから高品質な濃縮法として知られているが、既存法の懸濁結晶法は装置のスケールダウンが難しいため大規模濃縮に限られてしまう。そこで、我々は装置のスケールダウンが容易な「界面前進凍結濃縮法」を用いて、原液が数 L～数 10L 規模からの濃縮が可能な凍結濃縮装置を開発している。今回、界面前進凍結濃縮法により濃縮した生食用ブドウの果汁を補糖せずにアルコール発酵させ、果汁の風味を活かしたワインを製造し、品質を評価したので紹介する。
【方法】ブドウ果実（ルビーロマン）を粉砕、裏ごしした混濁果汁にペクチナーゼ製剤を添加し、果汁の粘性を低下させた。酵素処理後の果汁を珪藻土系のろ過助剤とともにろ過して清澄化した。調製したブドウ果汁を界面前進凍結濃縮装置によって濃縮した。濃縮果汁は、発酵開始前に 63℃で 30 分間低温殺菌を行った。また、発酵は、濃縮果汁に最終濃度 200ppm の亜硫酸と前培養した後に果汁で菌体を洗浄した *Saccharomyces cerevisiae*OC2 株を添加し、25℃で 15 日間静置して発酵させワインを製造した。果汁の回収率、果汁および濃縮果汁の糖度、発酵過程での発酵液のｐH、アルコール濃度、残糖濃度を測定した。
【結果】前処理調製した果汁の果実に対する回収率は、68%であり、糖度は Brix14.6 であった。これを界面前進凍結濃縮装置により濃縮した結果 Brix25.5 程度とすることができ、果汁回収率は Brix 基準で 62%であったが、回収率については氷結晶部分融解法により改善が可能であった。発酵過程中のｐH は、発酵前が 3.73 で 15 日後は、3.75 とほぼ同等のｐH が維持された。残糖量は、発酵 5 日目以降平衡状態となったがアルコール濃度は、発酵 9 日目まで順調に増加し、その後、発酵 15 日目までほぼ平衡状態となった。濃縮果汁の発酵後のアルコール濃度は理論収率の約 90%の 11.54%となり、一般的なブドウワインと同等のアルコール濃度まで高める事ができた。果汁とワインの香味は、味覚認識装置（インテリジェントセンサーテクノロジー SA402B)、およびにおい識別装置（島津製作所 FF-2A）を用いて、香気成分は、固層マイクロ抽出法(SPME 法）により、GC-MS（アジレント・テクノロジー C8790A/5375C）を用いて現在検討中である。
本研究は経済産業省戦略的基盤技術高度化支援事業の採択を受けて研究開発中である。

Freeze, Concentrate, Wine

講演番号：2F28a07
講演日時、会場：3 月 27 日 10:16～ F 校舎 28 会場

低加圧二酸化炭素マイクロバブル処理による清酒の殺菌・酵素失活について

Enzyme inactivation and pasteurization of sake by low pressure carbon dioxide microbubbles

○小林 史幸[1]、池浦 博美[2]、小竹 佐知子[1]、桜井 博志[3]([1]日獣大応生、[2]明治大研究・知財推進機構、[3]旭酒造株式会社)
○Fumiyuki KOBAYASHI[1], Hiromi IKEURA[2], Sachiko ODAKE[1], Hiroshi SAKURAI[3] ([1]Nippon Veterinary and Life Science Univ., [2]Meiji Univ., [3]Asahishuzo Co. Ltd.)

【背景・目的】

生酒は通常、65℃で 3 分程度の加熱処理により火落菌を殺菌ならびに酵素を失活することで常温流通・保存を可能にしている。しかしながら、この加熱処理を施すことにより、清酒は少なからず加熱特有の香味を生じ、生酒が持つフレッシュ感が損なわれる。これまでに我々は、加圧下で二酸化炭素をマイクロバブル化して殺菌・酵素失活を行う装置（$MBCO_2$）を開発し、数種の微生物の殺菌および酵素の失活を行った。そこで本研究では、$MBCO_2$ を従来の加熱処理に替わる清酒の殺菌・酵素失活技術として実用化することを目的として、様々な条件での $MBCO_2$ により生酒中の火落菌の殺菌・酵素失活を行い、その清酒の品質評価を行うことで、$MBCO_2$ の最適処理条件を検討した。

【方法】

試料として、市販の生酒（UPS, 旭酒造株式会社製）を用いた。$MBCO_2$ 処理は、45℃、55℃、65℃および 75℃で行った。$MBCO_2$ 処理の殺菌・酵素失活効果は、$MBCO_2$ 処理後の清酒中の生存火落菌数および残存酵素活性を測定することで評価した。官能評価は、各温度でα-グルコシダーゼを完全に失活可能な条件（45℃で 50 分、55℃で 5 分、65℃で 10 秒および 75℃で 1 秒）で $MBCO_2$ 処理したもの（MB45、MB55、MB65 および MB75 処理酒）、65℃で 3 分間加熱処理したもの(HTS)および UPS を用いて行った。官能評価は、清酒の味および香りについて 10 名のパネリスト（男女比 1:1、22～61 歳）により 7 段階評価（3：非常に良い～-3：非常に悪い）で実施した。

【結果・考察】

$MBCO_2$ 処理により清酒中の火落菌、α-アミラーゼ、グルコアミラーゼおよび酸性カルボキシペプチダーゼは、全ての温度の最も短い処理時間で失活した。しかしながら、$MBCO_2$ 処理によりα-グルコシダーゼを失活するためには、45℃で 50 分、55℃で 5 分および 65℃で 10 秒それぞれ必要であった。75℃での $MBCO_2$ 処理では、1 秒以内に火落菌および測定した全ての酵素が失活した。官能試験により、比較した 6 種類の清酒（UPS、HTS、MB45、MB55、MB65 および MB75 処理酒）の中で、MB65 処理酒の香味について最も良い評価が得られ、HTS が最も低い評価となった。よって、$MBCO_2$ により清酒を殺菌・酵素失活するための最適処理条件は、通常の加熱処理と同じ 65℃で、通常（3 分）よりも非常に短い 10 秒であることが認められた。

low pressure carbon dioxide microbubbles, sake, α-glucosidase

講演番号：2F28a08
講演日時、会場：3 月 27 日 10:27～ F 校舎 28 会場

非電解質の分配係数に基づいて評価したコメの膨潤特性

Swelling properties of rice evaluated from distribution coefficient of non-electrolytes

○謝 裕基、安達 修二（京大院農）
○Yuki SHA, Shuji ADACHI (Kyoto Univ.)

【目的】食品に含まれる高分子化合物は，デンプンのように電荷を持たないものからタンパク質のように正負の両方の電荷を有するものまで様々である．一方，調味に用いられる呈味成分もスクロース（非電解質）や塩化ナトリウム（強電解質）のように化学的性質は多岐にわたる．さらに，呈味成分の食品への調味の限界は分配平衡によって支配され，その速度過程には拡散が関与する．しかし，食品高分子に対する呈味成分の分配平衡に影響を及ぼす因子については十分に理解されていないと思われる．そこで本研究では，中性高分子であるデンプンを主成分とするコメに対する糖類（非電解質）の分配平衡を測定し，それに基づいてコメの膨潤特性について解析した．

【方法】試料にはウルチ米としてコシヒカリとゆめぴりか，モチ米として羽二重もちときたゆきもちの 2 種類ずつを用い，見かけ密度 ρ_{app} と空隙率 ε_p をそれぞれピクノメトリと加熱乾燥法（105°C，4 日間）によって測定した．分配係数 K_{app} は吸着脱着法によって測定した．すなわち，濃度 C_0 の溶質溶液中に十分な時間浸漬して分配平衡に到達させたコメを，一定量 V_L の蒸留水中に移し替えて溶質を脱着させ，脱着平衡に達した外液を定量して外液中の溶質濃度 C_f を測定した．脱着前後における溶質の物質収支に基づいて，式(1)により K_{app} を算出した．

$$C_f = K_{app}\ \{(W_g/\rho_{app})/V_L\}\cdot(C_0 - C_f) \qquad (1)$$

溶質にはフルクトース，スクロースおよびラフィノースを用いた．フルクトースはヘキソキナーゼ法によって定量した．また，スクロースおよびラフィノースはインベルターゼと α-ガラクトシダーゼにより，完全に加水分解した後に生成するフルクトースを同様にヘキソキナーゼ法によって定量した．

【結果および考察】コシヒカリと羽二重もちの ρ_{app} と ε_p は 5°C から 50°C では温度に依存しなかったが, 60°C では ρ_{app} は低下し，ε_p は上昇した．これらの結果は 60°C でコメが膨潤したことを示すが，50°C 以下の温度では，コメの細胞構造がデンプンの膨潤を抑制した可能性が考えられる．次に，K_{app} は分子量の大きい糖類ほど低下した．そこで，式(2) [1]に基づいて糖類のモル体積 v_S に対する K_{app} の片対数プロットの直線の勾配からコメの膨潤圧 Π を推算した．なお，γ_0 は溶質のゲル内外における活動度係数の比と溶質の分配に及ぼすゲル骨格の体積的な効果を包含したパラメータである．25°C におけるコメの膨潤圧は 6 ~ 8 MPa の範囲にあり，試料のアミロース含量をヨウ素デンプン反応によって測定したところ，アミロース含量の高いウルチ米の膨潤圧はモチ米のそれよりも高い傾向があった．

$$\ln K_{app} = \ln\gamma_0 \ - \ (\Pi v_S/RT) \qquad (2)$$

さらに，コシヒカリと羽二重もちの膨潤圧は 5°C から 50°C では温度に依存せずほぼ一定であった．このことと式(2)からコメに対する低分子化合物の分配平衡に及ぼす温度の影響について考察した．

【文献】[1] S. Adachi *et al*.: *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 3203-3208 (1989).

distribution coefficient, rice, swelling pressure

講演番号：2F28a09
講演日時、会場：3 月 27 日 10:38～ F 校舎 28 会場

デジタル画像処理による小麦麺内部におけるデンプンの老化度の新規測定法

An image-processing method for monitoring the starch retrogradation in wheat flour noodle

○福澤 聡真、中川 究也、安達 修二（京大院農）
○Soma FUKUZAWA, Kyuya NAKAGAWA, Shuji ADACHI (Kyoto Univ.)

[目的]

うどんなどの小麦粉を主原料とする食品の品質には，デンプンの老化が大きな影響を及ぼす．既存の老化度の測定法は，老化過程において比較的緩慢な現象であるアミロペクチンの結晶性の回復に着目したものが多く，初期の老化挙動を定量的に評価する手法は未だ確立されていない．本研究では，老化過程の初期にデンプンの濁度が増大することに着目し，小麦麺内部での初期の老化挙動をデジタル画像処理により定量的に評価することを目的とした．

[材料および方法]

小麦粉（日清製粉）250 g と水 150 g を 20 分間混捏し，パスタマシン（Magica，Bottene）を用いて小麦麺試料（直径 2.5 mm，長さ 80 mm）を作製した．小麦麺試料を 98℃の湯浴で加熱・吸水させたのち密封した．80℃で 3 日間保存して試料内部の水分分布を平滑化させたのち，5℃で保存した．保存した試料の断面をデジタルカメラ（EOS-40D，キヤノン）を用いて撮影し，断面の輝度分布をデジタル画像処理によって測定した．また，各試料についてクリープメータ（Re2-33005S，山電）を用いて破断試験を行った．なお，くさび形プランジャ（No.6，山電）を用い，移動速度 1 mm/s，歪率 99%とした．

[結果および考察]

5℃で保存した小麦麺試料の断面の平均輝度 G_t は，数時間～数日の間に大きく増大する傾向が見られた．平均輝度の初期値 G_0 および平衡値 G_e のいずれも，含水率に依存した．また，輝度の変化速度は含水率の低い試料ほど大きかった．これらは，含水率が低いほどデンプンの老化による構造変化が起こりやすいという従来の報告を支持する．

一方，破断試験では，小麦麺試料のもろさ荷重 W_t が保存初期に大きく増大する傾向が見られた．もろさ荷重の変化率 W_t/W_0 と平均輝度の変化率 G_t/G_0 の間には，とくに保存初期において，強い正の相関が認められた．このことから，本手法によりテクスチャ変化に反映されるような初期の老化の進行を定量的に評価することができると考えられる．

[謝辞]

本研究は，「京都大学・岐阜大学・日清製粉グループ 穀物科学コンソーシアム」の一部として実施した．

Image-processing, Starch retrogradation, Wheat flour noodle

講演番号：2F28a10
講演日時、会場：3 月 27 日 10:49～ F 校舎 28 会場

真空包装したサンマの短波帯加熱

Quick heating a vacuum packed pacific saury by radio frequency

○植村 邦彦、金房 純代、高橋 千栄子、小林 功（農研機構食総研）
○Kunihiko UEMURA, Sumiyo KANAFUSA, Chieko TAKAHASHI, Isao KOBAYASHI (National Food Research Institute, NARO)

【目的】水産物の食用利用は世界中で拡大している。ただし、水産物は鮮度の劣化が早いため、速やかな加工を行う必要がある。また、魚の骨には機能性成分を多く含むことから、軟化させて可食可能とすることは食品加工において、重要な課題である。さらに、取り扱い易さや保存性を考慮した場合、個別に真空包装した状態で加工することが望ましい。そこで、本研究では、サンマを丸ごと真空パックし、短波帯交流を用いて短時間加圧加熱を行うことにより、殺菌、骨の軟化、身肉の品質維持を目指した。
【方法】生のサンマを丸ごと真空包装したものを加圧容器内の 50℃の水道水中に浸し、外から、27MHz 最大出力 10kW の短波帯交流を印加して水道水及びサンマを加熱した。サンマの中心部および周囲の水道水各部の温度を光ファイバー温度計で計測した。短波帯加熱を行い、水道水の温度が 120℃に到達した直後、120℃の水道水を 20℃の水道水に置換することにより冷却した。殺菌の指標菌として、枯草菌の芽胞液を魚体内に注入した。比較として、温度制御したオートクレーブを用いて、従来の加熱を行った。加熱処理後、サンマの身肉の色、水分、硬度および身肉中に残存する枯草菌の菌数を測定した。また、サンマの背骨を取り出し、背骨の硬度を計測した。
【結果および考察】15L,50℃の水道水中に 5℃の真空包装したサンマを 4 匹浸漬し、27MHz，8.5kW の交流を印加したところ、水道水の温度および魚体中心部の温度は約 4 分で同じ 70℃に達し、8 分で魚体中心部の温度が 87℃の水温を上回る 100℃に到達した。18 分で水温が 120℃に到達した時、魚体中心部の温度は 131℃に達した。その後、急冷した加圧容器から魚を取り出した。18 分間短波帯加熱を行ったものと 120℃のオートクレーブ中で 29 分間、44 分間加熱したもので比較した。身肉中の枯草菌芽胞はいずれの処理区とも 4 対数以上低減した。身肉は、短波帯加熱および 29 分間オートクレーブ加熱を行ったものは比較的軟らかい状態であったが、44 分間オートクレーブで加熱したものは、硬化した。これは、長時間の加熱で、身肉から多くのドリップが析出したためだと考えられた。一方、背骨の硬度は、短波帯加熱および 44 分間オートクレーブ加熱したものは軟化したが、29 分間オートクレーブ加熱したものは十分に軟化しなかった。この結果、骨に近い魚体の中心部の温度が一定時間以上間高温となっていたかどうかの違いが表れたものと考えられた。
【謝辞】本研究は、JST 産学共創事業で行われたものである。

Radio Frequency, pacific saury, backbone

講演番号：2F28a11
講演日時、会場：3 月 27 日 11:10～ F 校舎 28 会場

ツノナシオキアミを利用した魚味噌開発

Novel Fermented krill paste from *Euphausia pacifica*

○福田 翼[1]、大関 美咲[1]、藤澤 和貴[1]、及川 克敏[2]、古下 学[1]、芝 恒男[1]、前田 俊道[1]、原田 和樹[1] ([1]水大院食品科学、[2]（株）小野万)

○Tsubasa FUKUDA[1], Misaki OOZEKI[1], Kazuki FUJISAWA[1], Katsutoshi OIKAWA[2], Manabu FURUSHITA[1], Tsuneo SHIBA[1], Toshimichi MAEDA[1], Kazuki HARADA[1] ([1]National Fisheries Univ., [2]Onoman Co., Ltd.)

【目的】ツノナシオキアミ（*Euphausia pacifica*）は、宮城県などの東北地方で漁獲される地域資源である。ツノナシオキアミは、自身の持つプロテアーゼ活性が高く、身崩れなどの品質劣化を引き起こしやすいため、利用法が限られている。したがって、ツノナシオキアミの特性を応用した新たな利用法が求められている。これまでに、オキアミ類のプロテアーゼ活性の高さを利用し、ナンキョクオキアミ（*Euphausia superba*）を用いて魚味噌製造を試みてきた。その結果、塩蔵を主体とした東南アジアにおける伝統的魚味噌製造技術を応用した製法、ならびに米麹、酵母、乳酸菌を主体とした日本の大豆味噌製造技術を応用した製法を確立してきた。そこで本研究では、ツノナシオキアミの新たな利用法の確立を目的とした。

【方法】ツノナシオキアミは、2014 年 2 月から 5 月に気仙沼漁港（宮城県）に水揚げされ、冷凍保存されたものを利用した。伝統的製造法による魚味噌は、ツノナシオキアミを粉砕し、塩蔵する事により作製した。塩分濃度条件は、5-20%とし、これらを基本魚味噌とした。大豆味噌製造法を応用した場合、基本魚味噌に市販米麹、酵母（*Zygosaccharomyces rouxii*）および乳酸菌（*Tetragenococcus halophilus*）を添加した。発酵温度は 30ºC とした。得られた魚味噌は、pH、色差、一般生菌数、酵母数、乳酸菌数、および嗜好性試験により評価を行った。

【結果】伝統的製造法による魚味噌の一般生菌数は、発酵期間中に増加した。また、塩分濃度が高いほど増加は抑制され、塩分濃度 5%では 1.7×10^{6} CFU/g、塩分濃度 20%では 1.3×10^{5} CFU/g であった（発酵 1 ヵ月後）。同様に、pH も発酵期間中に上昇し、塩分濃度が高いほど上昇は抑制された。発酵 1 カ月後の pH は塩分濃度 5%では 7.5、塩分濃度 20%では 6.9 であった。

一方、大豆味噌製造法を応用した魚味噌の一般生菌数は、発酵期間中に減少したが、塩分濃度が高いほど増加し、麹添加割合 25%条件下において、塩分濃度 5%では 2.9×10^{1} CFU/g、塩分濃度 15%では 1.5×10^{3} CFU/g であった（発酵 1 ヵ月後）。この時、pH も塩分濃度が高いほど上昇し、pH は塩分濃度 5%では 5.4、塩分濃度 15%では 6.0 であった。乳酸菌数は塩分濃度 5%では発酵 0.5 ヶ月後では 1.7×10^{5} CFU/g であったが、発酵 1 月後では 2.5×10^{2} CFU/g に減少していた。一方、塩分濃度 15%では発酵 0.5 ヶ月後および発酵 1 ヶ月後では約 1.0×10^{6} CFU/g と同程度であった。

伝統的製造法による魚味噌は水産発酵食品特有の香りが強いものであったが、大豆製造法による魚味噌は大豆味噌特有の香りがするものとなった。

fermented fish paste, krill, traditional fermentation

講演番号：2F28a12
講演日時、会場：3 月 27 日 11:21～ F 校舎 28 会場

担子菌の発酵能による機能性後発酵茶の製造
Production of functional Post-fermented tea by mushroom fermentation
○鮫島 由香、鈴木 扶沙子、山口 真奈、田畑 麻里子、松井 徳光（武庫川女子大食栄）
○Yuka SAMESHIMA, Fusako SUZUKI, Mana YAMAGUCHI, Mariko TABATA, Tokumitsu MATSUI (Mukogawa Univ.)

【目的】後発酵茶は茶葉を蒸した後、カビや乳酸菌等の微生物を作用させてつくられる茶である。茶葉を微生物で発酵させることにより独特の風味を作り出す利点がある。一方で、本研究室では、これまでに担子菌の発酵能を利用し、抗酸化活性・線溶活性が新たに付加されているワインや豆乳等を開発してきた。そこで本研究では、担子菌の発酵能を利用した新たな機能性後発酵茶の開発を目的として、担子菌を用いた後発酵茶の製造を行った。
【方法】市販の番茶に 233 株の担子菌を無菌的に植菌し、25℃、4 週間の静置培養を行い担子菌発酵茶葉を調製した。茶葉抽出液を用いて抗酸化活性は化学発光法、総ポリフェノール量はフォーリンチオカルト法、カテキンは HPLC 法で測定した。また、発酵前後の茶葉抽出液のチロシナーゼ阻害活性を測定し、50%阻害濃度（IC50、mg/ml）を内挿法により求めた。
【結果および考察】本研究に用いた 233 株のうち 188 株は茶葉への生育が認められ、後発酵茶葉の調製が可能であった。これらの茶葉から得られた茶葉抽出液は用いた担子菌により機能性・味・色について様々な特徴を示した。例えば、機能性は認められないがきのこ特有の風味を呈するもの、高い抗酸化活性を持ちきのことは違う独特の味を示すものがあった。得られた茶葉抽出液のうち、特に機能性を示したのはスエヒロタケ(NBRC4928)を用いたスエヒロタケ後発酵茶(SPFt)であった。発酵開始 2 週目から 6 週目にかけて SPFt は発酵させていない茶葉抽出液(コントロール)と比較して高い抗酸化力を示し、ポリフェノールの含有量も約 2 倍となっていた。また、SPFt のカテキン組成もコントロールと大きく異なった。すなわち、カテキン(-C)、エピカテキン(-EC)、エピガロカテキンガレート(-EGCg)、エピカテキンガレート(-ECg)の割合が減少しており、エピガロカテキン(-EGC)の割合が大幅に増加した。測定したカテキン類のトータル量も SPFt の方が多く、コントロールの場合は 0.36%であったのに対し SPFt は 0.52%であった。総ポリフェノール量の増加や SPFt のカテキン類の組成の測定結果から、発酵期間中に-ECg や-EGCg から-EGC や没食子酸(GA)を生成したことが示唆される。また、チロシナーゼ阻害活性においては 19 株が高値を示したが、特に顕著なチロシナーゼ活性阻害を示した後発酵茶はスエヒロタケ（NBRC4928、4929）の 2 株を茶葉に植菌したものであった。IC50 は両者共に 6.25mg/ml であった。以上、茶葉にスエヒロタケを植菌し発酵させることで、高い抗酸化活性や、チロシナーゼ阻害活性を示す後発酵茶の製造が可能であり、担子菌の発酵能により機能性を持つ新たな後発酵茶を製造できる可能性を示唆した。

Post-fermented tea, Mushroom, Catechin

講演番号：2F28a13
講演日時、会場：3 月 27 日 11:32～ F 校舎 28 会場

小麦デンプン発酵過程における鎖長の変化

Changes of wheat starch's chain length in fermentation process

○丸山 慶輔[1]、野口 治子[2]、内野 昌孝[2]、高野 克己[2]([1]東京農大院農・農化、[2]東京農大応生・化学)
○ Keisuke MARUYAMA[1], Haruko NOGUCHI[2], Masataka UCHINO[2], Katsumi TAKANO[2] ([1]Agrichem.,Agr.,Grad.Sch.,Tokyo Univ.Agric., [2]Dept.Appl.Biol.chem.,Fac.Biosci.Tokyo Univ.Agric.)

【目的】

江戸時代中期、関東では小麦粉からグルテンを分離した際に副生する小麦デンプンを長期間発酵させ、それを原料に久寿餅がつくられるようになった。現在では川崎大師、亀戸天神、柴又帝釈天などの門前の名物として親しまれている。久寿餅は歯触りが良く独特の弾力を有し、小麦デンプンゲルにはないテクスチャーを示す。発酵小麦デンプンは、大粒子の一部が崩壊した様子が観察され，未発酵デンプンに比べ糊化特性値の最高粘度が低く、また老化し難い性質を示す。これらの特有の性質は、発酵過程中の酵素作用などによって形成されると推論された。これまでに、発酵液中の糖質分解酵素活性や微生物の存在を報告した。本報告では、久寿餅製造の原料である発酵小麦デンプン構造について検討した。

【方法】

未発酵の原料小麦デンプンと期間の異なる発酵小麦デンプン 4 種(発酵 1 週間、6 ヶ月、1 年、1.5 年)をエタノールおよびアセトンにて洗浄と脱水し風乾させたものを試料として各試験に用いた。各試料の糊化特性値を Rapid Visco Analyzer にて測定した。アミロース含量を Juliano の方法にて測定すると共にヨウ素吸収スペクトルを比較した。また、各試料を Isoamylase(from Pseudomonas sp15284(SIGMA 社製))にて分解し、得られた糖鎖を HPAEC-PAD 法にてアミロペクチン鎖長分析を行い、a 鎖：重合度（DP）5～12、b_1鎖：13～24、b_2鎖：25～36、b_3鎖：37～とした。

【結果】

糊化特性測定の結果、発酵の進行に従いセットバック値は減少し、発酵の前後ではセットバック値が 80%減少した。アミロース含量も同様に小さくなる傾向を示し、最大吸収波長は発酵を経ることで短波長側にシフトした。アミロペクチン鎖長分析の結果、原料小麦デンプンの鎖長の割合は a 鎖が 32%、b_1鎖が 53%、b_2鎖が 13%、b_3鎖が 2%であり、一般的な小麦デンプンと同等の鎖長分布を示した。一方、発酵小麦デンプンでは a 鎖比率が原料小麦デンプンよりも小さい値を示した。これらの結果より、発酵小麦デンプンはアミラーゼの作用により糖鎖構造の一部が変化し、独特の糊化粘度特性値およびゲル特性を示すことが推察された。

Starch, Fermentation, Retrogradation

講演番号：2F28a14
講演日時、会場：3 月 27 日 11:43～ F 校舎 28 会場

米粉バッター攪拌中の成分について

Ingredient behavior during a rice flour batter stirring.

○奥西 智哉、岸根 雅宏（農研機構・食総研）
○Tomoya OKUNISHI, Masahiro KISHINE (NARO-NFRI)

【目的】

グルテンを用いない米粉パン製造は米粉バッタータイプが近年の開発事例では多い。米粉単独では十分な製パン性が得られない場合が多く、改良材が添加される。これらの場合、製パンに影響を与える要因として着目されるのは、バッターの粘度あるいは糖・タンパク質の挙動が挙げられる。これらの要因がそれぞれどのように関連しているのかを明らかにするために、米粉バッターを作成し、各種分析を行ったので、報告する。

【実験方法】

原料米粉は市販の米粉パン用米粉および各種米粉を用いた。ヒノヒカリ、低アミロース米であるミルキークイン、高アミロース米であるモミロマンおよびモチ品種のマンゲツモチを精米したのち、湿式気流粉砕、乾式気流粉砕あるいはロール粉砕したものである。

これらの米粉 15ｇにミリ Q 水 15mL を加え攪拌した後、RVA4500 にて一定速度（800rpm）で攪拌し続けたときの粘度を測定した。攪拌後の米粉バッター2ｇにミリ Q 水 4mL およびジクロロメタン 10mL を加えボルテックスした後、遠心分離した上清をイオンクロマトグラム（50mM-NaOH、isoclatic）により糖含量を測定した。同じ上清を 10 倍濃縮したものをアミノ酸分析機 JCL500/V2 にて各種アミノ酸含量を測定した。米粉バッターに 20 倍量の 2%-SDS;5%-2ME を加えたものを SDS-PAGE で解析した。また、米粉バッターを乾燥した後、金スパッタリングしたものを低真空走査型電子顕微鏡（SEM）5600LV にて観察した。

【実験結果】

市販米粉を用いた場合、米粉バッターを攪拌すると温度 45 度では粘度上昇が見られたが、30 度では見られなかった。粘度上昇は少なくとも 120 分までは直線的に起こり、バッター中のグルコース含量上昇をともなっていた。同時に米デンプン粒の角張った部分が丸みを帯び、壁面にくぼみが見られるものもあった。攪拌中にデンプン分解が起こっていることがわかった。アミノ酸含量は大きな違いが見られなかった。タンパク質分析において、粘度上昇した米粉バッターでは比較的高分子のタンパク質が検出されたが、これは試験前の米粉を用いた同様の分析では見られなかった。

各種米粉を用いた場合では、粘度上昇までの現象については数値の大小はあるものの、米粉バッターの挙動について市販米粉と大きく異なる部分は見られていない。

rice flour, batter, viscosity

講演番号：2F28a15
講演日時、会場：3 月 27 日 11:54～ F 校舎 28 会場

米内在性プルラナーゼの米粒内分布

Distribution of the pullulanase in rice grains of different cultivars

○大倉 哲也[1]、津久井 信也[1,2]、露久保 美夏[1,3]、浜守 杏奈[3]、香西 みどり[3]（[1]食総研、[2]筑波大院生物資源、[3]お茶大院人間文化）
○Tetsuya OOKURA[1], Shinya TSUKUI[1,2], MIka TSUYUKUBO[1,3], Anna HAMAMORI[3], Midori KASAI[3] ([1]NFRI, [2]Tsukuba Univ., [3]Ochanomizu Univ.)

【目的】炊飯中の還元糖の増加は飯の食味に影響を与えるが、デンプン分解酵素の米粒内の局在については不明な点が多い。演者らはこれまで分解酵素であるα及びβアミラーゼ、αグルコシダーゼについて、コシヒカリを用いて米粒内局在について明らかにしてきた[1)]。本研究では異なる品種の生米粒において、炊飯時の還元糖生成に寄与するデンプン分解酵素の内、グルコースのα1，6結合を切断するプルラナーゼの分布を比較することを目的とした。
【方法】南魚沼産コシヒカリ・滋賀県産日本晴より，5画分（玄米を100%とし、搗精部位層 100-90%、90-80%、80-70%、70-0%）の米粉を調製し、リン酸バッファーで懸濁後、TCAを用いてタンパク質を回収した。得られたタンパク質はSDS-PAGEで分離、ニトロセルロース膜に転写後、プルラナーゼに対するポリクローナル抗体を用いて解析した。コシヒカリ・日本晴玄米を４％パラホルムアルデヒドで固定して、川本法により凍結切片を作製し、ポリクローナル抗体を用いて蛍光免疫染色を行い、オールインワン顕微鏡BZ-8000（キーエンス）にて観察し、得られた画像をphotoshopで加工した。
【結果】コシヒカリ・日本晴においては、プルラナーゼは内層部（70-0%画分）に多く存在し、外層部に近づくほど少なく、糠層（100-90%画分）では明瞭な特異的バンドが検出されなかった。また、免疫染色結果から、プルラナーゼは胚乳の多い内層部とアリュロン層の一部に分布しており、上記イムノブロットの結果と一致していた。さらに、強拡大画像において胚乳アミロプラスト内のデンプン粒の周囲に分布していた。以上の結果から、プルラナーゼはコシヒカリ・日本晴の米粒内層部の胚乳に主に分布し、その中のアミロプラスト内デンプン粒の周囲に主に局在していることが明らかとなった。

[1)] M. Tsuyukubo *et al., Food Sci. Technol. Res.* **16**(6), 523-530, 2010

rice, antibody, starch

講演番号：2F28p01
講演日時、会場：3 月 27 日 14:00～ F 校舎 28 会場

メイラード反応を用いて得られたマルトースおよびリボース修飾鶏筋原線維タンパク質の機能改変
Functional Alteration of Chicken Myofibrillar Protein Glycated with Maltose or Ribose through the Maillard Reaction

○梅本 保奈美[1]、佐伯 宏樹[2]、西村 公雄[1] ([1]同志社女子大・食栄、[2]北大院・水)
○Honami UMEMOTO[1], Hiroki SAEKI[2], Kimio NISHIMURA[1] ([1]Doshisha Women's College, [2]Hokkaido Univ. Graduate School of Fisheries Science)

【目的】すでに演者らは，鶏筋原線維(Mf)タンパク質にマルトースをメイラード反応により修飾させると，低イオン強度溶液への溶解性や熱安定性およびスーパーオキシドアニオンラジカル(O_2^-)に対する抗酸化能を獲得することを認めている。[1,2] さらに，この抗酸化能がタンパク質の一次構造か特定のペプチド配列によるものであることも突き止めた。[3] 今回，ランダムセントロイド最適化(RCO)法を用いて，低イオン強度に対する溶解性を保持したままで，ヒドロキシラジカル(・OH)に対する抗酸化能をできるだけ強く発揮するマルトース修飾鶏 Mf タンパク質の調製条件を検討し，その加熱ゲル形成能および抗酸化能の保持につき調べた。また，マルトースの代わりに，より反応性に富んだ五炭糖であるリボースを用いて，機能改変を伴った糖化鶏 Mf タンパク質調製の可能性についても検討を行った。
【方法】マルトース修飾鶏 Mf タンパク質の調製条件には，温度(40-70℃)，相対湿度(25-45%)，反応時間(24-48h)，および Mf に対するマルトース重量比(2-8 倍)の 4 要素を選択した。最適化の評価は，0.1M NaCl 溶液に対して約 60%の溶解度を保持することを第一義とし，ルミノール化学発光法を用いて・OH 消去能(HORAC)を測定することで行った。得られた最適条件下で調製したマルトース鶏 Mf タンパク質を 90℃下で加熱し，そのゲル形成性および HORAC を観察した。一方，リボース修飾鶏 Mf タンパク質においては, Mf に対するリボース重量比を 12 倍として, 温度 40℃, 相対湿度 40%, 反応時間(1/4，1/2，1，2，4，8h)下で反応を行った。0.1M NaCl 溶液への溶解性を追った結果，反応時間 4h 後に得られた糖化鶏 Mf タンパク質の 50℃，2h 加熱に対する熱安定性および O_2^-および・OH への抗酸化能の獲得につき検討を行った。なお，両実験において溶解度の測定には正確を期するためケルダール法を用いた。
【結果】RCO 法にて得た最適調製条件(温度 57.4℃，相対湿度 37.3%，反応時間 37.2h，重量比 5.4)下で調製したマルトース修飾鶏 Mf タンパク質は, 約 4μmol of trolox および約 8μmol of gallic acid /g of protein の HORAC を示した。また，90℃，30 分にて加熱ゲルを形成した。そのゲルは抗酸化能を保持していた(約 2μmol of trolox 及び約 4μmol of gallic acid /g of protein の HORAC)。リボース修飾鶏 Mf タンパク質は，反応時間 4h の時，0.1M NaCl 溶液への溶解度を約 60%保持していた。この時，50℃に対する熱安定性，および抗酸化能も獲得していた。

1) Nishimura *et al.*, *Food Sci. Technol. Res.*, **17**, 69-75, 2011. 2) Nishimura *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **75**, 247-254, 2011. 3) Isono *et al.*, *J. Home Econ. Jpn.*, **63**, 461-467, 2012.

Maillard Reaction, Antioxidative Ability, Functional Alteration

講演番号：2F28p02
講演日時、会場：3 月 27 日 14:11～ F 校舎 28 会場

NMR を用いた黒ニンニクの熟成過程の解析

Comprehensive NMR and multivariate statistical analysis of compositional changes of black garlic during thermal processing

○小谷 良徳[1]、梁 庭輔[1]、魏 菲菲[1]、盧 翌[1]、中田 光彦[2]、宮川 拓也[1]、田之倉 優[1]([1]東大院・農生科、[2]株式会社サラダコスモ)
○Yoshinori KODANI[1], Tingfu LIANG[1], Feifei WEI[1], Yi LU[1], Mitsuhiko NAKADA[2], Takuya MIYAKAWA[1], Masaru TANOKURA[1] ([1]Grad. Sch. Agr. Life Sci., Univ. Tokyo, [2]Salad Cosmo Co., Ltd.)

【目的】ニンニク（*Allium sativum L.*）は昔からアジアで食経験の多い植物であり、刺激的な匂いがあるため、食品の香料としても広く用いられている。黒ニンニクは、何も添加しない状態でニンニクを高い温度と一定の湿度で一か月程度熟成させた食品であり、ニンニクと比べて刺激的な匂いが減少し、加熱調理なしに食べられ、日本や韓国では新しい加工食品として知られている。黒ニンニクの熟成に伴う機能性の向上に関しては、抗酸化力の上昇、肥満の改善や免疫機能改善などの効果が報告されている。核磁気共鳴（Nuclear Magnetic Resonance; NMR）は近年食品の状態分析によく用いられている手法であり、食品成分を分離せずに非破壊的に測定を行い、そのまま代謝物の成分と状態を確認することができる。本研究では黒ニンニクの成分分析及びその熟成過程の成分変化を NMR で解析した。
【方法】重水で 10%に調製したジメチルスルホキシド（DMSO-d_6）を用いて、黒ニンニクサンプルの成分を室温で一時間抽出した。抽出液に内部標準物質を加え、一次元・二次元 NMR スペクトルを測定した。これらのデータを用いて、黒ニンニク抽出液の成分を帰属した。また、異なる熟成過程の黒ニンニクの定量 ^{1}H NMR スペクトルを測定し、熟成過程の成分変化を観測するとともに、多変量解析により、各熟成段階の黒ニンニクサンプルの違いを明らかにした。
【結果】一次元・二次元 NMR スペクトルを用いて、黒ニンニク抽出液中の計 38 種類の成分を帰属することができた。黒ニンニクの成分分析によって得られた、各成分の組成と濃度を生ニンニクと比較することにより、黒ニンニクの栄養と味などの特性を説明することができた。例えば、糖類の増加は黒ニンニクの甘味の他、熟成に伴う熱による褐変にも関与していると考えられた。また、各加工段階の黒ニンニク抽出液の NMR スペクトルを用いて、熟成過程の黒ニンニクの代謝物変化を追跡した。生ニンニクに多く含まれるスクロースは熟成過程で徐々に分解され、単糖のグルコースとフルクトースの濃度上昇が観測された。この成分変化により、黒ニンニクの甘味が増加すると推測した。また、ほとんどのアミノ酸は熟成初期で増加し、その後は減少していることが観測された。アミノ酸の熟成過程初期の増加は、酵素の働きによりタンパク質の分解が促進されたためと考えられ、熟成過程後期での減少はメイラード反応により、アミノ酸と糖類が重合するためと考えられた。その他、ニンニク特有の匂い成分であるアリシンが経時的に減少し、それによって黒ニンニクでは刺激的な匂いが低下したことを推定した。さらに我々は主成分分析を用いて、熟成過程の各段階の識別モデルを構築し、特徴的なマーカー成分を解析した。

black garlic, thermal processing, Nuclear Magnetic Resonance

講演番号：2F28p03
講演日時、会場：3 月 27 日 14:22～ F 校舎 28 会場

埼玉県産小麦「さとのそら」と「農林 61 号」のストリーム粉のグルテンタンパク質組成の比較

Comparison of the gluten protein composition of flour mill streams obtained from wheat "Satonosora" and "Nourin61" cultivated in Saitama prefecture

○小島 登貴子[1]、成澤 朋之[1]、仲島 日出男[2]、杉山 健二郎[3]、山田 昌治[3]([1]埼玉産技セ北部、[2]埼玉産技セ、[3]工学院大工)
○ Tokiko KOJIMA[1], Tomoyuki NARISAWA[1], Hideo NAKAJIMA[2], Kenjiro SUGIYAMA[3], Masaharu YAMADA[3] ([1]SAITEC NL, [2]SAITEC, [3]Kogakuin Univ.)

【目的】
国内で広く作られてきた小麦「農林61号」は育種から50年以上経過して、耐病性等の問題から単位面積当たりの収量が落ち、北関東４県を中心に「さとのそら」への移行が進められている。しかしながら、この品種の移行に伴い、製麺業者等の実需者からは製麺性や小麦粉の風味の違いが指摘されている。製麺性向上に関して、当所でのこれまでの研究から、SDS不溶性グルテニンの量を指標とした複数品種のブレンドが有効であることが示された[1)]。本研究では、製粉工程中で得られるストリーム粉に注目して、埼玉県で栽培されたH25年産の「農林61号」と「さとのそら」の２品種のタンパク質の組成の違いを調べ、製粉方法の最適化のための基礎データとすることを目的とした。

【方法】
埼玉県内で栽培された「農林61号」「さとのそら」について、ビューラー社ラボラトリーミルを用いて挽砕し、ストリーム粉（１Ｂ、２Ｂ、３Ｂ、１M、２M、３M）を得た。各画分の小麦タンパク質の成分（SDS不溶性画分、SDS可溶性画分、グリアジン、他）をSE-HPLC法[2)]により調べた。

【結果】
ストリーム粉のタンパク質含有量は３Ｂ>３M>２M, ２Ｂ>１M>１Ｂの順に多く、３Ｂと１Ｂでは、2.5～3.7%の違いがあった。製麺の指標となる SDS 不溶性グルテニンの量は粉のタンパク質含有量との相関が高かったが、「農林 61 号」と比較して、「さとのそら」ではいずれのストリーム粉でも低く、「さとのそら」の製麺性向上には他品種の小麦粉のブレンドが効果的であると推察された。

1) 成澤朋之ら：県産小麦の新規ブレンド粉の開発，埼玉産技セ研究報告，11(2013) 1
2) 仲島日出男ら：小麦タンパク質成分と製麺性に関する研究，埼玉工技セ研究報告，3(2001)261

flour mill streams, gluten, protein composition

講演番号：2F28p04
講演日時、会場：3 月 27 日 14:33～ F 校舎 28 会場

小麦粉生地タンパク質のジスルフィド結合形成に対するアスコルビン酸と PDI の関与

Relationship to ascorbic acid and PDI on the disulfide bond formation in flour dough protein

○樋口 貴俊[1]、岡 大貴[2]、辻井 良政[3]、野口 治子[3]、野口 智弘[2]、高野 克己[3]([1]東京農大院農・農化、[2]東京農大応生・食加技セ、[3]東京農大応生・化学)
○ Takatoshi HIGUCHI[1], Daiki OKA[2], Yoshimasa TSUJII[3], Haruko NOGUCHI[3], Tomohiro NOGUCHI[2], Katsumi TAKANO[3] ([1]Agrichem.,Agr.,Grad.Sch.,Tokyo Univ.Agric., [2]Fac.Biosci.,FPC,Tokyo Univ.Agric., [3]Dept.Appl.Biol.chem.,Fac.Biosci.Tokyo Univ.Agric.)

【目的】

小麦粉生地の加工特性にジスルフィド（SS）結合の形成が大きな影響を与えることが知られ、製パンにおいてはアスコルビン酸（AA）が生地改良剤として広く用いられている。AA は小麦粉生地中でデヒドロアスコルビン酸（DHA）に酸化され、グルテンの SS 結合形成を促進すると言われている。一方で、我々は小麦粉生地中の SS 結合形成にプロテインジスルフィドイソメラーゼ（PDI）およびその酸化再生に関与するエンドプラズミックレティキュラムオキシドレダクターゼ 1 （ERO1）が関与していること、また PDI の酸化再生に DHA が関与することを報告している。そこで、製パン過程における SS 結合形成に対する AA および PDI の影響を解析するため、AA および DHA 添加生地中の SS 結合形成量測定および製パン性試験を行い、小麦粉内在 PDI と AA との相互作用性を検討した。

【方法】

製パンは、強力粉（カメリヤ；日清製粉）200g、生イースト 8g、砂糖 10g、塩 4g、ショートニング 8g、純水（4℃）137g に、AA または DHA を 10ppm 添加し、ストレート法にて行った。パンの品質評価は 3D Laser Volume Measurement（ASTEX 社製）により体積、重さ、比容積を測定し、2cm 幅にスライスしたパンを万能物性測定器（インストロン社製）にてクラムの中心部の硬さ（N）および凝集性を測定した。また、上記と同様の手順にて調製した生地の一次発酵(27℃、75%RH、2 時間)後の SS 結合形成量を測定した。SS 結合形成量測定は、一次発酵後の生地を凍結乾燥、破砕後、ヘキサンにて脱脂し、0.1M 酢酸溶液にて得られた抽出液を試料とした。この試料液中の遊離 SH 基量を NBD-Cl 法にて測定し、SS 結合形成量を算出した。さらに強力粉より 0.1M 酢酸溶液にて抽出した小麦粉タンパク質に、AA または DHA を作用させ、同様に SS 結合形成量を算出した。

【結果】

AA または DHA を 10ppm 添加したパンの比容積は無添加に比べそれぞれ有意に増加したが、AA と DHA 間での有意な差異はみなれなかった。また、硬さおよび凝集性は無添加区と両添加区に有意な差異はみられなかった。一次発酵後の生地より 0.1M 酢酸溶液にて抽出したタンパク質溶液中の SS 結合形成量を算出したところ、AA または DHA を 10ppm 添加することで無添加に比べ、SS 結合形成量増加が増加した。さらに、小麦粉に 0.1M 酢酸溶液にて抽出したタンパク質に対し、AA または DHA を添加したところ、SS 結合形成はみられなかった。

protein disulfide isomerase, ascorbic acid, bread

講演番号：2F28p05
講演日時、会場：3 月 27 日 14:44～ F 校舎 28 会場

大豆ホエーの SS 結合形成能について

About SS bond forming ability of soybean whey

○金井 大樹[1]、野口 治子[2]、高野 克己[2] ([1]東京農大院農・農化、[2]東京農大応生・化学)
○Daiki KANAI[1], Haruko NOGUCHI[2], Katsumi TAKANO[2] ([1]Agrichem.,Agr.,Grad.Sch.,Tokyo Univ.Agric, [2]Dept.Appl.Biol.chem.,Fac.Biosci.Tokyo Univ.Agric.)

【目的】

大豆ホエーは脱脂大豆から分離大豆タンパク質を製造する際の副産物で、大豆ホエー中にはタンパク質 7～9%、多糖類、ミネラルなどが含有される。しかし、抗栄養因子のトリプシンインヒビターが存在することから、その多くが有効に利用されていない。これまで大豆ホエーの有効利用について様々な研究がされており、現在も様々な取り組みがなされている。当研究室では、大豆ホエーの有効利用について検討を行い、大豆ホエーの添加によって低品質すり身の加熱ゲル形成性が向上すること、その効果はホエー中のトリプシンインヒビターによってすり身中のプロテアーゼのタンパク質分解が阻害されること、プロテアーゼ活性量の高いすり身ほど効果が大きいことを報告している。また、同ホエーの添加によって、すり身の加熱ゲル中の SS 結合量が増加することを見出した。本研究では、大豆ホエーによる SS 結合量の増加作用について検討を行った。

【方法】

大豆ホエーは、日清オイリオ社より分与されたものを用いた。SS 結合形成能はオボムコイド（卵白由来、SIGMA 社製）を還元変性させたものを基質とし、NBD-Cl 法にて SS 結合形成量を測定した。さらに、他起源のタンパク質にも SS 結合を導入するかどうか確認するために還元変性させた分離大豆タンパク質（ソルピー4000H、日清オイリオ社製）を基質として試験を行った。反応温度は 20,40,60,80,100℃の各温度、反応時間は 3 時間で行った。また、反応後に沈殿が生じるサンプルについては、遠心分離（3000rpm,10min,4℃）により得られた上澄液を NBD-Cl 法に供した。

【結果】

還元変性オボムコイドに大豆ホエーを作用させたところ、無添加のものと比べて SS 結合形成量がタンパク質 1g 当たり、0.4nmol 増加していることが確認され、分離大豆タンパク質を基質とした際にも SS 結合の増加が確認できた。大豆ホエーの両基質に対する SS 結合量は 20℃においても増加が確認できたことから、大豆ホエー中に SS 結合を促進する機能を示す何らかの物質が存在することが推察された。

Soybean whey, SS bond formation, Food processing

講演番号：2F28p06
講演日時、会場：3 月 27 日 15:05～ F 校舎 28 会場

生乳や伝統食品由来のプロバイオティクスの単離と機能性評価

Isolation and characterization of probiotic bacteria from raw milk and traditional food

○高屋 朋彰、根来 雄哉、布川 玲奈（小山高専物質）
○Tomoaki KOUYA, Yuya NEGORO, Reina NUNOKAWA (NIT, Oyama Col.)

【背景・目的】近年，少子高齢化問題，生活習慣病の増加，総人口・生産年齢人口の減少といった人口問題に対し，予防医学を利用した健康づくりが注目されている．一例として，有益微生物（乳酸菌・プロピオン酸菌・ビフィズス菌など）を用いて健康増進・疾病予防を行うプロバイオティクスやプレバイオティクスが知られている．本研究では，乳製品や伝統食品由来プロバイオティクス候補株の単離およびその機能性評価について検討を行った．

【実験方法】本研究では菌の分離源として，ウシ生乳や漬け物などを用いた．単離用の培地として，MRS 培地（乳酸菌用）および YEL 培地（プロピオン酸菌用）を用いた．各寒天培地には，アジ化ナトリウム（終濃度：10 mg/L），シクロヘキシミド（終濃度：10 mg/L），および $CaCO_3$（終濃度：5 g/L）を添加した．30℃で 3~7 日間の嫌気培養を行った後，増殖したコロニーの周囲が酸の生成によって透明化している微生物を釣菌して各液体培地に播種し，嫌気培養を行った．得られた培養液を再度寒天培地に塗布し，候補株の単離を確認した．

プロバイオティクス候補株の選別は，カタラーゼ活性，グルコースを炭素源とした有機酸生産性，およびコロニー周囲の $CaCO_3$ の可溶化を評価した．また，選別した候補株に対してラクトースの資化性を評価した．各有機酸濃度は，Shim Pack SCR-102H カラム（島津製作所）と電気伝導度検出器（島津製作所）を備えた HPLC を用いて測定した．選別した候補株は，16S rRNA 遺伝子（16S rDNA）解析による同定を行った．

【結果および考察】サンプルから，乳酸菌候補株 15 菌株およびプロピオン酸菌候補株 8 菌株を単離した．特に，乳酸菌候補株は *Lactobacillus casei*，*Lactococcus lactis*，および *Leuconostoc pseudomesenteroides* の塩基配列と高い相同性（99～100%）を示すことが明らかになった．乳製品の発酵に利用可能なラクトース資化性乳酸菌として，*Lactococcus lactis* と高い相同性を示す ONCT 6002 株を選別した．ONCT 6002 株の冷蔵・冷凍耐性を評価した結果，いずれの条件下においても，生菌数は 28 日間，一定数を維持できることが明らかとなった．

probiotics, lactic acid bacteria, propionic acid bacteria

講演番号：2F28p07
講演日時、会場：3 月 27 日 15:16～ F 校舎 28 会場

冷凍保存が小麦麺中のグルテンに及ぼす影響

Effects of frozen storage on gluten in wheat noodle

○鳥井 昭良[1]、松宮 健太郎[1]、林 由佳子[1]、平内 亨[2]、入江 謙太朗[2]、松村 康生[1] ([1]京大院・農、[2](株)日清製粉グループ本社・基礎研究所)
○Akira TORII[1], Kentaro MATSUMIYA[1], Yukako HAYASHI[1], Toru HIRAUCHI[2], Kentaro IRIE[2], Yasuki MATSUMURA[1] ([1]Grad. Sch. of Agric., Kyoto Univ., [2]Research Center for Basic Science, Nisshin Seifun Group Inc.)

【背景と目的】冷凍うどんをはじめとした冷凍麺は長期の冷凍保存や保存中の温度変化などにより外観や食感が変化することがある。そのメカニズムについては不明な部分が多いが、我々はこれまでの研究で冷凍保存中の氷結晶成長による麺構造の破壊と澱粉の老化がそれらの変化に関与しており、加熱解凍によって構造の大部分が復元することで食感も回復するということを明らかにした[1)]。一方で麺の物性にはグルテンの性質も密接に関わっているため、本研究では茹でる際に熱変性した麺中のグルテンがさらに凍結・融解を経てどのように変化するのかについて明らかにすることを目的とした。
【材料と方法】うどん用中力粉に加水率 30%で純水を加えて押出し式パスタマシンで製麺し、茹で上げ後に-40℃で急速凍結したものを-10℃で 2 時間、0℃で 2 時間の温度サイクル(加速劣化処理) に 3 回かけてから流水または沸騰水で解凍したものをサンプルとし、分析にはそれらを凍結乾燥して粉砕したものを供試した(比較のために中力粉と生麺および凍結前の茹で麺についても粉末試料にして分析した)。2% SDS によるタンパク質抽出率の測定と遊離 SH 基の定量および SDS-PAGE によりグルテンの溶解性と重合度の変化を評価した。また、0.1 M 酢酸で抽出したタンパク質のゼータ電位を測定して表面の荷電状態を評価し、粉末試料の紫外蛍光スペクトルを測定してトリプトファン残基の存在状態の変化を解析した。さらに麺の凍結切片を作製して疎水性蛍光プローブの 1, 8-ANS で標識した後に共焦点レーザー顕微鏡で観察し、同一条件下で撮影した画像のヒストグラムから積分蛍光強度を算出することで麺の部位ごとのグルテンの表面疎水性の定量化を試みた。
【結果と考察】凍結前の茹で麺は生麺に比べて遊離 SH 基が減少してタンパク質の抽出率が大幅に低下し、ゼータ電位の値が 0 に近づいたことから、熱変性によりグルテンの重合と疎水化が起きていることが確認された。凍結・融解を経ると遊離 SH 基が減少する傾向が見られたが、抽出率および電気泳動のバンドパターンに大きな変化は見られなかった。しかしながら、流水解凍サンプルでは凍結前に比べてゼータ電位の値およびトリプトファン残基に由来する自家蛍光が中力粉や生麺に近づいたことから、熱変性したタンパク質の一部が構造変化を伴って親水化している可能性が示唆された。さらに、顕微鏡画像から算出した ANS の蛍光強度が、冷凍を経ると氷結晶成長が顕著な麺の外縁部では上昇したのに対し、麺の内部では中心部に近いほど逆に低下したことから、グルテンの表面疎水性の変化には含水率も影響していると考えられた。一方で、加熱解凍サンプルではこれらの値はすべて凍結前に近い状態まで回復する傾向が見られた。以上より、冷凍保存によるグルテンの立体構造および疎水性相互作用の変化が小麦麺の食感の変化に寄与している可能性が示唆された。

1) 日本食品科学工学会第 61 回大会講演集, p.104　3Aa7

gluten, wheat noodle, frozen storage

講演番号：2F28p08
講演日時、会場：3 月 27 日 15:27～ F 校舎 28 会場

XRD による冷凍小麦麺の澱粉再結晶化評価に関する実験的検討

Experimental consideration of starch recrystallization in frozen noodle by XRD

○西尾 幸子、山田 夕梨恵、西津 貴久、勝野 那嘉子、後藤 清和（岐阜大・応生）
○Sachiko NISHIO, Yurie YAMADA, Takahisa NISHIZU, Nakako KATSUNO, Kiyokazu GOTO (Gifu Univ.)

【目的】小麦麺の冷凍保管中の品質変化の要因の一つとして，澱粉の再結晶化が考えられている。当研究室では，X線回折（ＸＲＤ）により澱粉の再結晶化の測定を行い，17° ピークが冷凍操作により増強することを確認している。しかし，この測定では前処理として，試料を凍結乾燥および調湿する必要があり，これまで見られた 17° ピークの増強は，この前処理による影響を含んでいることを否定できない。本研究では，試料の調湿がＸＲＤ測定に及ぼす影響と，冷凍条件下でのＸＲＤ測定により，冷凍保管中の澱粉の再結晶化について検討した。

【実験方法】実験試料として，小麦澱粉，加工澱粉，グルテンの配合割合を変えた 5 種類のモデル麺，および中力粉を用いて調製した麺を用いた。麺試料調製後は，-30℃で一定期間冷凍保管，または -10℃から 0℃の間で温度を上下させる劣化加速条件での保管を行った。各試料を凍結乾燥し，粉砕機によって粉砕した試料を，25℃下で種々飽和塩溶液の入ったデシケーター内で一定期間調湿した。ＸＲＤデータのデコンボリューション処理により得られた 17° ピークに注目し，最大ピーク 20° との相対値である 17°/20° 値により澱粉の再結晶化評価を行った。また，冷凍保管中の澱粉の再結晶化の検討として，キャピラリー内の澱粉ゲルを冷凍し，解凍することなく冷凍条件下でＸＲＤ測定（あいちシンクロトロン光センター，ビームライン：BL5S2）を行った。

【結果・考察】試料水分が高いほどピークが明瞭になり，ピーク高さによる再結晶化の評価はしやすくなるが，調湿時の変質の可能性が考えられる。また，測定時の試料水分を統一することで，測定精度の向上が期待できることが明らかになった。冷凍条件下でのＸＲＤ測定の結果，劣化加速条件で保管した澱粉ゲルにおいて， 17° ピーク（λ=1Å のシンクロトロン光では 11° ピーク）の増強が認められたことから，冷凍保管中に澱粉の再結晶化が生じている可能性があると考えられる。

X-ray diffraction, starch recrystallization, frozen noodle

講演番号：2F28p09
講演日時、会場：3 月 27 日 15:38～ F 校舎 28 会場

大豆粉の利用による冷凍耐性生地の品質改善と機能解析

Improvement of frozen-tolerance for the fermented dough by using soybean flour, and kinetic analysis of frozen-tolerance

○蓑島 良一[1]、伊藤 昌也[2]、椎葉 究[3]、会田 真人[3]、田村 翔[2]、村勢 則郎[3] ([1]日清オイリオグループ、[2]東京電機大学理工学部、[3]東京電機大学理工学研究科)
○Ryoichi MINOSHIMA[1], Masaya ITO[2], Kiwamu SHIIBA[3], Masato AIDA[3], Syou TAMURA[2], Norio MURASE[3] ([1]Nisshin Oillio Group Ltd., [2]Tokyo Denki Univ. School of Science and Engineering, [3]Tokyo Denki Univ. Department of Science and Engineering)

（目的）焼立てパンに対する消費者ニーズと製パン業者の生産効率化から、冷凍パン生地製法の導入が進んできているが、冷凍保存中、酵母菌体からのグルタチオンなどの低分子還元物質の漏出や冷凍障害によるグルテンタンパク質やデンプン構造の変性などにより発酵生地のガス保持力の低下、パンボリュームの低下および味、色、香の劣化が生じる。そのため、冷凍耐性酵母の開発や製法の改良がおこなわれてきた。その一つの解決策として、細胞内凍結防止剤（クリオプロテクタント）があり、トレハロースやグリセロール，プロリンなど添加効果が報告されている。また、大豆ペプチドの冷凍障害防止効果についての報告もある。本研究では、冷凍障害が最も起こりやすい食パンのホイロ発酵後（焼成前）成型冷凍生地において、冷凍耐性を向上させる方法とそのメカニズムについて検討した。
（方法）
・試験パン強力小麦粉（日清製粉社製商品名オーション）100g に、生酵母（オリエンタル酵母工業社製 VF ｲｰｽﾄ）２ｇ、砂糖 5g、塩 2g、スキムミルク 2g、油脂 4g、水 65～68ml コントロールとして、ベタイン、大豆粉（日清オイリオグループ社製モチフレッシュ）を 0.2～2%添加して、ミキソグラフによりミキシング特性を比較し、また同機による生地形成（トルク最大電流値を示した時間から 3 分間のミキシング時間）→90 分間一次発酵→2 分割→成型箱詰→ホイロ発酵した。一方は焼成し、一方はマイナス 20℃で 1 週間保存後焼成した。それぞれの焼成後、ボリュームやその他製パン性を評価した。
・それぞれの配合から作成した生地の示差走査熱量測定（DSC）による（-70℃～100℃）温度帯でのエネルギー収支測定および低温顕微鏡による観察を行った。
・各パン生地サンプルからオズボーン分画を行い、分画区分のタンパク質成分を比較した。
（結果）
・生大豆粉添加が冷凍耐性を付与することを確認したが、熱処理することでその効果が失われることから、生大豆粉中の酵素が有効であり、また、ベタインの添加により相乗効果があることを見出した。また、ミキシングパターンとの相関性も認められた。
・DSC 解析から、冷凍中の吸熱反応において、生大豆粉およびベタイン添加区とその無添加区生地で、エネルギー吸熱パターンが異なること、また、低温顕微鏡において凍結温度と凍結形成様式が異なることが観察された。
・オズボーン分画から凍結耐性と非耐性生地中のグロブリン画分のタンパク構成に違いがあった。

Frozen tolerance, Soybean flour

講演番号：2F28p10
講演日時、会場：3 月 27 日 15:49～ F 校舎 28 会場

凍結融解によるマヨネーズの不安定化とポリグリセリン脂肪酸エステルの影響
Destabilization of mayonnaise by freeze-thawing and protective effects of polyglycerol-fatty-acid ester

○加藤 康暉[1]、松宮 健太郎[1]、林 由佳子[1]、佐藤 健一[2]、古川 周平[2]、松村 康生[1]（[1]京大院農、[2]オリエンタル酵母工業（株））
○ Koki KATO[1], Kentaro MATSUMIYA[1], Yukako HAYASHI[1], Kenichi SATO[2], Syuhei FURUKAWA[2], Yasuki MATSUMURA[1] ([1]Kyoto Univ., [2]ORIENTAL YEAST CO.,LTD)

【目的】マヨネーズは家庭用として消費されるだけでなく、幅広く加工食品にも用いられている。マヨネーズを含む加工食品は、しばしば冷凍状態で保存・流通される。マヨネーズは凍結融解によって乳化破壊や油の分離（不安定化）を生じるが、そのメカニズムは詳細には解明されていない。本研究では、マヨネーズの凍結融解による不安定化のメカニズム解明を目的として、油の種類や凍結融解条件がマヨネーズの安定性や油相・水相の結晶化挙動に与える影響を検討した。また、ポリグリセリン脂肪酸エステル（PGFE）の添加の影響についても調べた。
【方法】マヨネーズの水相には pH 4.0 の卵黄分散液（酢酸終濃度 10 mM、卵黄は油相に対して 18wt%、NaCl は水分に対して 7wt％）、油相には 6 通りの混合油（大豆油/菜種油＝100/0, 50/50, 40/60, 30/70, 20/80, 0/100）を用いた。それらをコロイドミルで乳化し、油相濃度 70wt%のマヨネーズを調製した。調製した 6 種類のマヨネーズを-20℃, -40℃でそれぞれ 1-6 日間冷凍し、常温で静置解凍後、外観観察によって凍結融解に対する安定性を評価した。油脂結晶抑制（調整）作用を持つ PGFE を油相に対して 1%または 3%添加した場合についても同様の条件で評価した。外観観察と同時に DSC 測定、偏光および光学顕微鏡観察を行った。顕微鏡観察では予備乳化後の粒子径の大きいマヨネーズを使用した。
【結果】外観観察の結果、-20℃の冷凍条件では油相の菜種油比率が大きいほど、また同じ混合比率でも冷凍期間が長いほど不安定化が起きる傾向が見られた。PGFE を添加した場合も同様の傾向が見られたが、不安定化が起きるまでの日数が増加した。すなわち PGFE を添加することによって不安定化が遅延した。DSC 測定と顕微鏡観察の結果から、マヨネーズの水相は-20℃で一定時間保持すると結晶化すること、また-20℃の冷却過程で大豆油の一部が結晶化する一方で、菜種油は－20℃で一定時間保持後に結晶化することが示唆された。偏光顕微鏡観察より－20℃で大豆油由来の結晶が油滴の界面に沿って存在している様子が観察された。以上の結果から、-20℃の冷凍条件では氷結晶の形成・成長とそれに伴う油滴同士の接触によって不安定化が起きると考えられる。またその時の油脂結晶の状態が重要であり、大豆油由来の結晶は安定化、菜種油由来の結晶は不安定化に作用している可能性が示唆された。DSC 測定の結果より、今回用いた PGFE は大豆油と相互作用している証拠が得られたが、菜種油との相互作用については現在検討中である。-40℃の冷凍条件では、不安定化メカニズムおよび PGFE 添加による不安定化抑制メカニズムが、－20℃の冷凍条件の場合と異なる可能性を示唆する結果が得られた。

mayonnaise, fat crystal, ice crystal

講演番号：2F28p11
講演日時、会場：3 月 27 日 16:10～ F 校舎 28 会場

冷凍方法が非加熱および加熱野菜組織の細胞内氷結晶生成に与える影響

Effects of Freezing Methods on Formation of Ice Crystal in Cells of Unheated or Heated Vegetable Tissues

○福田 満[1]、澤田 小百合[2]、小林 麻貴[3] ([1]武庫川女子大栄科研、[2]武庫川女子短大食生活、[3]兵庫大栄養マネジメント)
○Mitsuru Fukuda[1], Sayuri Sawada[2], Maki Kobayashi[3] ([1]Mukogawa Women's Univ., [2]Mukogawa Women's Junior College, [3]Hyogo Univ.)

【目的】最近の食生活では冷凍食品の利用は不可欠である。生鮮食品の中でも野菜は水分量が多いため冷凍に不適とされる。理由は、冷凍時に野菜組織の細胞質内で巨大な氷結晶を生成し細胞内部を破壊するとともに膨圧を生じ、解凍時に大量のドリップを生成するためである。したがって、冷凍による野菜の品質低下は避けられない。また、市販の冷凍野菜はブランチング処理後冷凍したものが多いので、加熱野菜の冷凍・解凍後のドリップ生成を調べる必要がある。本研究では冷凍方法が非加熱野菜および加熱野菜の品質に与える影響について、氷結晶サイズ形状とドリップ量の関係から調べる。
【方法】野菜（根菜類・茎葉菜類・果菜類、キノコ類）の非加熱および加熱素材を冷凍実験の試料として用いた。冷凍方法は①液体窒素による瞬間凍結（NF)、②業務用冷凍庫による急速冷凍（－40℃）（RF)、③業務用冷凍庫による磁場負荷急速冷凍（－40℃）(MF)、④通常冷凍庫による緩慢冷凍（－40℃）(SF）の 4 種類であった。解凍後のドリップ量を測定しドリップ率、必要に応じてドリップ糖度を測定した。また、冷凍試料の割断面を作成後、クライオシステム走査型電子顕微鏡（SEM）を用いて凍結時と凍結乾燥時の細胞観察を行い、細胞レベルで氷結晶のサイズと形状を比較した。
【結果・考察】非加熱試料の冷凍・解凍時のドリップ率を比較すると、根菜類・茎菜類・大部分の果菜類で NF ＜ MF ≒ RF＜ SF の傾向を示した。しかし、キノコ類と一部の果菜類では逆に NF が高いドリップ率を示し、キノコ類では MF ≒ RF ≦ SF ＜ NF を示した。また、一部の葉菜類や果菜類では冷凍方法の違いによるドリップ率の差異がほとんど認められなかった。クライオ SEM 観察により凍結組織の細胞内氷結晶を比較すると、冷却速度の違いが細胞内の氷結晶サイズや形状に影響を与えることが認められた。氷結晶サイズについては、NF では微少で規則的であり、最小サイスは一辺 5μm 以下となった。MF と RF では大部分の野菜で NF に比較して氷結晶サイズが大きくなり規則性も失う傾向を示した。SF では氷結晶サイズがさらに大きくなり細胞内は崩壊状態であった。氷結晶の形状は NF と SF との間には明確な差異があったが、MF と RF 間の差異はほとんど認められなかった。しかし、一部の根菜類では MF が RF に比較して微細な氷結晶を示し、凍結損傷が少なかった。また、野菜の種類によっては、非加熱野菜に比べて加熱野菜ではドリップ率が減少または増加を示した。ジャガイモやカボチャでは加熱後のデンプン糊化により NF の氷結晶の規則性が失われガラス化現象が認められた。野菜の種類や非加熱・加熱の違いによって多少異なったが、冷却速度や冷凍方法が野菜の氷結晶サイズと形状に影響し細胞損傷に起因する解凍時ドリップ率を左右したと推定される。

freezing, vegetable, ice crystal

講演番号：2F28p12
講演日時、会場：3 月 27 日 16:21～ F 校舎 28 会場

野菜類の凍結前後におけるテクスチャー評価法について

Evaluation method for texture changes of vegetables before and after freezing

○中納 真奈、渡辺 学、鈴木 徹 (海洋大学)
○Mana NAKANO, Manabu WATANABE, Toru SUZUKI (Kaiyodai)

【目的】　野菜類の冷凍において、その栄養価・香り・色などの化学的成分の変化を抑制することは、可能であるが、凍結解凍後の食感・テクスチャーの著しい変化を抑制することは不可能とされる。すなわち、凍結解凍後の野菜の主要なダメージは、テクスチャーに関するものである。しかしながら、野菜の種類によって消費者に要求される食感は大きく異なり、それぞれの適切な評価方法があいまいであった。そこで本研究では、数種類のテクスチャーの異なる野菜について、凍結前後におけるテクスチャー、すなわち食感の変化を定量的に的確に捉えられる評価方法を確立することを目的とした。

【方法】　要求される食感の異なる生鮮結球レタス(香川県産)およびイチゴ(トチオトメ、栃木県産)を市場で購入し、それぞれの可食部位、凍結解凍条件の影響、測定時のプランジャーの影響、また測定速度などを変化させながら、最適な条件を検討した。測定機器はテクスチャーアナライザー(英弘精機、TA,XT plus)を用いた。解析方法については、初期弾性値、破断強度、崩壊回数他を多面的に評価した。

【結果】　現段階では、レタスは、測定方法として、種々のプランジャーを検討した結果、直径 3㎜円柱状プランジャーを用いた突き刺し法が適しており、初期弾性値と崩壊回数を解析した場合に、適切に食感ダメージが評価されている可能性が示唆された。一方イチゴでは、初期弾性値、崩壊回数のみならず、破断強度ほか重要と考えられた評価項目があり、測定条件だけでなく解析項目についても、今後詳細に検討していく。

vegetable, texture, freezing

講演番号：2F28p13
講演日時、会場：3 月 27 日 16:32～ F 校舎 28 会場

アイスグレーズ食品のグレーズ氷の破砕分離

Mechanical separation of glaze ice from ice-glazed frozen food

○許 政、曲 亮、川井 清司、羽倉 義雄（広島大院生物圏）
○Zheng XU, Liang QU, Kiyoshi KAWAI, Yoshio HAGURA (Hiroshima Univ.)

【目的】エビなどの凍結保存される魚介類は品質変化を防ぐために表面に氷の膜が付けられている。例えば冷凍エビでは、一尾のエビの表面に氷の薄膜を付けた状態や、複数のエビを並べて氷漬けしたブロック状態で通流している。特に、ブロック状態の凍結食品では氷を完全に溶かさないと食品を無傷で取り出せないことから、氷の容易な分離や解凍時間の短縮が課題となっている。また、解凍時間が長くなることで、食品の品質が低下することも問題となっている。そこで本研究では、解凍時間の短縮による品質保持を目的として、食品の表面の氷だけを破壊・分離する新たな加工技術を検討した。具体的には、食品のモデルとして魚肉ソーセージを使用し、このモデルの外側に氷の膜（層）を付け、割裂荷重を加えることにより、氷の分離を試みた。

【実験方法】 試験片の調製と割裂試験：実験試料として、魚肉ソーセージ（直径 1.35cm、長さ 3.0cm）の外側に氷の膜（厚さ約 0.3cm）を付けたアイスグレーズ食品（直径 1.97cm、長さ 3.0cm）を作成した。また、応力集中現象の解析用に、魚肉ソーセージ（直径 2.5cm、長さ 3.9cm）の中心部に直径 1.55cm の穴を空け、同一寸法の氷の円柱を挿入した氷挿入食品を作成した。これらの実験試料を各測定温度（－20、－30、－40、－50、－60、－70℃）まで冷却した後、同一温度に設定した材料試験機の圧縮板により割裂試験を行い、変位－荷重曲線を記録した。応力集中解析：応力集中とは、物体の形状変化部で局所的に応力が増大する現象である。本研究では、試験片（アイスグレーズ食品、氷挿入食品）に対する割裂荷重は、介在物を有する無限平板が引張力を受ける場合と同様の荷重状態であると見なした。さらに、アイスグレーズ食品及び氷挿入食品では、魚肉ソーセージと氷が互いに拘束していない状態であると仮定した。すなわち、両者とも滑り介在物を含む系であるとして解析を行った。

【実験結果及び考察】応力集中解析に必要な氷及び魚肉ソーセージのヤング率を測定したところ、測定温度の低下に伴ってヤング率は増加し、さらに両者のヤング率は温度が低くなるほど近づく傾向を示した。アイスグレーズ食品の割裂試験では、全ての温度において魚肉ソーセージは無傷であり、氷のみが破壊した。応力集中現象の解析においても、魚肉ソーセージが応力集中源として働き、氷が優先的に破壊し、氷の分離が可能になることが予測できた。氷挿入食品の割裂試験では、－20～－40℃で氷のみが破壊した。応力集中現象の解析においても、魚肉ソーセージ内の氷が先に破壊することが予測できた。以上のことから、アイスグレーズ食品の氷の分離には割裂荷重が有効であること、また、介在物を含む材料の割裂破壊現象の解析には応力集中を考慮する必要があることが明らかになった。

glaze ice, mechanical separation, cleavage test

講演番号：2F28p14
講演日時、会場：3 月 27 日 16:43～ F 校舎 28 会場

固体食品用ブランチング・殺菌・減圧乾燥装置の開発（第 1 報） トマトおよびサケの乾燥

Development of vacuum drying, blanching and heat sterilizing instrument for solid foods (Part 1) Drying slices of tomato and salmon

○森川 卓哉[1]、三浦 靖[1,2]、立澤 文見[2]、加藤 一幾[2]、高田 式久[1,3]、橋本 正成[4]、仲田 英郎[5]、嵯峨 政嘉[5] ([1]岩手大三陸水産研究センター、[2]岩手大農、[3]雪国アグリ(株)、[4](株)銀河農園、[5](株)マルサ嵯峨商店)

○Takuya MORIKAWA[1], Makoto MIURA[1,2], Fumi TATSUZAWA[2], Kazuhisa KATO[2], Norihisa TAKADA[1,3], Masanari HASHIMOTO[4], Hideo NAKATA[5], Masayoshi SAGA[5] ([1]SFRC, Iwate Univ., [2]Fac. of Agric., Iwate Univ., [3]YUKIGUNI AGURI CO., LTD., [4]GINGA NOUEN Co., Ltd., [5]MARUSA-SAGA CO., LTD.)

【目的】これまでに，温・冷風や減圧，マイクロ波照射などを利用した様々な方式の乾燥装置が開発・販売されているが，ブランチングや殺菌といった加工の前処理と，乾燥処理を一体で実施できる装置は存在しない。そこで，本研究では過熱水蒸気によるブランチング・殺菌処理と，減圧乾燥処理を一体型で行える，「固体食品用ブランチング・殺菌・減圧乾燥装置」を製作し，これを用いて，農水産物の色や風味といった特性を活かした乾燥食品の開発を目指した。サケやトマトといった，色・風味・組織構造が変化しやすい固体食品素材を本研究の対象にした。

【方法】試料には，スライストマト（岩手県産，CF 桃太郎）およびサケ（岩手県産，シロザケ）筋肉を用いた。製作した試験機（SV-40 型，エニーテック(株)製）を用い，乾燥試料の水分含量と水分活性を指標にして，庫内圧力を 5.5kPa，乾燥時間を複数水準設定し，試料の乾燥に及ぼす影響を検討した。続いて，試験機および真空定温乾燥装置（VOS-301SD，東京理化器械(株)）を使用した検討により，改良事項を反映し仕様を策定したプロトタイプ機（ZT13-7232，アルバック東北(株)製）を製作した。本装置を用いて，乾燥時間・庫内圧力・庫内流速を複数水準設定し，乾燥試料の水分含量と水分活性を指標にして検討を行った。また，予備実験として，あらかじめ乾燥処理されたサクラエビ乾燥品を試料に用いて，過熱水蒸気によるブランチング・殺菌機能を評価した。試料を設置した庫内に過熱水蒸気を供給し，庫内平均雰囲気温度 121℃で 2 分間のブランチング・殺菌処理を行い，試料中の一般生菌，大腸菌群および大腸菌の生菌数を測定した。

【結果および考察】試験機による検討の結果，スライストマトは乾燥処理 48 時間，サケ筋肉は乾燥処理 12 時間で中間水分食品とされる水分含量，水分活性値になった。続いてプロトタイプ機による検討では，庫内圧力を一定にして庫内風速を上昇させることにより，試料の乾燥を効率的に進行させるほか，庫内圧力を制御することで試料の乾燥状態を制御できることを確認した。ブランチング・殺菌処理によって，サクラエビ乾燥品中の生菌数は，無処理試料と比較して一般生菌数が 7,667 CFU･g^{-1} から <300 CFU･g^{-1} まで減少した。なお，大腸菌群および大腸菌はいずれも非検出であった。

効率的な乾燥条件と，乾燥試料の品質評価（力学的特性，過酸化物価，糖組成，色特性，着色成分組成，生菌数など）結果についても報告を行う。

*本研究は，JST 平成 24・25・26 年度復興促進プログラム（マッチング促進）により実施された。

vacuum drying, superheated steam, blanching

講演番号：2F28p15
講演日時、会場：3 月 27 日 16:54～ F 校舎 28 会場

Effects of pretreatment and drying conditions on physical properties of instant rice product

○Jittimon WONGSA[1], Dusdadee UTTAPAP[2], Buddhi P. LAMSAL[3], Vilai RUNGSARDTHONG[1]
([1]Department of Agro-Industrial, Food and Environmental Technology, Faculty of Applied Science, Food and Agro-Industry Research Center, King Mongkut's University of Technology North Bangkok, Bangkok 10800, Thailand, [2]Division of Biochemical Technology, School of Bioresources and Technology, King Mongkut's University of Technology Thonburi,Bangkok 10150, Thailand, [3]Department of Food Science and Human Nutrition, College of Agriculture and Life Sciences, Iowa State University, Ames, IA 50011, USA)

The effects of pretreatment and drying conditions on the properties of instant rice product were investigated. Thai jasmine rice (Kao Dawk Mali 105) was used as a raw material. The experiments were carried out by soaking the rice in water or hot water, and with chemical treatment followed with three cooking technique; boiling, steaming and steaming under pressures. Then, the cooked rice was dried at 80°C for 30, 45, and 60 minutes by using a tray dryer and puffed at 200-220 °C for different time intervals. The factorial design tests were adopted to study the effects of pretreatment and drying condition on physical properties including hardness, adhesiveness and whiteness index of the product. The whiteness index of instant rice decreased with chemical treatment. Rice cooked by boiling indicated harder texture than the product obtained by using steaming and steaming under pressure. The hardness and stickiness of instant rice after rehydration were lower than freshly cooked rice. The porous structure of instant rice can be created by puffing technique. Scanning electron microscope images showed that higher volume expansion of instant rice was obtained when high moisture content and high puffing temperature were used. However, the higher puffing temperature and longtime of puffing resulted to harder surface of instant rice grains. The high volume expansion of puffed instant rice indicated higher capacity to absorb water that resulted in very short rehydration time.

Drying Condition, Instant Rice, Physical Property

講演番号：2F28p16
講演日時、会場：3 月 27 日 17:15～ F 校舎 28 会場

室温貯蔵，あるいは乾熱（120℃）貯蔵した米粉と新鮮グルテンによる製パン試験結果

Effects of various storage-conditions of rice flour on rice bread baked with fresh gluten

○中川 真理子[1]、田原 彩[1]、牛島 雄毅[2]、松永 幸太郎[2]、瀬口 正晴[1]([1]神戸女子大学家政、[2]熊本製粉(株))
○Mariko NAKAGAWA[1], Aya TABARA[1], Yuki USHIJIMA[2], Kotaro MATSUNAGA[2], Masaharu SEGUCHI[1] ([1]Kobe Women's Univ., [2]Kumamoto Flour Milling Co., Ltd.)

【目的】米粉にグルテンをブレンドした製パンが広く行われている。このとき長期間室温貯蔵した米粉に新鮮グルテンをブレンドして製パン試験を行うと，製パン性（パン高，比容積）の低下することが認められた。その原因を調べるために，米粉を室温（2 水準），あるいは乾熱の各処理を行い，それらの製パン試験結果を検討した。
【方法】金属製バット（25×34×3cm）に 2 品種の米粉（ミズホチカラ，あきまさり）をそれぞれ厚さ 0.5－1.0cm になるように広げ，室温（15℃，35℃で 0－9 ヶ月間），及び乾熱貯蔵（120℃，0－120 分間）を行った。製パンは以下のように行った。はじめに米粉 184.9g，グルテン 32.6g をブレンドし，そこに砂糖 10.9g，食塩 2.2g，生イースト 6.5g，水 163.1mL を加え，25 分間ミキシングした。次にできたパンドウを 120g に分割，成型した後，10 分間ベンチタイムした。その後モルダーに通し，さらに 5 分間ベンチタイムした後，38℃恒温槽で 70 分間 2 次発酵を行い，オーブン（210℃）で 30 分間焼成した。パン高（mm），比容積（cm^3/g），*Lab* 等から製パン性を評価した。
【結果】15℃，あるいは 35℃で各貯蔵した米粉各々と新鮮グルテンを用いて製パン試験を行った結果，15，35℃ともに貯蔵時間が長くなるに伴い，次第に製パン性（パン高，比容積）の低下することが認められた。さらに，乾熱貯蔵（120℃）した米粉を新鮮グルテンとブレンドして製パン試験を行った結果，120℃，10 分間の乾熱処理で製パン性が著しく低下することがわかった。

rice flour, storage at room temperature, dry-heat

講演番号：2F28p17
講演日時、会場：3 月 27 日 17:26～ F 校舎 28 会場

乾熱処理が米粉のオイル吸着能に及ぼす影響について

Effects of dry-heat treatment on oil-binding ability of rice flour

○田原 彩[1]、中川 真理子[1]、牛島 雄毅[2]、松永 幸太郎[2]、瀬口 正晴[1]([1]神戸女子大家政、[2]熊本製粉（株））
○Aya TABARA[1], Mariko NAKAGAWA[1], Yuki USHIJIMA[2], Kotaro MATSUNAGA[2], Masaharu SEGUCHI[1] ([1]Kobe Women's Univ., [2]Kumamoto Flour Milling Co., Ltd.)

【目的】エージング（15 及び 35℃，0-9 ヶ月間）あるいは乾熱処理（120℃，0-120 分間）した米粉を用いて製パン試験を行うと，製パン性（パン高、比容積）の劣化することが明らかとなった。しかし、その原因は不明である。エージングや乾熱処理（120℃）は薄力小麦粉に様々な変化を与えること（乾熱処理小麦粉中のデンプン粒の親油化（疎水化）[1)]，プライムスターチ区分とテーリングス区分の相互作用[2)]，パンケーキの弾力性[3)]やカステラ容積の増加[4)]）が知られている。本研究では乾熱処理が米粉にもたらす変化について疎水化の面から検討した。

【方法】米粉をトレー（25×34×3 cm^3）上に 1cm 厚さになるよう均等に入れ，120℃のオーブンで 10，20，40，60，120 分間乾熱処理をする。各米粉（8.5g）とグルテン粉（1.5g），一定量（7.5mL）の水をミキソカップ（直径 9cm，深さ 11cm）に入れ，15 分間ミキソグラフ試験を行い，物性変化について検討する。さらに各米粉（2g）と水（20mL），オイル（オリーブオイル）（4mL）を試験管（直径 35mm，深さ 20.5cm）に入れ，激しく撹拌した後，オイル吸着能を測定する。また，米粉をクロロホルム-メタノール（2：1），ジエチルエーテル，0.2%NaOH 溶液及びペプシンで処理した後，120℃，120 分間乾熱処理を行い，オイル吸着能を測定する。

【結果】ミキソグラフ試験の結果，米粉の乾熱処理時間が長くなるに伴って，粉（米粉とグルテン粉の混合）と水が馴染むまでに要する時間の長くなることが観察された。またオイル吸着試験の結果，乾熱処理時間が長くなるにつれて，オイル吸着能の増加することが確認された。各溶液で処理した米粉でオイル吸着試験を行ったところ，クロロホルム-メタノール（2：1）及びジエチルエーテルで処理した米粉ではオイル吸着能がみられたが，0.2%NaOH 溶液及びペプシンで処理した米粉はオイル吸着能を失った。これらの結果より，米粉のオイル吸着能にはタンパク質の影響していることが推察された。

1) Cereal Chem. 61:248-250, 1984. 2) Cereal Chem. 85:626-628, 2008. 3) Food Sci. Technol. Res. 12:167-172, 2006. 4) Food Sci. Technol. Res. 14:431-436, 2008.

Oil-binding ability, Rice flour, Dry-heat treatment

講演番号：2F28p18
講演日時、会場：3 月 27 日 17:37～ F 校舎 28 会場

玄米への中高圧処理による色素成分の浸透移行性に関する研究

Investigation on permeability of pigment into brown rice by high-hydrostatic pressure processing

○藤田 智之、甲田 万紀子 (信州大院農)
○Tomoyuki FUJITA, Makiko KODA (Shinshu Univ.)

【目的】

玄米にはフェルラ酸などの機能性成分が豊富に含まれているものの、その多くは果皮や胚芽などの糠部に存在しており、精米時に除去されている。糠中の機能性成分を精白米に移行させる目的で、玄米への加圧処理を試みたところ、加水・加温・加圧（58℃, 100MPa）条件下、6 時間の処理により、ポリフェノール成分が精白米に移行し、米粉の加工特性も変化することを明らかにした[1)]。今回は、食品添加物としても用いられるコチニール色素を用いて玄米に中高圧処理を行い、色素成分の精白米への浸透移行性を調査し、加工条件による成分移行度の数値化を試みた。

【方法】

原料の玄米は 2013 年及び 2014 年度産のコシヒカリ（本学部農場産）を用いた。玄米にコチニール水溶液（濃度 0.5%または 1.0%）を添加し、常温・常圧（20℃, 0.1MPa）または加温・加圧（55℃, 100MPa）条件下で 24 時間処理した。加工玄米は処理後、元の重量となるまで送風乾燥し、精米したものを製粉して米粉試料とした。各米粉試料を用いて、HPLC 分析によるコチニール色素の定量および Folin-Ciocalteu 法による総ポリフェノールの定量を行った。顕微鏡観察にはデジタルマイクロスコープ BA210EINT を使用し、加工後の玄米の表面および切断面を観察した。

【結果及び考察】

加圧処理を行った精白米中のコチニール色素量は、常圧処理を行った精白米と比較して 1.2 倍程度の増加であった。玄米においても同様の傾向を示した。しかし、顕微鏡観察を行ったところ、常圧と加圧試料の色素成分の浸透度には顕著な差が認められた。常圧サンプルでは色素が糠層および胚芽周辺に留まっており、胚乳の内部まで浸透していないことが示された。一方、加圧処理を行ったサンプルでは精白米部を含めた内部全体が均一に呈色していることが観察された。以上の結果から、玄米に加水・加温・加圧処理を施すと、糠層からだけではなく、外部から添加した物質を内部へ浸透移行させる効果があることが示された。なお、個体によって着色度が異なり、胚芽部分や加工によりひびの入った部分から色素が浸透していることが観察されたことから、玄米表面の欠損部位から浸透している可能性も示唆された。今後は加工条件を変更して、温度や処理時間による移行性の違いを比較・検討していく予定である。

1）日本農芸化学会 2014 年度（平成 26 年度）大会講演要旨集, 3B02p17（2014）

brown rice, hydrostatic pressure, cochineal

講演番号：2F28p19
講演日時、会場：3 月 27 日 17:48～ F 校舎 28 会場

焼酎開発を目的とした圧力処理による大麦澱粉の糊化・糖化

Gelatinization and saccharification of barley starch by high hydrostatic pressure for barley shochu manufacturing

○木戸 みゆ紀、内藤 広賢、五十嵐 友、神保 真優香、林 真由美、井口 晃徳、重松 亨、高久 洋暁、田中 宥司（新潟薬大・応生科）
○Miyuki KIDO, Hirosato NAITO, Yu IKARASHI, Mayuka JINBO, Mayumi HAYASHI, Akinori IGUCHI, Toru SHIGEMATSU, Hiroaki TAKAKU, Hiroshi TANAKA (Niigata Univ. Pharm. Appl. Life Sci.)

輸入大麦の価格上昇から、国産大麦の需要が高まっている。農水省は、食料・農業・農村基本計画の中で、大麦の生産量を年間 22 万トン（平成 20 年）から 35 万トン（平成 32 年）にする方針を発表した。一方、新潟県では大麦の生産量は年々減少し、わずか 484 トン（平成 24 年）である。その主な原因は、新潟県内での大麦の需要の低さである。そこで、高付加価値麦焼酎の開発を行い、大麦の消費拡大を目指す。本研究では、澱粉を糊化させることが知られている圧力処理を利用し、圧力による非熱的、麹無添加の新規麦焼酎の開発を検討した。

圧力処理による大麦の糊化を調べるため、新潟県産大麦北陸皮 50 号（70%精麦）を水洗いして浸麦（25℃、1 晩）させ、圧力処理（0.1（常圧）～600 MPa、室温～80℃、10～180 min）あるいはコントロールとして蒸煮処理（60 min）を行い、米麹を添加して保存（25～50℃、3 day）した。経時的に還元糖量の測定を行い、糊化を評価した。その結果、500 MPa、80℃、120 min 以上あるいは 600 MPa、室温、120 min 以上でコントロールに匹敵する糖化が起こったため、圧力糊化最適条件を 600 MPa、室温、120 min とした。麹をアミラーゼ源として添加することで、非熱的な糖化プロセス（プロセス①）が構築できた。

圧力糊化最適条件で処理した大麦の内在アミラーゼ活性を、澱粉を基質として測定した。その結果、アミラーゼ活性は圧力未処理のおよそ 1/5 となり、アミラーゼの圧力変性による失活が示唆された。精麦大麦では内在アミラーゼの活性が不十分であるため、玄麦から製造した緑麦芽のアミラーゼを利用し、糖化を行う方法を検討した。玄麦を発芽（室温、0～8 day）させた緑麦芽のアミラーゼ活性を、澱粉を基質として測定した。また、緑麦芽を圧力糊化最適条件で処理した大麦にアミラーゼ源として添加して保存し、経時的に還元糖量の測定を行い、糖化を評価した。緑麦芽のアミラーゼ活性は、発芽し始める 2 day から著しく増加し、6 day で最大となった。緑麦芽を用いた大麦の糖化は、発芽期間の延長に伴って促進して 5 day で最大となり、麹を用いた場合に匹敵する糖化が起こったため、緑麦芽の最適発芽期間を 5 day とした。緑麦芽をアミラーゼ源として圧力処理大麦に添加することで、非熱的、且つ麹無添加の糖化プロセス（プロセス②）が構築できた。

プロセス①とアルコール発酵プロセスを連結した醸造プロセスを構築した結果、良好なアルコール発酵が行われた。圧力糊化大麦は麦焼酎原料として利用可能であることが示された。

high hydrostatic pressure, starch gelatinization, amylase activity

講演番号：2F28p20
講演日時、会場：3 月 27 日 17:59～ F 校舎 28 会場

中高圧処理による二枚貝開脱殻における温度の影響

Effect of temperature on bivalve shucking by medium high hydrostatic pressure treatment

○山本 和貴[1]、小田 真知子[1]、森松 和也[1,2] ([1]農研機構食総研、[2]愛媛大農)
○Kazutaka YAMAMOTO[1], Machiko ODA[1], Kazuya MORIMATSU[1,2] ([1]NFRI, NARO, [2]Ehime Univ.)

【目的】100 MPa 程度以上での中高圧処理により、二枚貝を容易に開脱殻できることが知られ、一部で実用的に産業利用されている。我々はこれまでに、処理圧力を高めることで開脱殻効果が高くなると共に貝身から溶出する成分量が多くなることを明らかとしている。本研究では、中高圧処理による開脱殻効果と貝身成分の溶出とに及ぼす処理温度の影響を調べた。
【方法】二枚貝としてはアサリ（*Ruditapes philippinarum*）を用いた。アサリは、水道水で洗浄後、20 ℃の 3 %食塩水に暗所で 2 時間浸漬し、砂抜きをした。透明レトルトパウチに無作為に選んだアサリ 12 個（約 70～120 g）を入れ、100ml の蒸留水を加水して脱気密封した。この試料を冷却・加熱可能な中高圧処理装置（まるごとエキス α ; (株)東洋高圧製）を用いて、10 ℃、20 ℃、30 ℃で 100、150、200 MPa で 10 分間処理した。独自に定義した開脱殻点数（1～5 点）及び開殻率（%）によって開脱殻効率を評価し、更に、処理試料中の溶液に溶出した蛋白質量、NaCl 量、全糖量、還元糖量を各々定法によって測定し、アサリ重量当たりの値として比較検討した。また、比較のため、沸騰水中で 10 分間の熱水処理を施した試料、10 ℃、20 ℃、30 ℃で 15 分間常圧静置した試料を併せて調製した。
【結果】常圧処理では、いずれの処理温度においても、二枚貝の開脱殻効果は全く見られなかった。一方、100 MPa 及び 150 MPa 処理では、20 ℃以下の温度では開殻率 100 %を下回ったものの、30 ℃での処理により開殻率 100 %を達成した。また、200 MPa 処理では、処理温度に関わらず開殻率 100 %であり、開脱殻点数も 4 点弱と高く、30 ℃における 100 MPa 及び 150 MPa 処理を上回る開脱殻効果があった。つまり、開脱殻においては、処理温度の上昇効果よりも処理圧力の上昇効果の方が大きいものと考えられた。また、処理圧力及び処理温度の上昇と共に、開脱殻効果と同様に、貝身成分の溶出量が多くなった。しかし、開殻率 100%の熱水処理と比べると、いずれの中高圧処理条件における貝身成分の溶出量も大幅に少なかった。そのため、中高圧処理での開脱殻により、熱水処理よりも生の状態に近い貝身成分を保持した剥き身の加工が可能となるものと考えられる。

high hydrostatic pressure, bivalve, shuck

講演番号：2F37a01
講演日時、会場：3 月 27 日 09:00～ F 校舎 37 会場

腸管増殖能を有する *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* GCL2505 株の抗メタボリックシンドローム効果の検証

Effect of *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* GCL2505 which proliferates in the gut on metabolic disorders

○青木 亮[1]、上門 弘平[1]、滝井 寛[1]、三上 友美子[1]、菅沼 名津季[1]、馬渡 隆志[2]、古賀 泰裕[3]([1]江崎グリコ（株)、[2]グリコ乳業（株)、[3]東海大・医)
○Ryo Aoki[1], Kohei Kamikado[1], Hiroshi Takii[1], Yumiko Mikami[1], Natsuki Suganuma[1], Takashi Mawatari[2], Yasuhiro Koga[3] ([1]Ezaki Glico Co., Ltd., [2]Glico Daily Products Co., Ltd., [3]Tokai Univ.)

【目的】
糖尿病に代表されるメタボリックシンドロームの増加は、世界的に大きな問題となっている。近年、メタボリックシンドロームと腸内細菌叢の関連性が明らかになってきている。本研究では、腸管増殖性を有するビフィズス菌株 *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* GCL2505 株（GCL2505）の抗メタボリックシンドローム効果を検証した。
【方法】
<実験 1 レプチン欠損型肥満モデルを用いた検討>
5 週齢の雄性 C57BL/6JHamSlc-*ob/ob* マウスに対し、GCL2505 を PBS に懸濁し、10^9 CFU/day を 7 週間連日経口投与した（Ob-GCL2505 群)。同量の PBS を投与した群を Ob-Control 群とし、試験開始 6 週間後に経口糖負荷試験を実施し耐糖能を検証した。7 週間後に腸管バリア機能試験として、経口投与した FITC-dextran (4kDa) の血中移行性を検証した。
<実験 2 高脂肪食負荷型肥満モデルを用いた検討>
5 週齢の雄性 C57BL/6JSlc マウスに対し、High-Fat-Diet (HFD; 総カロリーの 45%を脂肪が占める) を負荷して肥満を誘導した。HFD 負荷開始 2 週間後より GCL2505 を PBS に懸濁し、10^9 CFU/day を 7 週間連日経口投与した（HFD-GCL2505 群)。同量の PBS を投与した群を HFD-Control 群とした。HFD 負荷開始 8 週間後に経口糖負荷試験を、9 週間後に腸管バリア機能試験を実施した。
【結果】
実験 1 において、Ob-GCL2505 群は Ob-Control 群と比較して、有意に耐糖能および血中中性脂肪値を改善した。しかしながら腸管バリア機能に有意な変化は見られなかった。
実験 2 においては、HFD-GCL2505 群は HFD-Control 群と比較して、有意に耐糖能・精巣周囲脂肪量を改善した。HFD-GCL2505 群では、Glucagon like peptide-1 (GLP-1) の結腸組織発現および血中濃度が有意に高く、脂肪組織の炎症関連遺伝子が有意に低下した。その一方で腸管バリア機能には有意な変化は見られなかった。
【考察】
以上のことから、GCL2505 は抗メタボリックシンドローム効果を有することが明らかとなった。また、その作用メカニズムとして、消化管ホルモンである GLP-1 の分泌誘導が考えられた。

probiotics, metabolic disorders, GLP-1

講演番号：2F37a02
講演日時、会場：3 月 27 日 09:11～ F 校舎 37 会場

腸管増殖能を有する *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* GCL2505 株は、消化管の短鎖脂肪酸量および GLP-1 分泌能を上昇させ、抗メタボリックシンドローム効果を発揮する

Bifidobacterium animalis ssp. *lactis* GCL2505, a proliferative probiotic in the gut, improves metabolic disorders through the elevation of the gut short-chain fatty acids and GLP-1

○上門 弘平[1]、青木 亮[1]、滝井 寛[1]、三上 友美子[1]、菅沼 名津季[1]、馬渡 隆志[2]、古賀 泰裕[3]([1]江崎グリコ（株)、[2]グリコ乳業（株)、[3]東海大・医)
○Kohei Kamikado[1], Ryo Aoki[1], Hiroshi Takii[1], Yumiko Mikami[1], Natsuki Suganuma[1], Takashi Mawatari[2], Yasuhiro Koga[3] ([1]Ezaki Glico Co., Ltd., [2]Glico Daily Products Co., Ltd., [3]Tokai Univ.)

【目的】
我々はすでに *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* GCL2505 株（GCL2505）が抗メタボリックシンドローム効果を有することを明らかにしている。一方、腸内細菌叢がメタボリックシンドロームに及ぼす影響の一つとして、腸内細菌の産生する短鎖脂肪酸が宿主の消化管内分泌細胞上の受容体を介して、消化管ホルモン分泌を調節することが知られている。本研究では、プロバイオティクスとして汎用されているビフィズス菌 *B. longum* の標準株である JCM1217^T 株（JCM1217^T）をコントロールに用いて、GCL2505 の抗メタボリックシンドローム効果の作用メカニズムを消化管ホルモンとの関連において検証した。
【方法】
5 週齢の雄性 C57BL/6JSlc マウスに対し、High-Fat-Diet (HFD; 総カロリーの 45%を脂肪が占める)を負荷して肥満を誘導した。HFD 負荷開始 2 週間後より GCL2505 もしくは JCM1217^T を生理食塩水に懸濁し、10^9 CFU/day を 7 週間連日経口投与した（GCL2505 群 or JCM1217^T 群)。同量の生理食塩水を投与した群を Control 群とした。HFD 負荷開始後に経時的な X 線 CT スキャンによる脂肪蓄積量測定を行い、8 週間後に経口糖負荷試験を実施した。
【結果】
皮下・内臓脂肪蓄積量は、Control 群と比較して GCL2505 群は有意に軽減したが、JCM1217^T 群は変化を認めなかった。耐糖能も同様に、Control 群と比較して GCL2505 群は有意に改善したが、JCM1217^T 群では改善が見られなかった。消化管ホルモンである Glucagon like peptide-1 (GLP-1)の結腸組織発現および血中濃度は、Control 群と比較して GCL2505 群は有意に上昇したが、JCM1217^T 群は変化を認めなかった。GLP-1 と同様に盲腸内短鎖脂肪酸量は、GCL2505 群においてのみ Control 群と比較して有意な上昇を認めた。さらに、同数のビフィズス菌を投与しているが、盲腸内のビフィズス菌数は GCL2505 群が JCM1217^T 群と比較して有意に高値を示した。
【考察】
GCL2505 の抗メタボリックシンドローム効果の作用メカニズムとして、消化管内短鎖脂肪酸量の上昇による GLP-1 の分泌誘導が関与していることが明らかとなった。また、GCL2505 と JCM1217^T の消化管内での増殖能の違いが、短鎖脂肪酸量に影響を及ぼしたと考えられた。

probiotics, GLP-1, short-chain fatty acids

講演番号：2F37a03
講演日時、会場：3 月 27 日 09:22～ F 校舎 37 会場

Lactobacillus gasseri SBT2055 は *in vitro* において脂質エマルジョン粒子径の増大作用を介して膵リパーゼ反応を抑制する

Lactobacillus gasseri SBT2055 suppresses pancreas lipase reaction via increase in the droplet size of fat emulsion *in vitro*

○小川 哲弘、河野 通生、酒井 史彦、門岡 幸男（雪印メグミルク(株)・ミルクサイエンス研究所）
○ Akihiro OGAWA, Michio KAWANO, Fumihiko SAKAI, Yukio KADOOKA (Milk Science Research Institute, MEGMILK SNOW BRAND Co., Ltd.)

【背景と目的】　我々はこれまでに *Lactobacillus gasseri* SBT2055（LG2055）が内臓脂肪の蓄積を抑制することを明らかにしてきた [1) 2)]。その作用機作の一つとして、腸管での脂質吸収抑制作用が関与していることを報告している [3) 4)]。しかしながら、LG2055 がどのように脂質の吸収を抑制しているかは明らかとなっていない。腸管での脂質吸収には、膵リパーゼによる脂質分解反応が重要なステップとなる。そこで、LG2055 がリパーゼ反応を抑制するか否か、さらにリパーゼの基質となる脂質エマルジョンに及ぼす影響について *in vitro* 評価系を用いて検討した。

【方法】　トリオレイン、レシチン、タウロコール酸の混合液を超音波処理し調製した脂質エマルジョンに、ブタ膵リパーゼおよび LG2055 を混合し、37℃で 30 分間反応後、遊離脂肪酸量を測定した。また、脂質エマルジョンの代わりに合成基質である 4-methylumbelliferyl oleate にリパーゼと LG2055 を混合し、生成する 4-methylumbelliferone 量を測定した。次に、脂質エマルジョンに LG2055 を添加して 37℃で 3 時間振盪した後、脂質エマルジョンの粒子径を粒度分布計を用いて測定した。これらの評価は、LG2055 以外の乳酸菌（*L. gasseri* SBT0317、*L. gasseri* JCM1131^T、*Lactobacillus. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* JCM1002^T 、*Streptococcus thermophilus* ATCC19258^T）についても同様に行った。

【結果と結論】リパーゼの基質として脂質エマルジョンを用いた場合、LG2055 は添加濃度 1～100μg/ml において濃度依存的にリパーゼによる脂肪酸の遊離を抑制したが、合成基質を用いた場合はリパーゼ反応を抑制しなかった。LG2055 は、添加濃度 1～100μg/ml において濃度依存的に脂質エマルジョンの粒子径を増大させた。LG2055 のリパーゼ反応抑制作用および脂質エマルジョン粒子径増大作用は、他の乳酸菌と比較して有意に強かった。以上の結果から、LG2055 は脂質エマルジョン粒子径の増大作用（粒子比表面積の減少）を介して膵リパーゼ反応を抑制することで、脂質の吸収を抑制する可能性が示唆された。

1）Kadooka Y et al., *Eur J Clin Nutr*. **64**, 636-43 (2010)
2）Miyoshi M et al., *Eur J Nutr*. **53**: 599-606 (2014)
3）Hamad EM., *Br J Nutr*. **101**, 716-24 (2009)
4）Ogawa et al., *Lipids Health Dis*. **13**: 36 (2014)

probiotics, lipase, fat emulsion

講演番号：2F37a04
講演日時、会場：3 月 27 日 09:33～ F 校舎 37 会場

Lactobacillus gasseri SBT2055 は高脂肪食摂取時の脂肪組織の炎症および腸管透過性の増大を抑制する
Lactobacillus gasseri SBT2055 prevents adipose tissue inflammation and increased intestinal permeability in mice fed a high-fat diet.
○河野 通生、三好 雅也、小川 哲弘、浮辺 健、酒井 史彦、門岡 幸男（雪印メグミルク(株)・ミルクサイエンス研究所）
○Michio KAWANO, Masaya MIYOSHI, Akihiro OGAWA, Ken UKIBE, Humihiko SAKAI, Yukio KADOOKA (Milk Science Research Institute, MEGMILK SNOW BLAND Co., Ltd.)

【背景と目的】
我々は *Lactobacillus gasseri* SBT2055（LG2055）が内臓脂肪蓄積抑制作用を示すこと、および脂肪蓄積との関連が示唆されている脂肪組織炎症を抑制することを報告してきた[1) 2)]。近年では、高脂肪食摂取時に起こる腸管バリアの破綻が、全身の慢性炎症および肥満に寄与する可能性が報告されている。そこで本研究では、LG2055 の内臓脂肪蓄積抑制作用および脂肪組織炎症抑制作用に腸管バリア機能が関与するか否かを、マウスを用いた高脂肪食摂食試験によって検証した。
【方法】
C57BL/6J マウスに AIN-76 飼料ベースの 5% w/w 脂肪食（5%FD）、20% w/w 脂肪食（20%FD）および 20%FD に LG2055 菌体を添加した食餌（20%FD-LG）をそれぞれ 21 週間与え、体重および内臓脂肪重量を測定した。脂肪組織での炎症状態を解析するため、フローサイトメトリーを用いて副睾丸周囲脂肪組織における免疫細胞のポピュレーション解析を行った。腸管の物質透過性を評価するため、実験食投与 18 週目のマウスに蛍光標識デキストラン（FITC-dextran 4,000（FD-4））を経口投与し、血中への FD-4 の流入量を測定した。
【結果と結論】
20%FD 群で認められた体重、腸間膜脂肪重量、腎周囲/後腹膜脂肪重量の増加が、20%FD-LG 群では有意に抑制された。また、脂肪組織において、炎症の指標となる炎症性（M1）マクロファージと抗炎症性（M2）マクロファージの存在比率（M1/M2 比）が、20%FD 群と比較して 20%FD-LG 群で有意に低下した。さらに、肥満時の脂肪組織内へのマクロファージ動員に寄与する CD8 陽性細胞の割合についても、20%FD 群と比較して 20%FD-LG 群で有意に低い値を示した。これらの結果から、LG2055 摂取によって脂肪組織の炎症が抑制されていることが示唆された。一方、経口投与した FD-4 の血中への流入量は、5%FD 群と比較して 20%FD 群で有意に増加したが、20%FD-LG 群ではその増加が有意に抑制された。すなわち、高脂肪食による腸管透過性の増大化が LG2055 摂取で抑制されていることが示された。以上の結果より、LG2055 は高脂肪食摂取時の腸管バリア破綻を抑制し、内臓脂肪における炎症および脂肪蓄積を抑制することが示された。

1）Kadooka Y et al., *Eur J Clin Nutr.* **64**, 636-43 (2010)
2）Miyoshi M et al., *Eur J Nutr.* **53**: 599-606 (2014)

probiotics, inflammation, intestinal permeability

講演番号：2F37a05
講演日時、会場：3 月 27 日 09:44～ F 校舎 37 会場

Caco-2 細胞を用いた *in vitro* 腸管モデルにおける *Lactobacillus gasseri* SBT2055 の菌体成分による腸管バリア保護作用

A protective effect on intestinal barrier function by bacterial component of *Lactobacillus gasseri* SBT2055 in *in vitro* intestinal model using Caco-2 cells.

○三好 雅也、河野 通生、酒井 史彦、門岡 幸男（雪印メグミルク(株)・ミルクサイエンス研究所）
○Masaya MIYOSHI, Michio KAWANO, Fumihiko SAKAI, Yukio KADOOKA (Milk Science Research Institute, MEGMILK SNOW BRAND Co., Ltd.)

【背景と目的】

我々はこれまでに、プロバイオティクスである *Lactobacillus gasseri* SBT2055 (LG2055)がヒトおよび動物試験において内臓脂肪低減作用および脂肪組織における抗炎症作用を有することを示してきた。さらに LG2055 は、マウスへの高脂肪食投与によって誘導される腸管透過性の上昇を抑制したことから、腸管バリアの保護作用を有していることが明らかとなった。本研究では、LG2055 による腸管バリア保護作用の作用機作を明らかにするために、ヒト大腸がん由来細胞株である Caco-2 細胞を用いた *in vitro* 腸管バリア評価系で検証した。

【方法】

Caco-2 細胞をセルカルチャーインサート上で 3 週間培養することで腸管上皮様に分化させ、*in vitro* での腸管バリア機能の評価系として使用した。腸管のバリア機能は、経上皮電気抵抗値（trans-epithelial electrical resistance, TEER）および蛍光物質 Lucifer Yellow (LY) の管腔側から基底側への透過量によって評価した。腸管バリア機能を破綻させるために、単層培養した Caco-2 細胞の基底側に炎症性サイトカイン (インターフェロンγおよび TNFα) を添加して 3 日間培養した。炎症性サイトカイン添加と同時に LG2055 を管腔側に添加することで、腸管バリア機能の破綻が軽減されるか否かを検討した。また、LG2055 以外の乳酸菌についても同様に評価した。

【結果と結論】

炎症性サイトカインの添加によって Caco-2 細胞の TEER が減少および LY の透過性が上昇し、バリア機能の破綻を認めた。一方、炎症性サイトカインの添加と同時に LG2055 を Caco-2 細胞の管腔側に添加すると、腸管バリア破綻作用が軽減された。この作用を他の乳酸菌と比較したところ、*Streptococcus thermophilus* ATCC19258 では LG2055 と同様の軽減作用を示したが、*Lactobacillus. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* JCM1002 ^{T} ではほとんど軽減されなかった。

以上の結果から、LG2055 の菌体成分が腸管上皮細胞に直接作用して腸管バリア機能の保護作用を示すことが示唆された。

probiotics, barrier function, Caco-2

講演番号：2F37a06
講演日時、会場：3 月 27 日 10:05～ F 校舎 37 会場

ダイオキシンが誘導する消耗性症候群に対するルテオリンの抑制効果について
Luteolin suppresses TCDD-induced wasting syndrome in a cultured adipocyte model
○芦田 均[1]、原田 聖也[1]、三嶋 咲穂[1]、三谷 塁一[1]、山下 陽子[1]、松村 文夫[2] ([1]神戸大農、[2]カリフォルニア大デービス校環境毒性)
○Hitoshi ASHIDA[1], Kiyonari Harada[1], Sakiho Mishima[1], Takakazu Mitani[1], Yoko Yamashita[1], Fumio Matsumura[2] ([1]Kobe Univ., [2]Univ. California, Davis)

【目的】われわれは、ある種のフラボンやフラボノールがダイオキシン受容体ともいわれているアリール炭化水素受容体(AhR)の形質転換を抑制することを報告した。そこで、AhR を介した典型的なダイオキシン毒性の一つである消耗性症候群に対して、抑制効果を示すフラボノイドの探索と有効性を示したルテオリンの作用機構解明を試みた。
【方法】消耗性症候群のモデルとして、2,3,7,8-tetrachlorodibenzodioxin (TCDD)をマウス線維芽由来 3T3-L1 細胞に作用させて、脂肪蓄積の抑制を誘導した。このモデル系にルテオリンを含む 13 種のフラボノイドを 30 分間処理し、その後 TCDD を 3 日間共作用させた。細胞内の脂肪蓄積量は分化 8 日目に Sudan II 染色法を用いて測定した。作用機構解明のため、ルテオリンを 3T3-L1 細胞に分化誘導剤とともに 30 分間前処理し、次に TCDD を 1 時間共作用させ、細胞の核画分と細胞質画分を分画して、AhR の核内移行を調べた。また、同様に TCDD 作用 3 時間後に脂肪細胞の分化初期マーカーのタンパク質発現量と ChIP assay による DNA 結合活性を測定し、分化 6 日後には、分化中期のマーカーのタンパク質発現量を測定した。細胞内への脂肪蓄積は分化 8 日後に測定した。さらに、3T3-L1 細胞に取り込まれたルテオリン量は HPLC で定量した。
【結果】TCDD を 3T3-L1 細胞に作用させると、細胞内の脂肪蓄積量が有意に減少した。13 種のフラボノイドを TCDD とともに作用させたところ、ルテオリンとエピガロカテキンガレートが、TCDD による脂肪蓄積量の減少を有意に抑制した。ルテオリンの作用機構を調べたところ、ルテオリンは TCDD による AhR の核内移行を抑制した。また、ルテオリンは分化初期マーカーである C/EBPβならびに C/EBPδの TCDD による DNA 結合活性の阻害をキャンセルし、分化中期のマーカーである PPARγならびに C/EBPαの TCDD によるタンパク質発現量の減少をキャンセルした。さらに、30 μM のルテオリンを作用させたとき、細胞内に取り込まれたルテオリンのアグリコン量は、培養 1 時間後に 103 μM にまで蓄積され、その後緩やかに減少したが 4 時間後でも 65 μM が残存していた。
以上の結果から、TCDD により誘導された脂肪蓄積量の減少を抑制するフラボノイドとして、ルテオリンとエピガロカテキンガレートを見出した。ルテオリンは、TCDD による AhR の核内移行を抑制することで、脂肪細胞の分化初期マーカーの DNA の結合活性の阻害と分化中期マーカーの発現量抑制をキャンセルした。したがって、ルテオリンは TCDD が誘導する消耗性症候群の予防に役立つ食品成分の一つであることが示唆された。

luteolin, TCDD-caused wasting syndrome, adipocyte differentiation

講演番号：2F37a07
講演日時、会場：3 月 27 日 10:16～ F 校舎 37 会場

雌性 C57BL/6 マウスの血清および肝臓中脂質量の日内変動

Diurnal changes of serum and hepatic lipids on female C57BL/6 mice

○榊原 啓之[1]、杉山 広[2]、馬場 星吾[2]、窄野 昌信[1]([1]宮崎大学　農学部、[2]株式会社　明治)
○ Hiroyuki SAKAKIBARA[1], Hiroshi SUGIYAMA[2], Seigo BABA[2], Masanobu SAKONO[1] ([1]University of Miyazaki, [2]Meiji Co., Ltd)

【目的】我々ヒトを含めた生物は、日常の基本的な生命活動を営むために必要な成分（栄養成分）や補助する成分（機能性成分）を食事から摂取している。興味深いことに、このような食事由来成分を摂取した後、それらの成分が体内で効果を発揮するまでの過程に関連している多くの生体イベントには、一日の中で活性（分泌量）が高い時間帯と低い時間帯が存在している、つまり日周リズムがあることが知られている。したがって、生体レベルで食品由来成分の効果を評価するときには、標的となる効果に関連した生体イベントが刻んでいる日周リズムを考慮することが重要である。本研究では、雌性マウスが摂取した食事由来成分が脂質代謝系に及ぼす影響を評価するときに必要となる基盤情報を得ることを目的として、血中および肝臓中脂質量の日内変動について継時的に測定した。

【方法】6 週齢の雌性 C57BL/6 マウスを搬入後、12 時間の明暗サイクルに調節した部屋(室温 23±1℃、湿度 60±5%）内で順化させた。順化開始 2 週間後に 3 時間間隔で 19 回、摂食量を測定した。その翌週に未絶食下で 6 時間間隔で解剖に処し、血清および肝臓試料を得た。血清の総コレステロール、遊離コレステロール、トリグリセリド、リン脂質は酵素法による臨床キット（和光純薬)、スフィンゴミエリンは Colorimetric Assay Kit（Cayman Chemical Company）を用いて測定した。摘出した肝臓からの脂質の抽出は Folch らの方法に従い、血清と同様に脂質量を測定した。

【結果】雌性マウスの一日の摂食量は、暗期開始の前後（ZT9～ZT18）と明期開始の前後（ZT21～ZT3）にピークを迎える日周リズムを示した。測定した血清脂質は、いずれも明期と暗期が切り替わる時間帯（ZT0 と ZT12）に低下し、明期と暗期の中間（ZT6 と ZT18）に高まった。一方、肝臓中の総コレステロール、遊離コレステロール、リン脂質、スフィンゴミエリンは暗期開始時に高値、明期開始時に低値を示す明確な日周リズムを刻んでいたが、肝臓中のトリグリセリド濃度には明確なリズムは観察されなかった。以上の結果は、血中脂質量は摂食の影響を強く受けるが、肝臓脂質量は摂食パターンとは独立して日周リズムを刻んでいることを示唆している。

diurnal change, lipid, female mice

講演番号：2F37a08
講演日時、会場：3 月 27 日 10:27～ F 校舎 37 会場

日本人成人における血清脂肪酸組成と肥満との関係

Relationship between serum fatty acid compositions and obesity in Japanese adults

○城内 文吾、加嶋 健太郎、佐藤 匡央（九大農）
○Bungo SHIROUCHI, Kentaro KASHIMA, Masao SATO (Faculty of Agriculture, Kyushu Univ.)

【目的】肥満は、動脈硬化性疾患のハイリスク状態であるメタボリックシンドロームの中心病態である。日本において、メタボリックシンドロームであると疑われる者は予備群も含めると、40 歳以上の男性 2 人に 1 人、女性 5 人に 1 人と概算されている（平成 22 年厚生労働省 国民健康・栄養調査）。血清脂肪酸組成は、肥満やメタボリックシンドロームにより特有の変化が生じることが報告され、関係性が見出された脂肪酸は疾患の予防・改善への応用が期待されている。アメリカでは男女 264 名の被験者において血清中リン脂質およびコレステロールエステルの脂肪酸組成が Body mass index（BMI）と関連があるという報告（*Int. J. Obes*., 32, 1297−1304, 2008）がある。また日本では、227 名の男性を対象とした報告（*J. Atheroscler. Thromb*., 15, 306−313, 2008）があるものの、大規模かつ日本人男女を対象とした報告はない。本研究は、日本人成人男女 507 名を対象に肥満と血清脂肪酸組成との関係性を評価することを目的とした。
【方法】被験者は福岡県内の勤労者である日本人成人男女 507 名（男性 296 名、女性 211 名）とし、食事および運動等の生活アンケート等を実施した。血清脂肪酸組成（%）は、血清中脂質を抽出後、薄層クロマトグラフィーにより分画し、ガスクロマトグラフィーにより測定した。本研究では肥満度の指標として BMI を用いた。解析に際し、年齢、性別、飲酒区分、喫煙習慣および余暇身体活動量を調整因子として用いた。被験者を脂肪酸組成の三等分位で群分けし、上述の因子で調整した多変量調整平均値を算出した。その後、調整平均を連続変数とみなし、最小群から 0−2 の数値を割り当て線形性の評価を行う傾向検定を行った。
【結果】血清中ジホモ-γ-リノレン酸の組成比が大きくなるにつれて、BMI が上昇する傾向が認められた。

Dihomo-γ-linolenic acid, Body mass index, Epidemiology

講演番号：2F37a09
講演日時、会場：3 月 27 日 10:38～ F 校舎 37 会場

日本人成人における血清脂肪酸組成と非アルコール性脂肪肝との関係

Relationships between serum fatty acid compositions and nonalcoholic fatty liver in Japanese adults

○林 拓也、加嶋 健太郎、城内 文吾、佐藤 匡央（九大農）
○ Takuya HAYASHI, Kentaro KASHIMA, Bungo SHIROUCHI, Masao SATO (Faculty of Agriculture, Kyushu Univ.)

（目的）

近年我が国において、食習慣の変化や運動不足等により非アルコール性脂肪肝（NAFL）は増加の一途を辿っており、人間ドッグ受信者の約 3 割が脂肪肝と診断される状況にある。脂肪肝は炎症を伴い肝炎等の重篤疾患へと進行する危険性を有しているため、その対策は極めて重要であり、適切なバイオマーカーを発見することが急務である。アメリカでは 125 名の被験者に対して血清中リン脂質の脂肪酸組成が非アルコール性脂肪肝（NAFL）と関連があるという報告（*Hepatology*, 50, 1827-38, 2009）がある。また日本では、77 名の男性を対象とした報告（*J Nutr Sci Vitaminol*, 56, 271-8, 2010）もあるものの、大規模かつ日本人男女を対象とした報告はない。本研究は、日本人成人男女 280 名を対象に血清脂肪酸組成と脂肪肝および NAFL の関連性を評価することを目的とした。

（方法）

被験者は福岡県内の勤労者である日本人成人男女 280 名とし、食事および運動習慣等の生活アンケートを実施した。被験者の血清サンプルは脂質を抽出し、薄層クロマトグラフィーを用いて分画した。分画した脂質の脂肪酸組成はガスクロマトグラフィーにより測定した。本研究は解析対象を脂肪肝エコー検査による脂肪肝症状の有無とした。解析に際し、年齢、性別、BMI、飲酒区分、喫煙習慣、余暇身体活動量を調整因子として用いた。被験者を各脂肪酸組成の三等分位で群分けし、二項ロジスティック回帰分析により最小三等分位群に対する他群の脂肪肝症状有りの多変量調整オッズ比を求めた。その後、オッズ比を連続変数とみなし、最小群から 0-2 の数値を割り当てて線形性を評価することで傾向性の検定とした。また、血清脂肪酸組成と NAFL の関連性を評価するために、エタノール摂取量 20 g/day 未満の被験者のみを抽出した 198 名の被験者について同様の解析を行った。

（結果）

血清中ジホモ-γ-リノレン酸の組成比が大きくなるにつれて、脂肪肝および NAFL のオッズ比が上昇する傾向が認められた。

nonalcoholic fatty liver, dihomo-γ-linolenic acid, epidemiology

講演番号：2F37a10
講演日時、会場：3 月 27 日 10:49～ F 校舎 37 会場

肝細胞における脂肪蓄積を抑制する香辛料成分の探索

Screening of inhibitor for hepatic lipid accumulation from spice

○上久保 綾祐[1]、甲斐 建次[2]、内藤 健太郎[3]、赤川 貢[2] ([1]大阪府立大生命環境科学、[2]大阪府立大院生命環境科学、[3]（株）ディーエイチシー)
○Ryosuke KAMIKUBO[1], Kenji KAI[2], Kentaro NAITO[3], Mitsugu AKAGAWA[2] ([1]Osaka Prefecture Univ. Life & Environ. Sci., [2]Osaka Prefecture Univ. Grad. Sch. of Life & Environ. Sci., [3]DHC Corp.)

【背景・目的】生活習慣病患者数の増加にともない，非アルコール性脂肪肝疾患（NAFLD）と呼ばれるアルコール常飲歴のない脂肪肝患者が世界的に急増している．しかし，NAFLD は非アルコール性脂肪肝炎（NASH）や肝硬変，肝癌へと進行する可能性があるにもかかわらず，その有効な治療法は見出されていない．そこで本研究では，古くから薬草や生薬として用いられ，われわれにとって身近な存在である香辛料に焦点をあて，肝細胞において脂肪蓄積を抑制し，NAFLD の予防・改善に繋がるような香辛料成分を探索することを目的とした．
【方法・結果】12 種類の各香辛料の DMSO 抽出液を添加したパルミチン酸含有 DMEM でヒト肝由来細胞株 HepG2 を培養後，蓄積した脂肪を Oil Red O で染色し，その定量を行った．また，肝細胞内で脂質代謝を司るタンパク質である AMP-activated protein kinase (AMPK) のリン酸化レベル，及び AMPK によるリン酸化で不活性化される脂肪酸合成の律速酵素である acetyl-CoA carboxylase (ACC)のリン酸化レベルをウェスタンブロット法により評価した．香辛料抽出液をスクリーニングした結果，インドネシア原産でフトモモ科のクローブ（Clove, *Syzygium aromaticum*）抽出液において，有意な脂肪蓄積量の減少と，AMPK 及び ACC のリン酸化が確認された．また，Oil Red O 染色後の細胞を顕微鏡で観察したところ，クローブ抽出液濃度依存的な脂肪滴の減少が観察された．次に，クローブ中の有効成分を同定するために，クローブをヘキサン，クロロホルム，メタノール，水の順に段階的に抽出し，それぞれの画分を評価したところ，ヘキサン画分が強い活性を示した．この画分を GC/MS 分析に供した結果, 3 種類の化合物が含まれていることが判り，フラグメンテーションパターンの解析から，それらの化合物はオイゲノール，β-カリオフィレン，酢酸オイゲノールであることが判明した．そこで，それぞれの化合物について評価を行ったところ，セスキテルペンである β-カリオフィレンが 100 nM でも有意な脂肪蓄積抑制作用を示すこと，AMPK 及び ACC のリン酸化を濃度依存的に促進すること，そして AMPK 阻害剤である Compound C によって，β-カリオフィレンのこれらの作用は打ち消されることが判った. また, AMPK の下流の転写因子である forkhead box (Fox) O1 及び sterol regulatory element binding protein (SREBP)-1c の細胞内局在を免疫蛍光染色法で調べたところ, β-カリオフィレン処理によって FoxO1 及び SREBP-1c の細胞内での局在が変化し, Compound C によってその作用は打ち消された．以上の結果から，β-カリオフィレンは AMPK 及び ACC のリン酸化を促進し，複数の転写因子を調節して脂肪蓄積を抑制する作用を示すことが明らかになった．

NAFLD, AMPK, clove (*Syzygium aromaticum*)

講演番号：2F37a11
講演日時、会場：3 月 27 日 11:10～ F 校舎 37 会場

紅麹の新規食品機能である脂肪肝抑制機構の解析

Red koji prevents the development of fatty liver induced by high-fat diet in mice

○吉崎 隆之[1,2]、本村 亘[3]、吉崎 由美子[4]、高橋 伸彦[5]、高後 裕[3]、山本 覚[1]([1]福山大生命工、[2]鹿児島大産学官連携推進センター、[3]旭川医大医、[4]鹿児島大農、[5]北海道医療大歯)
○ Takayuki YOSHIZAKI[1,2], Wataru MOTOMURA[3], Yumiko YOSHIZAKI[4], Nobuhiko TAKAHASHI[5], Yutaka KOHGO[3], Satoru YAMAMOTO[1] ([1]Fukuyama Univ., [2]Innovation Center, Kagoshima Univ., [3]Asahikawa Medical Univ., [4]Kagoshima Univ., [5]Health Sciences Univ. of Hokkaido)

【目的】私たちの研究グループでは脂肪肝形成を阻止する新たな分子標的の探索を目的とし，高脂肪食負荷による脂肪肝モデルマウスを使用してその分子メカニズムの解析を行い，その結果核内受容体であるPPARγや脂肪滴表面構成分子ADRP，そしてパンテテイナーゼVanin-1が肝細胞内の脂肪蓄積に関与することなどを報告してきた（BBRC 2005，**336**: 215-22，BBRC 2006, **340**: 1111-8，JCBN 2012, **53**: 163-9）．今回，私たちは血中コレステロールと中性脂肪を下げることなどで知られる“紅麹粉末”を本実験系に取り入れ，紅麹の脂肪肝抑制効果に関する知見を得たので報告する．
【方法】2週齢のC57Bl/6Ncrjマウスに対して脂質カロリー比82%の食餌に10%（w/w）の米粉または紅麹粉末を混ぜたものを投与した．1週間おきにすべてのマウスの体重と血糖値を測定し，0週，2週，4週間後それぞれのマウスについては肝重量および脂肪組織重量を測定した．同時に肝臓については組織切片を作製してHE染色およびオイルレッドO染色により脂肪肝の程度を評価し，さらにリアルタイムPCRにより脂質代謝関連遺伝子の発現量変化を測定した．
【結果】マウスへの高脂肪食投与による脂肪肝形成モデル実験系において，1ヶ月間の紅麹粉末投与の結果，コントロールと比べて体重増加が抑えられること，血糖値の上昇を穏やかにすることを確認した．紅麹粉末を含む高脂肪食を投与開始後2週間および4週間の肝重量および脂肪組織重量の比較では，肝重量においては2週間，4週間両方で，脂肪組織重量においては2週間では有意差はなかったものの，4週間でコントロールと比べ増加が抑えられていることが分かった．

次に，この時取り出した肝臓で作製した肝臓組織切片の HE 染色およびオイルレッド O 染色を行った．投与開始後 2 週間では HE 染色においてはコントロールと明確な差は認められなかったが，オイルレッド O 染色ではコントロールで脂肪が染色されているのに対し，紅麹粉末を与えた方ではほとんど染色されなかった．投与開始後 4 週間においては，HE 染色のコントロールで間隙のようなものが認められるのに対し，紅麹粉末を与えた方では異常は認められなかった．一方，オイルレッド O 染色ではコントロールが強く染色されたのに対し，紅麹粉末を与えた方では僅かに染色されただけだった．

紅麹粉末の投与によって既知の脂質代謝関連遺伝子の発現にどのような影響を与えているかを調べた．その結果，今回調べた遺伝子の中では cell death-inducing DNA Fragmentation Factor, alpha subunit -like effector A（CIDEA）の発現量がコントロールと比べ顕著な差が認められ，紅麹粉末の投与によってこの遺伝子の発現上昇を抑えていることが明らかとなった．

red koji, fatty liver, CIDEA

講演番号：2F37a12
講演日時、会場：3 月 27 日 11:21～ F 校舎 37 会場

ユズ果皮抽出物が高ショ糖食誘発脂肪肝モデルラットに及ぼす影響
Effects of extracts from Citrus-*Yuzu* peel on fatty liver induced by high-sucrose diet in rats.
○宮島 詩織[1]、信岡 かおる[1]、但馬 沙樹[1]、望月 聡[2]、梅木 美樹[2]、石川 雄一[1] ([1]大分大工、[2]大分大教育福祉)
○Shiori MIYAJIMA[1], Kaoru NOBUOKA[1], Saki TAJIMA[1], Satoshi MOCHIZUKI[2], Miki UMEKI[2], Yuichi ISHIKAWA[1] ([1]Eng., Oita Univ., [2]Edu and Welfere Sci., Oita Univ.)

【目的】
これまでの研究により、完熟ユズ果皮のエタノール抽出物には、亢進した I 型アレルギー指標値を軽減する化合物（オーラプテン等のクマリン誘導体など）が含まれることを見出している。この他にも、完熟ユズ果皮は、高い ORAC 値を示す抗酸化物質やポリフェノールが豊富に含まれている。本研究では、抗アレルギー能の他にもユズ果皮の新たな機能性を見出すことを目的としている。今回は、高ショ糖食摂取が様々な脂質代謝異常を引き起こし、メタボリック・シンドロームの一因であると考えられていることから、高ショ糖食誘発脂肪肝に着目し、ユズ果皮抽出物が及ぼす影響を検討した。
【方法】
乾燥完熟ユズ果皮粉末を 95%発酵エタノールにより加熱還流抽出し、その後エタノールを除去しユズ果皮抽出物を得た。５週齢の Wistar 系雄性ラットの飼料中の炭水化物源をすべてブドウ糖あるいはショ糖とした飼料と、それにユズ果皮抽出物を１％または２％添加した飼料を試験群として、７日間自由摂取させた。飼育最終日に血液と肝臓を採取し、血清生化学検査と脂質の分析を行った。次に、ユズ果皮抽出物を画分 A と画分 B に分けた。各画分を飼料に添加してラットに与え、同様の分析を行った。
【結果】
肝臓脂質は、ブドウ糖群に対してショ糖群は有意に増加しており、脂肪肝が生成されていた。また、ショ糖群に対して、ショ糖にユズ果皮抽出物を添加した群では肝臓脂質が減少していた。このことから、ユズ果皮抽出物の脂肪肝抑制効果を確認した。また、その効果は、用量依存的であった。ショ糖群に対して、ショ糖に画分 A を添加した群でも肝臓脂質は有意に減少した。一方、ショ糖に画分 B を添加した群では、脂肪肝抑制効果が認められなかった。これらの結果から、ユズ果皮抽出物は、高ショ糖食により誘発される脂肪肝に対する抑制効果を有することが明らかとなり、ユズ果皮抽出物のうち画分 A に、脂質代謝を改善する成分が含まれていることが示唆された。現在、その有効成分をさらに絞り込んでいる。

Citrus-*Yuzu* peel, high-sucrose diet, fatty liver

講演番号：2F37a13
講演日時、会場：3 月 27 日 11:32～ F 校舎 37 会場

脂肪性肝疾患モデルである *Fxr* 欠損マウスの肝脂質代謝における魚油摂取の影響

Influence of fish oil treatment on hepatic lipid metabolism in NAFLD model, farnesoid X receptor *Fxr*-null mice

○新野 耕平、木下 佑一、杉浦 義正、宮田 昌明 (水大校)
○Kohei SHINNO, Yuichi KINOSHITA, Yoshimasa SHUGIURA, Masaaki MIYATA (Natl. Fish. Univ.)

【目的】Eicosapentaenoic acid (EPA) 、docosahexaenoic acid (DHA) 等の多価不飽和脂肪酸を多く含む魚油は、様々な有益な機能性を有し近年では、脂肪肝や脂肪性肝炎を含む非アルコール性脂肪性肝疾患(non-alcoholic fatty liver disease; NAFLD)の予防に有効であることが明らかになってきた。ところが魚油のこれらの機能がどのような機序によるのかについては、未だ十分には明らかになっていない。脂質の調節において重要な役割を担う核内受容体 farnesoid X receptor (FXR) を欠損したマウス (*Fxr* 欠損マウス) は、脂質代謝異常が認められ、肝内 triglyceride (TG)や遊離脂肪酸レベルが高く、血中 alanine amino transferase (ALT) や alkaline phosphatase (ALP) 等の肝障害マーカーのレベルも高い。このため、*Fxr* 欠損マウスは、NAFLD のモデルであると考えられている。そこで本研究では、*Fxr* 欠損マウスにおける魚油とコーン油摂取での病態や脂質代謝への影響の違いを明らかにするとともに、魚油成分の NAFLD 予防に対する作用機序を解明することを目的とした。
【方法】8～10 週齢の雌性 *Fxr* 欠損マウスに 4 週間にわたり、4%魚油含有精製飼料及び 4%コーン油含有精製飼料を与え、血液ならびに肝臓を採取した。血清中の ALT・ALP 活性、肝内と血清の TG、free fatty acid (FFA) 及び総コレステロール (TC) 濃度はそれぞれ市販のキットで測定した。肝臓の mRNA レベルの測定は、SYBR Premix Ex Taq Ⅱを用いた定量 PCR で実施した。
【結果と考察】魚油群の *Fxr* 欠損マウスの血清中 ALT・ALP 活性レベルはコーン油群に比べて差異は認められなかった。魚油群の肝内の TG と FFA レベルはコーン油群に比べ有意に低値を示し、脂質合成に関与する酵素である *fatty acid synthase* や *stearoyl CoA desaturase 1* 及び、*acetyl-CoA carboxylase 1* の肝内 mRNA レベルも低値を示した。脂肪酸の β-酸化を抑制している *acetyl-CoA carboxylase 2* が有意に低値を示し、脂肪酸の β-酸化に関与する *carnitine palmitoyltransferase 2* では有意に高値を示した。魚油群の TC はコーン油群に比べ有意に低値を示し、コレステロール合成の律速酵素である *3-hydroxyl-3-ethyl-glutaryl CoA reductase* の肝内 mRNA レベルも有意に低値を示した。魚油含有飼料とコーン油含有精製飼料の間では *Fxr* 欠損マウスの肝障害の軽減作用に差異は認められなかったが、魚油は肝内の TG、FFA 及び TC レベルをコーン油に比べてより低下させた。その原因として *Fxr* 欠損マウスの肝脂質合成の低下と脂肪酸分解の亢進の可能性が示された。

fish oil, *Fxr* null, lipid metabolism

講演番号：2F37a14
講演日時、会場：3 月 27 日 11:43～ F 校舎 37 会場

α - リノレン酸高含有リン脂質による非アルコール性脂肪肝炎改善作用
Effect of phospholipids containing α-linolenic acid on non-alcoholic steatohepatitis.
○堂黒 翔太[1]、梶 直人[2]、阿孫 健一[2]、前多 隼人[1] ([1]弘前大院農、[2]興人ライフサイエンス(株))
○Syota Doguro[1], Naoto Kaji[2], Kenichi Ason[2], Hayato Maeda[1] ([1]Hirosaki Univ., [2]Kohjin Life Sciences)

【目的】高度不飽和脂肪酸の体内への取り込みはリン脂質(PL)型の方がトリグリセリド型よりも優れていると言われている。また PL は親水性と疎水性の両方の性質を持つことから、食品中に容易に分散できる利点も持つ。DHA・EPA 結合型 PL を多く含むクリルオイル(KO)はすでに高脂血症や抗炎症の予防改善効果があるとされ、食品素材として利用されている。一方で DHA、EPA 以外の脂肪酸結合型 PL の機能性については検討例が少ない。そこで本研究では n-3 系脂肪酸であるα-リノレン酸結合型 PL を多く含むトルラ酵母由来脂質(TO)及び比較対象として DHA・EPA 結合型 PL の KO による非アルコール性脂肪肝炎(NASH)の改善作用について比較検討を行った。

【方法】乾燥酵母残渣よりエタノールにて脂質成分を抽出した後、カラムクロマトグラフィーにより PL 高含有画分を精製した。4 週齢の雄の C57BL/6J マウスを 1 週間の予備飼育後、高脂肪食にて 7 週間飼育し、食事性肥満マウスを作成した。作成した肥満マウスをコントロール群(豚脂 23%、大豆油 7%飼料)、TO 群(豚脂 23%、大豆油 2%、TO 5%飼料)、KO 群(豚脂 23%、大豆油 2%、KO 5%飼料)に分け、6 週間実験飼育を行った。実験飼育終了後に解剖を行い、各臓器及び脂肪組織重量、血漿成分を測定した。又、肝臓中の炎症性サイトカインの mRNA 発現量を real-time RT-PCR 法により分析した。

【結果】3 群間で臓器及び脂肪組織重量に有意な変化は見られなかった。一方、血漿中の GOT(glutamic oxaloacetic transaminase)、GPT(glutamic pyruvic transaminase)濃度はコントロール群と比較して TO 群及び KO 群で有意な減少を示した。又、肝臓中の IL(interleukin)-6、TNF(tumor necrosis factor)-α、COX(cyclooxygenase)-2、iNOS(inducible nitric oxide synthase)、IL-1β、MCP(monocyte chemoattractant protein)-1 の mRNA 発現は、コントロール群と比較して TO 群及び KO 群で減少傾向又は有意な減少を示した。以上の結果から、α-リノレン酸結合型 PL は DHA・EPA 結合型 PL と同様の傾向を示し、肝臓において抗炎症作用を示すことにより NASH を改善することが示唆された。

phospholipid, α-linolenic acid, non-alcoholic steatohepatitis

講演番号：2F37p01
講演日時、会場：3 月 27 日 14:00～ F 校舎 37 会場

ChREBP アイソフォームを介した糖・脂質代謝関連遺伝子の転写制御機構

Transcriptional regulation of glycolysis / lipogenesis genes via ChREBP isoform

○井上 聖哉、井上 順、Shimizu Makoto、佐藤 隆一郎（東大食品生化学）
○Seiya INOUE, Jun INOUE, Makoto Shimizu, Ryuichiro Sato (Tokyo Univ.)

【目的】

ChREBP(Carbohydrate response element-binding protein)は、糖の刺激に応答して糖・脂質代謝関連遺伝子の発現を誘導する転写因子である。この転写因子には、ChREBP α と ChREBP β の 2 つのアイソフォームが存在する。転写活性が極めて高い ChREBP β は、脂肪組織におけるインスリン感受性と強く相関することが報告されているが、他の組織における機能は不明である。本研究では、肝臓における ChREBP β の機能に焦点を当て、その生理的な役割について検証した。

【方法】

肝臓における ChREBP β の機能を調べるために、アデノウイルスによって ChREBP β を過剰発現させた初代肝実質細胞やマウスの肝臓で、糖・脂質代謝がどのように変化するか調べた。また、フルクトース誘導性脂肪肝との関連を調べるために、スターチ食もしくはフルクトース食を 10 週間与えたマウスの肝臓における ChREBP β 、糖・脂質代謝関連遺伝子の発現量の変化を調べた。

【結果】

ChREBP β を過剰発現させた初代肝実質細胞では解糖系・脂質生合成系酵素遺伝子の発現が増大し、脂肪滴の蓄積が認められた。ChREBP β を過剰発現させたマウスの肝臓では、上記の遺伝子の発現が増大するとともに、顕著な脂肪肝の進行が認められた。さらに、スターチ食を与えたマウスと比較して、フルクトース食を与えたマウスの肝臓では、ChREBP β と糖・脂質代謝関連遺伝子の発現量が増大しており、これと同調して肝脂肪の蓄積が亢進した。

【考察・結論】

以上の結果から、肝臓における ChREBP β の役割は、「解糖系・脂質生合成系酵素の発現誘導を介して糖質から脂肪への変換を強力に誘導すること」であると考えられる。また、フルクトース摂取によって発現が誘導された糖・脂質代謝関連遺伝子の多くが ChREBP の標的遺伝子であることから、フルクトース誘導性脂肪肝の進行に ChREBP β の発現誘導が関与する可能性が示唆された。

ChREBP, Liver, Fructose

講演番号：2F37p02
講演日時、会場：3 月 27 日 14:11～ F 校舎 37 会場

ケルセチンによる apoB 遺伝子の発現調節機構
Transcriptional regulation of apoB gene by quercetin
○清水 誠、李 娟、井上 順、佐藤 隆一郎（東大院・農生化・食生化）
○MAKOTO SHIMIZU, JUAN LI, JUN INOUE, RYUICHIRO SATO (Dept. of Applied Biol. Chem., Grad. Sch. of Agri. and Life Sci., Univ. of Tokyo)

ケルセチンは果実や野菜類に多く含まれるフラボノイドの一つであり、脂質代謝改善や抗酸化作用などの生理機能を有することが知られている。小腸は食事成分の吸収の主要な組織であるため、食品成分が高濃度存在し得る部位である。そのため、他の組織と比較して小腸では機能性食品成分の作用が発揮されやすいことが考えられる。このことより、小腸におけるケルセチンの新たな機能解明を目的としてヒト小腸上皮様 Caco-2 細胞を用いた遺伝子発現解析を行った。その結果、ケルセチンがカイロミクロンの主要なリポタンパク質である apolipoprotein B（apoB）の発現を抑制することを見出した。ケルセチンはその他のリポタンパク質（apoA-I など）の発現も抑制した。ケルセチンの作用機序の解明のため、ヒト apoB 遺伝子のプロモーター解析を行った。その結果、apoB 遺伝子の転写開始点付近にケルセチン応答領域が存在することを見出した。この領域には動物種間で保存されている転写因子 C/EBP の結合配列が含まれていた。レポーターアッセイの結果、ケルセチンは C/EBPbeta による apoB 遺伝子プロモーターの活性化を抑制することが示された。ケルセチンによる C/EBPbeta の mRNA 及びタンパク質の量の変動は見られなかった。また、クロマチン免疫沈降法による解析の結果、ケルセチンは C/EBPbeta の DNA 結合能に対しても影響しないことが示された。さらに、酵母の転写因子 GAL4 の DNA 結合領域と C/EBPbeta の融合タンパク質を用いたルシフェラーゼアッセイの結果、ケルセチンは C/EBPbeta の転写活性を抑制することが示された。ケルセチンと C/EBPbeta の相互作用を検討するため、ケルセチン共有結合ビーズを用いた実験を行った。その結果、ケルセチン共有結合ビーズは C/EBPbeta との相互作用することが示された。さらに、過剰量のケルセチン添加により、この相互作用が競合的に阻害されることが示された。以上の結果から、ケルセチンは小腸細胞において C/EBPbeta タンパク質に結合し、その転写活性を阻害することで apoB 遺伝子の発現を抑制することが示された。apoB はカイロミクロンの重要な構成因子であることから、ケルセチンが小腸の C/EBPbeta を介してリポタンパク質代謝を制御することが考えられる。

quercetin, apoB, C/EBP

講演番号：2F37p03
講演日時、会場：3 月 27 日 14:22～ F 校舎 37 会場

βconglycinin による代謝改善効果の分子機構解析
Effect and mechanism of soy protein ßconglycinin on fat metabolism
○加藤 あすか[1]、橋詰 力[2]、清水 誠[1]、井上 順[1]、佐藤 隆一郎[1] ([1]東大農、[2]東大高齢社会総合研究機構)
○asuka kato[1], tsutomu hashizume[2], makoto shimizu[1], jun inoue[1], ryuichiro sato[1] ([1]Agri. and Life Sci., Univ. of Tokyo, [2]IOG, Univ. of Tokyo)

【背景・目的】
大豆タンパク質の約 20%を占めるβconglycinin（βcon）は、小腸での胆汁酸吸着による脂質の体外排泄促進や、肝臓での脂質合成関連遺伝子の発現抑制作用を有することから、肥満改善効果の高い有用な食品成分であると考えられる。しかし、その作用機構には未解明な点が多いことから、本研究ではβcon による代謝改善作用の機構解析を行った。
【方法・結果】
βcon のマウスへの長期投与により大幅な体重増加抑制、血中脂質の低下、血糖値の低下等の代謝改善作用がみられた。また、単回摂取によっても脂質代謝関連遺伝子の発現が変動することをマイクロアレイ解析から見出した。さらにこのとき、分泌タンパク質である FGF21、及びその転写活性化因子 ATF4 の標的遺伝子群の発現が大幅に亢進していた。そこで、FGF21 欠損マウスを用いてβcon の長期投与実験を行ったところ、体重増加抑制、血糖値低下、脂質合成遺伝子発現低下が減弱していた。また、ATF4 ドミナントネガティブアデノウイルスをマウスに過剰発現させると、βcon 摂食による FGF21 発現上昇が抑制された。これらのことから、βcon の作用には肝臓における ATF4 を介した FGF21 発現誘導が重要であることが示唆された。ATF4 はアミノ酸欠乏時にその翻訳が亢進し、アミノ酸輸送体やアミノ酸合成酵素の発現を正に制御することが知られている。βcon 単回摂食時のマイクロアレイ解析において、ATF4 標的遺伝子であるアミノ酸輸送体 SNAT2 やアミノ酸合成酵素 Psat1, ASNS などの肝臓中 mRNA が有意に上昇していたことから、βcon 摂食によりアミノ酸欠乏が起こる可能性が考えられた。そこで、βcon 摂食直後の門脈血中および肝臓中遊離アミノ酸量を測定したところ、βcon 摂食 2 時間後に必須アミノ酸 Met, Val, Trp, Thr 量が有意に低下していた。さらに、メタボローム解析から SAM や SAH などの含硫化合物量の低下が確認された。このことから、Met の不足が想定されたため、βcon への Met 添加を行ったところ FGF21 発現量が Cas 群と同程度まで低下した。また、βcon のアミノ酸組成を模倣したアミノ酸混合食では FGF21 発現誘導は見られなかった。上記から、βcon 摂食直後に一過的な Met 吸収低下が起こり FGF21 発現を誘起すると考えられた。
【考察】
βcon 特異的な代謝改善応答は、βcon 摂食直後の一過的な Met 吸収低下に伴う門脈血中遊離 Met 量の減少が肝臓における ATF4-FGF21 経路を誘起した結果起こるものと考えられた。

βconglycinin, fat metabolism, FGF21

講演番号：2F37p04
講演日時、会場：3 月 27 日 14:33～ F 校舎 37 会場

中枢神経系におけるアポ E 含有リポタンパク代謝の解析

Analysis of ApoE-containing lipoprotein metabolism in central nervous system

○藤野 貴広（愛媛大総科研）
○Takahiro FUJINO (Ehime Univ.)

アポリポプロテイン E（アポ E）はほとんどのリポタンパクに含まれる糖タンパク質で、リポタンパク代謝においてリポタンパク受容体のリガンドとして機能している。特にアポ B48 を含むリポタンパク・レムナントはアポ E が主要なリガンドとなり、肝臓におけるクリアランスに重要である。また、アポ E は、ABCA1 によるコレステロール排出のアクセプターとして末梢組織に於ける過剰なコレステロールの引き抜きにも重要である。アポ E のアイソフォーム間におけるコレステロール排出能は見かけ上、アポ E2 > アポ E3 ≧ アポ E4 の順であることが知られており、その分子メカニズムは不明であった。我々は、精製アポ E を用いた解析から、ABCA1 によって生成されたアポ E 含有 nascent HDL が LDL 受容体に直接結合し、細胞に取り込まれることを見いだした。すなわち、アポ E アイソフォーム間にコレステロール排出能の違いはなく、その違いは LDL 受容体に対する結合親和性によって生じることを明らかにした。中枢神経系でアポ E は唯一のアポタンパクであり、アポ E を発現するアストロサイトによって nascent HDL が ABCA1 を介して生成され、神経細胞にコレステロールを供給していると考えられている。中枢神経系では LDL 受容体以外にアポ E をリガンドとする受容体が高く発現しているが、その中でも VLDL 受容体や apoER2 受容体はアポ E 含有 nascent HDL とは結合しないことを明らかにしてきた。中枢神経系で発現するヒト・アポ E は不均一な分子種として存在する。これらのアポ E をノイラミニダーゼ処理すると単一バンドとして観察された。また、ノイラミニダーゼ処理により、ピーナッツレクチン（PNA）に対する反応性の上昇が観察されたことから、アポ E の糖鎖はムチン型糖鎖にシアル酸が結合でしたものであることが示唆された。アポ E の糖鎖修飾部位を解析するために、様々な変異体アポ E を作製することで、二カ所の主要糖鎖修飾部位を同定した。 この変異体を用いて糖鎖修飾がアポ E に与える機能的違いについて解析したが、糖鎖修飾アポ E 及び未修飾アポ E の DMPC リポソーム形成能、リポタンパク受容体（LDL 受容体、VLDL 受容体、ApoER2 受容体）に対する結合能、ABCA1 のよるコレステロール排出のアクセプターとしての機能に違いは見いだせなかった。一方で、細胞内に取り込まれたアポ E の安定性が糖鎖修飾の有無によって著しい違いが見出されたことから、細胞内に取り込まれたアポ E のリサイクリングに重要な役割を果たしていることが示唆された。

apoE, lipoprotein, central nervous system

講演番号：2F37p05
講演日時、会場：3 月 27 日 14:44～ F 校舎 37 会場

等カロリーの低脂肪高炭水化物食と高脂肪低炭水化物食が db/db マウスのエネルギー代謝に与える影響

Effects of isocaloric low fat high carbohydrate and high fat low carbohydrate diets on energy metabolism in db/db mice

○池田 英介、伊藤 知美、滋田 芽衣子、石田 良衡、井上 奈穂、池田 郁男（東北大院農）
○Eisuke IKEDA, Tomomi ITO, Meiko SHIGETA, Yoshihira ISHIDA, Nao INOUE, Ikuo IKEDA (Grad. Sch. Agric. Sci. Tohoku Univ.)

【目的】高脂肪食は肥満を誘発すると考えられている。C57BL/6J マウスに、大豆油を用いた低脂肪高炭水化物食と等カロリーの高脂肪低炭水化物食を与えた実験では、摂食開始直後から食餌組成に応じた脂肪および炭水化物消費量の変化が見られたが、総エネルギー消費量に影響はなかった。また、高脂肪食では、腹腔内脂肪の一過性の増加が認められた。本実験では、レプチン受容体を遺伝的に欠損する db/db マウスを用いて同様の実験を行い、エネルギーおよび脂質代謝への影響を調べた。
【方法】試験には 5 週齢雄性 db/db マウスを用いた。試験食は AIN93G に準じて大豆油を 7%添加した低脂肪食高炭水化物食(7%群)と、大豆油を 14%添加し、等カロリーとなるように炭水化物量を減らし、セルロースで重量調整した高脂肪低炭水化物食(14%群)とした。予備飼育 8 日間はすべてのマウスに 7%食を与え、試験開始時に 2 群に分け、一方には 7%食、他方には 14%食を 4 週間与えた。最終日に絶食をせずに屠殺した。本飼育へのエサの切り替え前後と本飼育 3 週目に生体ガス質量分析計を用いてエネルギー代謝量を算出した。
【結果】総摂食量に有意な差はなかったが、14%群では 7%群より体重増加量および摂食効率は高かった。しかし、腹腔内脂肪重量には差がなかった。摂食開始直後では、脂肪、炭水化物およびエネルギー消費量に 2 群間で全く差はなく、高脂肪食に対応できていないことが示唆された。飼育 3 週目では、14%群で 7%群よりも脂肪消費量が高く、炭水化物消費量は低く、高脂肪食への適応が見られた。しかし、いずれの時点でも総エネルギー消費量に差はなかった。血清および肝臓トリアシルグリセロール濃度は群間で差がなかった。肝臓の脂肪酸生合成系酵素である脂肪酸合成酵素(FAS)の活性は 14%群で 7%群より低い傾向を示したが、β酸化系酵素の活性はほとんど影響が認められなかった。
【考察】本研究で用いた db/db マウスでは、高脂肪食による腹腔内脂肪の増加は観察されなかった。エネルギー代謝をみると、このマウスはもともと脂肪消費能が低いと考えられ、摂取開始直後、高脂肪食に適応できなかったが、3 週目ではかなり適応し、脂肪燃焼能が高まることが示唆された。これは先に行った C57BL/6J マウスでの結果とはかなり異なる応答であった。

energy metabolism, db/db mice, high fat diet

講演番号：2F37p06
講演日時、会場：3 月 27 日 15:05～ F 校舎 37 会場

柿未成熟果実由来食物繊維の胆汁酸吸着能に対する加熱の影響

Influence of Heat Treatment on Bile Acid Binding Ability of Persimmon Tannin-rich Fiber

○松本 健司、増田 かおる、武川 加奈子、小柳 喬（石川県大食品）
○Kenji MATSUMOTO, Kaoru MASUDA, Kanako TAKEKAWA, Takashi KOYANAGI (Ishikawa Pref. Univ.)

【目的】我々はこれまでに、柿の未成熟果実による高コレステロール血症予防効果について研究する中で、果実中の重合タンニンに高い胆汁酸吸着能を有することを発見した。柿の未成熟果実から調製した不溶性食物繊維（柿繊維）はこの重合タンニンを多く含んでいるため、高い胆汁酸吸着能を有しており（医薬品であるコレスチラミンの 6 割程度)、高コレステロール血症や 2 型糖尿病の予防のための機能性食品素材として期待できる。柿繊維を日常的に摂取するためにはパンや麺への利用が適していると考えられるが、加工の際には加熱処理が必要である。しかしながら、加熱による柿繊維の胆汁酸吸着能の変化についてはこれまでに研究がなされていない。そこで、本研究では柿繊維の胆汁酸吸着能に対する加熱の影響を明らかにすることを目的とした。
【方法】8 月下旬に石川県で採取した平核無柿から柿繊維を調製し、非熱処理サンプルとした。また、非熱処理サンプルを 120℃または 180℃で 20 分間処理し、熱処理サンプルとした。各サンプルの食物繊維含量とタンニン含量を測定し、4 種類の胆汁酸を用いて in vitro における胆汁酸吸着能を検討した。さらに、柿繊維またはセルロースを 10%（w/w）添加したパンを焼成し、乾燥粉末化した各パンを 20%添加した飼料を作成し、マウス（C57BL/6J）に摂取させ、糞への胆汁酸排泄促進効果を検討した。
【結果】柿繊維は 120℃処理までは色調にあまり変化が無く、機能性成分であるタンニン含量および胆汁酸吸着能は変化しなかった。一方、180℃処理によって褐変とタンニン含量の減少（約 50%に減少）がおこったものの、機能性である胆汁酸吸着能は 2 割の低下にとどまった。動物実験では、セルロース添加パンを摂取した場合、乾燥糞重量が有意に増加したものの、糞中胆汁酸濃度が減少傾向にあったため、結果として糞への胆汁酸排泄量は変化しなかった。それに対し、柿繊維添加パンを摂取した場合、乾燥糞重量は変化しなかったものの、糞中胆汁酸濃度が 2 倍に増加し、糞への胆汁酸排泄量も有意に 2 倍に上昇した（$p<0.001$)。また、この柿繊維添加パンによる胆汁酸排泄促進効果は摂取を中止すると効果が無くなり、糞への胆汁酸排泄量は元の量に戻った。以上のことから、柿繊維の胆汁酸吸着能は 180℃、20 分処理まではある程度耐性があり、パンに加工する程度の熱処理には耐性を有していることが明らかになった。よって、柿繊維はパンに添加可能な機能性食品素材として期待できる。

persimmon, bile acid binding ability, heat treatment

講演番号：2F37p07
講演日時、会場：3 月 27 日 15:16～ F 校舎 37 会場

大豆由来ペプチド VVFLASVS は疎水性相互作用を介してコレステロールのミセル 溶解性を低下させる

Soybean-derived peptides VVFLASVS decreases the micellar solubility of cholesterol via hydrophobic interaction

○久松 賢太郎、秋江 祐希、島田 昌也、岩本 悟志、長岡 利 (岐大応生)
○ Kentaro HISAMATUS, Yuki AKIE, Masaya SHIMADA, Satoshi IWAMOTO, Satoshi NAGAOKA (Gifu Univ.)

【目的】
大豆由来ペプチド VVFLASVS は、医薬品コレスチラミンよりも強力にコレステロールのミセル溶解性を低下させる。さらに、動物実験でもコレステロール吸収を強力に抑制する結果が得られている。コレステロールの溶解には、胆汁酸が形成する混合ミセルに内包されることが不可欠である。コレスチラミンは、胆汁酸を吸着しミセル形成を阻害することでコレステロール吸収を抑制する。一方で、VVFLASVS には強力な胆汁酸結合能がない。このため、VVFLASVS は、コレスチラミンとは異なる機構でコレステロールのミセル溶解性を低下させていることが考えられる。
そこで、本研究では VVFLASVS が胆汁酸や混合ミセルに与える影響を物理・化学的に評価することで、VVFLASVS の持つ強力なコレステロールのミセル溶解性低下の作用機構を明らかにすることを目的とした。
【方法・結果】
まず始めに胆汁酸の臨界ミセル濃度(CMC)を決定した。その結果、胆汁酸は 2.5mM で初めてミセルを形成したことから、CMC を 2.5mM とした。また、ミセルの粒径は約 1.5nm であることを明らかにした。次に、混合ミセルの主要構成成分である胆汁酸をサンプル添加時と非添加時で定量した。その結果、VVFLASVS 添加は、胆汁酸濃度を低下させた。しかし、定量された胆汁酸濃度は CMC 以上であった。一方でコレスチラミン添加では、胆汁酸濃度は CMC 以下であった。このことから、VVFLASVS 添加ではコレスチラミン添加とは異なり胆汁酸によるミセル形成が可能であることが示唆された。
さらに等温滴定型熱量計を用いて、胆汁酸と VVFLASVS との相互作用を解析した。その結果、相互作用はエントロピー優勢であり、両者の間に疎水性相互作用が働いていることが示唆された。
次に、混合ミセルの粒径(nm)を測定した。その結果、混合ミセルの粒径は約 5nm であることを明らかにした。さらに、混合ミセルに VVFLASVS を添加した場合の粒径を測定したところ、粒径は約 1nm となり粒径が小さくなることを明らかにした。胆汁酸のみでのミセルの粒径が約 1.5nm であったことや、VVFLASVS を添加した場合でも胆汁酸は CMC 以上であることから、VVFLASVS 添加によって、脂質を含有していた混合ミセルから、脂質が排泄されたミセルになることが示唆された。
これらのことから、VVFLASVS は、疎水性相互作用を介して、胆汁酸に作用することで、ミセル中に溶解化しているコレステロールを不溶化することを明らかにした。これは胆汁酸のミセル形成を阻害する医薬品コレスチラミンとは異なる新規な作用機構である。

Peptide, Cholesterol, Micelle

講演番号：2F37p08
講演日時、会場：3 月 27 日 15:27～ F 校舎 37 会場

ラクトスタチンは HNF-3alpha 及びカルシウムシグナルを介してコレステロール分解系を活性化する

Lactostatin activates cholesterol degradation via HNF-3alpha and calcium singaling

○磯貝 渚、古田 真優、島田 昌也、長岡 利 (岐大応生)
○Nagisa ISOGAI, Mayu FURUTA, Masaya SHIMADA, Satoshi NAGAOKA (Gifu Univ.)

【目的】

コレステロール 7α-水酸化酵素（CYP7A1）は肝臓のコレステロール分解系律速酵素であり、CYP7A1 遺伝子の活性化により動脈硬化症が抑制されることが知られている。当研究室の研究より、牛乳乳清 β-ラクトグロブリン由来ペプチドであるラクトスタチン（IIAEK）は、ヒト培養肝細胞 HepG2 において、CYP7A1 遺伝子の転写を活性化することを明らかにした [(1)]。現在までに、ラクトスタチンは CYP7A1 転写活性レベルを有意に増加させることが明らかとなっているが、その詳細な機構は明らかにされていない。そこで本研究では、ラクトスタチンが与える影響を HepG2 細胞を用いて評価することで、ラクトスタチンの媒介する新しいコレステロール分解調節系を解明することを目的とした。

【方法・結果】

HepG2 細胞に、CYP7A1 遺伝子プロモーター部位（-371~+24 領域）に対応する配列（野生型）とルシフェラーゼレポーター遺伝子を挿入したリコンビナントプラスミド(hCYP7A1-Luc プラスミド)、および変異型プラスミドを一過性導入し、1mM ラクトスタチンがヒト CYP7A1 転写活性に与える影響をルシフェラーゼアッセイにより検討した。その結果、CYP7A1 プロモーター領域の-299~-289 領域（HNF-3 コンセンサス配列と類似した配列）を欠損した変異体を用いた試験において、ラクトスタチンによる CYP7A1 遺伝子転写活性化が消失した。また、HepG2 細胞に ERK 阻害剤 FR180204 を処理し、1mM ラクトスタチンによる CYP7A1 mRNA レベルの上昇に ERK が関与しているか検討した結果、ERK を阻害することでラクトスタチンによる CYP7A1 mRNA レベルの上昇が消失した。さらに、HepG2 細胞に 6 時間ラクトスタチンを添加し、遺伝子発現を DNA マイクロアレイにより網羅的に評価した結果、カルシウムシグナルに関連する多くの遺伝子が変動した。

以上より、ラクトスタチンはカルシウムシグナルおよび ERK 経路を介して CYP7A1 遺伝子発現を誘導し、ラクトスタチンによる CYP7A1 遺伝子転写活性化は CYP7A1 遺伝子プロモーターの -299~-289 領域に結合する HNF-3α が関与していることを明らかにした。

(1) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 352, 697-702 (2007)

Cholesterol, Lactostatin, HNF-3alpha

講演番号：2F37p09
講演日時、会場：3 月 27 日 15:38～ F 校舎 37 会場

エピガロカテキンガレートはAnnexin A2非依存的にLDL受容体の増加及びPCSK9の低下を誘導する

Epigallocatechin gallate induces an increase of LDL receptor and a reduction of PCSK9 via the Annexin A2-independent manner

○北村 幸平、三島 周平、岡田 雄大、島田 昌也、長岡 利（岐大応生）
○Kohei KITAMURA, Syuhei MISHIMA, Yudai OKADA, Masaya SHIMADA, Satoshi NAGAOKA (Gifu Univ.)

【目的】緑茶に含まれる主要なポリフェノールである Epigallocatechin gallate (EGCG)は血漿低密度リポタンパク質(LDL)レベルの上昇を抑制し、抗動脈硬化作用を示すことが報告されている。さらに、我々はヒト培養肝臓細胞 HepG2 において、EGCG が LDL レベルの調節に重要な役割を果たす LDL 受容体(LDLR)の mRNA レベルを増加させることを報告(*Br. J. Nutr.* (2012) 107:769-773.)した。しかし、その詳細な作用機構は未だ不明な点が多いことから、本研究では HepG2 を用いて、LDLR 及び LDLR の分解促進因子である proprotein convertase subtilisin/kexin 9 (PCSK9)に対する EGCG の作用を解析した。さらに、近年の報告で PCSK9 による LDLR の分解を阻害するとされている Annexin A2 (ANXA2)と EGCG の作用との関連も解析し、EGCG による LDLR 活性化機構の解明を目指した。

【方法】[実験①] HepG2 を EGCG で 24 hr 処理後、全 RNA、細胞タンパク質及び培地を回収した。全 RNA より LDLR 及び PCSK9 の mRNA レベル、細胞タンパク質より LDLR 及び PCSK9 のタンパク質レベルをそれぞれ Real-time 定量 PCR 法、Western blot 法により測定した。さらに、培地中の PCSK9 タンパク質レベルを ELISA 法により測定した。[実験②] EGCG で 24 hr 処理した HepG2 から全 RNA、細胞タンパク質及び培地を回収し、ANXA2 mRNA レベル、細胞の ANXA2 タンパク質レベル及び培地の ANXA2 タンパク質レベルをそれぞれ Real-time 定量 PCR 法、Western blot 法及び ELISA 法により測定した。[実験③] ANXA2 siRNA を導入した HepG2 を EGCG で 24 hr 処理後、全 RNA、細胞タンパク質及び培地を回収した。全 RNA より LDLR、PCSK9 及び ANXA2 の mRNA レベル、細胞タンパク質より LDLR、PCSK9 及び ANXA2 のタンパク質レベルをそれぞれ Real-time 定量 PCR 法、Western blot 法により測定した。さらに、培地中の PCSK9 タンパク質レベルを ELISA 法により測定した。

【結果】以上の実験①~③より、EGCG は LDLR レベルの上昇及び培地中 PCSK9 レベルの低下を同時に誘導することを発見した。また、EGCG は培地中 ANXA2 レベルを有意に低下させることを明らかにした。さらに、EGCG による LDLR 上昇作用や培地中 PCSK9 低下作用は、ANXA2 非依存的な様式で引き起こされることを明らかにした。

Epigallocatechin gallate, LDL receptor, PCSK9

講演番号：2F37p10
講演日時、会場：3 月 27 日 15:49～ F 校舎 37 会場

NPC1L1 依存的なコレステロール取込みを阻害するクロサルノコシカケ由来新規天然物 fomiroid A の同定

Identification of a novel natural product fomiroid A, which inhibits NPC1L1-dependent cholesterol uptake, from the mushroom *Fomitopsis nigra*.

○千場 智尋[1,2,3]、櫻田 剛史[1]、渡邊 理恵[1]、山口 宏二[1]、木村 泰久[2]、木岡 紀幸[2]、河岸 洋和[4,5,6]、松尾 道憲[2,7]、植田 和光[2,3] ([1]ファンケル総研、[2]京大院農、[3]京大 iCeMS、[4]静大院・創造、[5]静大・グリーン研、[6]静大院農、[7]京女大・食物栄養)

○ Tomohiro CHIBA[1,2,3], Tsuyoshi SAKURADA[1], Rie WATANABE[1], Kohji YAMAGUCHI[1], Yasuhisa KIMURA[2], Noriyuki KIOKA[2], Hirokazu KAWAGISHI[4,5,6], Michinori MATSUO[2,7], Kazumitsu UEDA[2,3] ([1]FANCL Research Institute, [2]Grad. Sch. of Agric., Kyoto Univ., [3]iCeMS, Kyoto Univ., [4]Grad. Sch. of Sci. and Tech., Shizuoka Univ., [5]RIGST, Shizuoka Univ., [6]Fac. of Agric., Shizuoka Univ., [7]Dept. of Food and Nutr., Kyoto Women' s Univ.)

【背景・目的】高コレステロール血症は、我が国において死因の上位を占める心筋梗塞や脳梗塞を誘発する動脈硬化症の危険因子であり、血中コレステロール濃度の低下がこれら疾患の予防として重要である。近年、コレステロール吸収阻害剤である ezetimibe が、高コレステロール血症の改善に有効であり、その標的蛋白質が小腸上皮細胞の頂端膜に局在する Niemann-Pick C1-Like 1 (NPC1L1)であることが報告された。ezetimibe は NPC1L1 の第二細胞外ループに直接結合し、その機能を阻害する。しかし、その阻害メカニズムはほとんど不明である。一方、コレステロール等のステロール類は、NPC1L1 の N 末端ドメインに結合するが、更に N 末端ドメインとは異なる第二ステロール結合部位の存在も提唱されている。このように低分子化合物の NPC1L1 における結合部位は複数存在することが推測され、NPC1L1 機能に影響を与える可能性があった。本研究では様々な骨格の化合物を有する植物やキノコの抽出物から NPC1L1 と結合し、ezetimibe と同様にコレステロール取込み阻害作用を示す天然物由来化合物を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】 [^{3}H]ezetimibe-glucuronide及びNPC1L1発現細胞の膜画分を用いて、その結合を阻害する植物やキノコの抽出物を探索した結果、キノコの一種クロサルノコシカケ（*Fomitopsis nigra*）に強い阻害活性を見出した。更に阻害活性を指標として活性化合物の単離及び構造決定を試みたところ、新規化合物であるfomiroid Aを見出した。fomiroid Aと構造が類似し、N末端ドメインに結合するlanosterolや25-hydorxycholesterolに阻害活性が認められなかったことから、fomiroid A結合部位は、N末端ドメイン以外であると思われた。次にNPC1L1のezetimibe結合部位とfomiroid A結合部位の関係性を調べた。ミスフォールディングのため細胞内の小胞体に留まるNPC1L1変異体に対してfomiroid Aを処理したところ、NPC1L1変異体への結合によるフォールディングの是正が起こり、局在が小胞体から細胞膜上へと救済されるファーマコロジカルシャペロン作用が観察された。一方、この変異体に対しezetimibeは同様の効果を示さなかった。この結果よりNPC1L1の主要なfomiroid A結合部位は、ezetimibe結合部位とは異なることが示唆された。最後にNPC1L1発現細胞及び[^{3}H]cholesterolを用いてfomiroid Aの影響を調べた結果、fomiroid A はezetimibeと同様、NPC1L1依存的なコレステロール取込みとコレステロールエステルの形成を濃度依存的に阻害した。

上記結果より、クロサルノコシカケより単離し構造決定した新規化合物のfomiroid Aは、ezetimibeとは異なる結合部位を介してNPC1L1依存的なコレステロール取込みを阻害することが示唆された。

Cholesterol, NPC1L1, lipids

講演番号：2F37p11
講演日時、会場：3 月 27 日 16:10～ F 校舎 37 会場

乳酸発酵豆乳抽出物が高コレステロール食投与ラットの脂質代謝に及ぼす影響

Effects of Lactic Acid-Fermented Soymilk Extract on Lipid Metabolism in Rats Fed a High Cholesterol Diet

○小林 麻貴[1]、江草 信太郎[2]、福田 滿[3]（[1]兵庫大・健康科学、[2]マルサンアイ株式会社、[3]武庫川女子大・生活環境）
○Maki KOBAYASHI[1], Shintaro EGUSA[2], Mitsuru FUKUDA[3]（[1]Hyogo Univ., [2]MARUSAN-AI Co., Ltd., [3]Mukogawa Women's Univ）

【目的】近年、脂質異常症が増加しているが、その予防に有効な大豆食品の摂取量は不足しがちである。大豆食品は血中コレステロール濃度上昇抑制作用や肝臓脂質蓄積抑制作用等の脂質代謝改善効果が報告されている。そのため我々は大豆食品の中でも容易に食生活に取り入れられる豆乳に注目し、さらに植物性食品由来の乳酸菌で発酵させた乳酸発酵豆乳（LFS）を作製した。我々はすでに普通食、高脂肪食、高コレステロール食、高脂肪・高コレステロール食投与ラットにおいて、LFS食投与により血中コレステロール濃度低下作用、肝臓脂質蓄積抑制作用を示すことを報告した。しかし、乳酸発酵豆乳中のイソフラボン単独の効果は明らかになっていない。そのため本研究では乳酸発酵豆乳中のイソフラボンが高コレステロール食投与ラットの脂質代謝に及ぼす影響について検討を行った。
【方法】LFSから70%エタノールを用いてイソフラボンを含む抽出物を調製した。7週齢SD系雄性ラットをAIN-93G 組成飼料で1週間予備飼育した後、AIN-93G組成飼料を引き続き与えたコントロール食群、コントロール食群飼料の1%をコレステロールで置換した高コレステロール食群、高コレステロール食群飼料の4%をLFS抽出物で置換したLFS抽出物食群の3群（各群n=8）に分け5週間飼育した。毎週尾動脈採血を行い、血液成分の分析を行った。飼育終了後、肝臓脂質をFolch法で抽出し、肝臓コレステロール濃度、肝臓トリグリセリド濃度を測定した。さらに肝臓の脂質代謝関連遺伝子の発現量変化をReal time RT-PCR法で調べ比較した。
【結果】コントロール食群と比較して高コレステロール食群、LFS抽出物食群では肝臓脂質量、肝臓コレステロール濃度、肝臓トリグリセリド濃度が有意に高値を示した。特に肝臓コレステロール濃度は高コレステロール食群と比較してLFS抽出物食群で有意に高値を示した。また血中コレステロール濃度もコントロール食群と比較して高コレステロール食群で値が有意に高値を示し、さらに高コレステロール食群よりもLFS抽出物食群で値が有意に高値を示した。肝臓脂質代謝関連遺伝子発現では、CYP7a1遺伝子の発現量がコントロール食群と比較して高コレステロール食群で有意に高値を示し、高コレステロール食群と比較してLFS抽出物食群で有意に高値を示した。またSREBP-2遺伝子の発現量もコントロール食群、高コレステロール食群と比較してLFS抽出物食群で値が有意に高値を示した。FAS遺伝子、SREBP-1遺伝子の発現量もコントロール食群、高コレステロール食群と比較してLFS抽出物食群で有意に高値を示した。以上の結果より、高コレステロール食投与ラットにおけるLFS抽出物単独摂取による脂質代謝改善効果はなく、イソフラボン単独では脂質異常症を促進することが示唆された。

isoflavone, lipid metabolism, high cholesterol diet

講演番号：2F37p12
講演日時、会場：3 月 27 日 16:21～ F 校舎 37 会場

高脂肪高コレステロール食給餌ラットに及ぼすべにふうきエキスと各種ポリフェノールの組み合わせ効果

The combination effects of Benifuuki with various polyphenols in high-fat high-cholesterol diet-fed rats

○蒲原 智子[1]、三好 萌[1]、杉本 光季[1]、平井 静[1]、山本（前田） 万里[2]、江頭 祐嘉合[1]([1]千葉大院・園芸・応生化、[2]（独）農研機構・食総研)
○ Tomoko KAMOHARA[1], Moe MIYOSHI[1], Mitsuki SUGIMOTO[1], Shizuka HIRAI[1], Mari MAEDA-YAMAMOTO[2], Yukari EGASHIRA[1] ([1]Chiba Univ., [2]NARO)

【目的】
高カテキン緑茶であるべにふうきは脂質代謝改善作用、抗アレルギー作用が報告されている。ダイゼインなどのフラボン、ケルセチン、ルチンなどのフラボノイドや、クロロゲン酸、没食子酸、エラグ酸などのポリフェノールは抗炎症作用、脂質代謝改善作用等を有することが知られている。しかし、これらの食品由来成分を組み合わせた際の効果については不明な点が多い。そこで本研究では、ラットにべにふうきエキスと各種ポリフェノールを組み合わせて摂取させた際の組み合わせ効果・有効性について検討することを目的とした。
【方法】
3 週齢の SD 系雄ラットを使用し、4 日間の馴化後、標準食（S）群、高脂肪高コレステロール食（対照：C）群、高脂肪高コレステロール食にそれぞれサンプルを単独で添加したべにふうきエキス（B）群、ケルセチン（Q）群、ルチン（R）群、ダイゼイン（D）群、高脂肪高コレステロール食にべにふうきエキスとそれぞれのサンプルを混合して添加したべにふうきエキス＋ケルセチン（B+Q）群、ルチン群（B+R）群、ダイゼイン（B+D）群に群分けし 10 または 15 日間飼育した。飼育終了後、体重、各組織重量を測定し、血液および肝臓の脂質代謝パラメーターを解析した。また、肝臓の RNA 抽出を行った後、定量 PCR 法によって、脂質代謝の主要遺伝子の発現量を測定した。
【結果】
体重は各群間で有意差はなかった。また、各群間で血中パラメーターに有意な差はなかったが、肝臓重量、肝臓中トリグリセリドおよびコレステロール値は C 群と比べて B+Q 群で有意に低い値となった。機序を調べるために肝臓中の遺伝子発現を測定した結果、HMGCR、SREBP-1c、SREBP-2、ACC1、PPARα、CPT1α の mRNA 発現量は各群差がなく、CYP7A1、FAS、SCD1 の mRNA 発現量は C 群に比べて B+Q 群で有意に低い値を示した。以上の結果から、べにふうきエキスとケルセチンの組み合わせは、脂肪酸合成を抑制することにより肝臓中脂質量を低下させる可能性が示唆された。

Benifuuki, lipid metabolism, cholesterol

講演番号：2F37p13
講演日時、会場：3 月 27 日 16:32～ F 校舎 37 会場

大豆中のβ-コングリシニン量とその分解度が脂質代謝に及ぼす影響

Effect of hydrolyzed soy β-conglycinin on lipid metabolism in rats

○高橋 陽子[1]、石黒 貴寛[2]、高橋 浩司[3]、羽鹿 牧太[3]（[1]農研機構食総研、[2]旭松食品、[3]農研機構作物研）
○Yoko TAKAHASHI[1], Takahiro ISHIGURO[2], Koji TAKAHASHI[3], Makita HAJIKA[3] ([1]NFRI, [2]Asahimatsu Foods Co., Ltd., [3]NICS)

【目的】大豆種子貯蔵タンパク質の主要成分であるβ−コングリシニンは、血中中性脂肪濃度低下作用を有することが報告されている。β−コングリシニンの脂質代謝調節作用機構は未だ不明な点が多く、分離精製されたβ−コングリシニンをはじめ、β−コングリシニン由来ペプチド等の作用についても研究が進められている。本研究では、β−コングリシニンサブユニットの状態が異なる焙煎大豆と蒸煮大豆を用いて、食品加工による β−コングリシニンの分解が脂質代謝調節作用に及ぼす影響を比較した。
【方法】遺伝的にβ−コングリシニン含有量の異なる大豆2系統を、それぞれ焙煎または蒸煮した後、乾燥・粉砕処理し、4 種類の大豆試料を得た。食餌タンパク質源の半分（約 200 g/kg）を大豆由来とした飼料を調製し、雄 SD ラットに 21 日間自由摂食させた。各食餌の脂質および食物繊維量は、70 および 50 g/kg となるよう、大豆油およびセルロース添加により調整した。飼育期間終了後、血清および糞中の脂質濃度と、肝臓の脂質代謝関連酵素の活性および mRNA 発現量を測定した。
【結果と考察】2 種類の大豆に含まれる貯蔵タンパク質のプロファイルは SDS-PAGE にて区別され、焙煎大豆と比べて蒸煮大豆で分解がみられることが確認された。ラット血清中の中性脂肪およびグルコース濃度は、低 β−コングリシニン大豆群と比べて高β−コングリシニン大豆群で、有意差はなかったが低い値を示した。肝臓での脂肪酸合成系酵素の活性および mRNA 発現量は、低 β−コングリシニン大豆群と比べて高β−コングリシニン大豆群で低い傾向が見られ、脂肪酸合成酵素の活性は焙煎大豆群と比べて蒸煮大豆群で有意に低下した。一方、高β−コングリシニン大豆摂取群のうち、蒸煮処理した大豆群では、一部の肝臓脂肪酸酸化系酵素の活性が焙煎大豆群と比べて高くなった。また、糞中の総脂質量は、焙煎大豆よりも蒸煮大豆により有意に低下した。以上のことから、大豆に含まれるβ−コングリシニンは調理方法により分解する可能性があり、大豆中の β−コングリシニン量やタンパク質の分解度は部分的に脂質代謝に影響を及ぼすことが示唆された。

β-conglycinin, hydrolysis, lipid metabolism

講演番号：2F37p14
講演日時、会場：3 月 27 日 16:43～ F 校舎 37 会場

LDL-コレステロールが高めの成人男性に対する魚食の脂質代謝改善効果の検証

Effect of fish intake on lipid metabolism in high normal LDL-cholesterol adult male subjects

○河原崎 正貴[1]、鎌田 彰[1]、矢口 文[1]、江成 宏之[1]、根本 直[2] ([1]マルハニチロ中研、[2]産総研バイオメディカル)
○Masataka KAWARASAKI[1], Akira KAMATA[1], Aya YAGUCHI[1], Hiroyuki EANRI[1], Tadashi NEMOTO[2] ([1]Maruha Nichiro Corporation, [2]AIST)

【背景・目的】肥満・生活習慣病の対策として「食事バランスガイド」で食の啓発活動がされているが、それを日常実践することは難しい。一般消費者の食に対するバランスは、脂質とカロリー、食材では肉、魚、野菜の摂取量を感覚的に認識している程度である。これまでに事前研究として、高カロリー食において、タンパク質と一部の脂質を畜肉あるいは魚肉に置換し、同カロリーで異なるタンパク質と脂質を摂取した時の代謝に与える影響を、動物を用いて評価した。その結果、魚肉配合群では脂肪肝は確認されず、血中コレステロールと血糖値が正常値を維持していた。したがって、血中コレステロールや血糖値が高めな方が魚食を摂ることによって、同様の改善効果が期待できると考えられた。今回は、LDL-コレステロールが高めな成人男性を対象にし、サバの水煮缶を摂取した際の影響を検討した。

【方法】血中 LDL-コレステロールがやや高め(120～160 mg/dL)の成人男性 10 名を対象とし、単群摂取前後比較オープン試験を実施した。1 日摂取目安量である 1 日 1 缶のサバ水煮缶詰(マルハニチロ製)を 8 週間連続摂取していただき、摂取開始前、摂取開始 4 週後および 8 週後に体構造、血圧、血液検査、自覚症状等について調べた。

【結果】体重、体脂肪量、筋肉量、体脂肪率、BMI の各項目は、摂取前と比較して、有意な変化は認められなかった。一方、全体脂肪面積では減少傾向が、皮下脂肪面積については有意な減少が確認された。血中 LDL-コレステロールは、予想通り有意な低下が認められた。また、一部の中性脂肪が高い被験者はその値の改善も認められ、正常値の方には影響を与えないことが確認された。さらに、収縮期血圧、拡張期血圧ともに、摂取期間においては低下の傾向を示す有意な変動が認められた。

DHA や EPA を含む魚油には脂質代謝を改善することがこれまでの多くの研究によっても知られており、今回の脂質改善にも寄与したもの考えられる。また、これまでの動物試験の結果を鑑みると魚肉タンパク質由来の脂質代謝改善の寄与も強く推定された。したがって、日常の食事の中に魚食を 1 品加えることで、食のバランス、ひいては代謝バランスを整えることが期待された。

cholesterol, lipid metabolism, fish

講演番号：2F37p15
講演日時、会場：3 月 27 日 16:54～ F 校舎 37 会場

異なる品種の緑茶によるアテローム性硬化症予防効果に関する検討
Preventive effects of various tea cultivars on atherosclerosis in mice
○野村 幸子、物部 真奈美、江間 かおり、松永 明子（農研機構　野茶研）
○Sachiko NOMURA, Manami MONOBE, Kaori EMA, Akiko MATSUNAGA (NARO Vegetable Tea Science)

【目的】茶（*Camellia sinensis* L.）の機能性成分探索に関する先行研究から、フラボノール含量の高い茶品種が見出された。疫学的には、野菜由来のフラボノイド類の摂取量が心血管系疾患の発症率と負の相関を示すことが証明されており、そのメカニズムとして、ケルセチンがアテローム性硬化症のリスクを軽減させることが報告されている。本研究では、食餌誘導性の高コレステロール血症モデルマウスに茶浸出液を摂取させ、アテローム性硬化症に対する予防効果をフラボノール高含有茶とコントロール茶品種で比較した。
【方法】フラボノール高含有茶（Tea F）あるいはコントロール茶（Tea C）の乾燥茶葉 3 g に対し蒸留水 100 ml を添加し、煮立てたものを総カテキン含量が 150 mg/100 ml 程度となるように酸性水で希釈し、茶浸出液を調製した。それぞれの茶浸出液には同程度のカフェインが含まれていた（約 3 mg/100 ml）。調製した茶浸出液を、高コレステロール食（High Chol）と共に 6 週齢の ICR マウスに自由摂取させ、摂取開始から 4 週間後に一晩絶食後、腋下より血液を採取した。茶を摂取させた２群に加えて、通常食（Low Chol）あるいは High Chol とともに酸性水を与えたコントロール群（Cont）の２群を設けた。採取した血液サンプルは、アテローム性硬化症の血中バイオマーカー測定に用いた
【結果および考察】試験期間中、High Chol の総摂食量は、Cont 群と比較して、Tea C 群、Tea F 群に顕著な違いはみられなかったが、両群とも、Cont 群と比較して体重が少ない傾向にあった。High Chol を投与したマウスは食餌誘導性の高コレステロール血症を示し、Low Chol を投与したマウスと比較して、血中の low density lipoprotein（LDL）コレステロール濃度が有意に高かったが、Tea F あるいは Tea C の摂取は、血中コレステロールの上昇に対して明確な効果を示さなかった。しかし、アテローム性硬化症のより鋭敏な指標となる LOX index は、Tea F 群で有意に減少していた。LOX index は血中の酸化 LDL 濃度と可溶性 lectin-like oxidized LDL receptor-1（LOX-1）濃度から算出されるが、Tea F の摂取によって特に酸化 LDL の低下が顕著であった。Tea C の摂取では同等の効果は得られなかった。両品種の茶浸出液について、カテキン類やカフェインの含量には差がなかったことから、その他フラボノール類などの組成の違いにより、アテローム性硬化症に対する予防効果が発揮されたと思われる。

Green tea (*Camellia sinensis* L.), LOX Index, mice

講演番号：2F37p16
講演日時、会場：3 月 27 日 17:15～ F 校舎 37 会場

週齢の異なる雌雄ラットにおける食事由来酸化コレステロールの代謝

Metabolism of dietary oxidized cholesterol in diffrently-aged male and female rats

○長田 恭一、細野 佑紀子 (明治大・農・農化)
○Kyoichi Osada, Yukiko Hosono (Meiji Univ.)

【目的】コレステロール酸化物（Oxc）はコレステロールが酸化変性して生成する酸化物であり、動脈硬化の発症や進展に関わっていると考えられる。中でも、7-ketocholesterol（7KC）は動脈硬化巣から高濃度で検出されており、動脈硬化発症に深く関与していると考えられている。食事由来で生体内に吸収された 7KC をはじめとする種々の Oxc の代謝経路についてはいくつかの報告があるが、性の違いや加齢の伴う Oxc の代謝変化については不明である。本研究では、性および週齢の異なるラットに Oxc を投与し、体内の Oxc レベルと 7KC の代謝の違いについて検証した。

【方法】6 週齢（Young 群）および 25 週齢（Old 群）の Wistar 系ラット（雌及び雄、それぞれ n＝4-5）を予備飼育した後に 12 時間絶食し、Oxc を 100mg 含むエマルションをゾンデを用いて胃内に強制投与した。投与後は脂質成分を含まないAIN76純化飼料を自由摂食させ、24時間後にエーテル麻酔を施し、腹部動脈より採血死させた。その後、採取した血漿と肝臓中の Oxc レベルを解析した。また、グルココルチコイドを活性型に変換すると共に 7KC を 7β-hydroxycholesterol（7βOHC）に変換する酵素である 11β-hydroxysteroid dehydrogenase type 1（11β-HSD1）および 7KC を 27-hydroxy7KC へ変換する酵素である CYP27A1 の肝臓における遺伝子発現レベルを解析した。

【結果と考察】各群の血漿中の 7β OHC と 7KC レベルに変化はなかった。肝臓では、7β OHC と 7KC レベルに有意な差は認められなかったが、7KC の変換指標となる 7β OHC／7KC 比は、Young 雄群では他群と比較して有意に高くなった。また、11β-HSD1 の mRNA 発現レベルは、Old 雄群が他群と比べて最も高くなり、週齢に関係なく雌群は雄群と比べて低く性の違いで有意な影響が生じた。よって、雄の方が雌よりも 7KC が 7β OHC 代謝されやすく、加齢に伴う動脈硬化発症は雌で生じやすくなるのではないかと予想された。一方、CYP27A1 の mRNA 発現レベルは各群間で有意な差は認められなかったが、Young 群の方が Old 群よりも高い傾向を示し、週齢の違いで影響が生じた。

以上のことから、Oxc の中でも、7KC の代謝は性の違いや加齢によって変化し、その変化が疾病発症の違いに繋がるのではないかと予想された。

oxidized cholesterol, rat, metabolism

講演番号：2F37p17
講演日時、会場：3 月 27 日 17:26～ F 校舎 37 会場

出芽酵母を用いたトランス脂肪酸代謝の解析

Metabolism of trans fatty acid in yeast

中村 豊一、○井澤 真吾（京工繊大応生）
Toyokazu NAKAMURA, ○Shingo IZAWA (Kyoto Inst. Technol.)

トランス型不飽和結合を含むトランス脂肪酸は、天然の食用植物油にはほとんど含まれていないが、水素添加によって作られるマーガリンやショートニングなどの硬化油では高い比率で含まれている商品が存在する。疫学調査の結果からは、トランス脂肪酸の過剰摂取が LDL コレステロールレベルの上昇と心疾患発症リスクの増加、さらには認知症の発症リスク上昇を引き起こすことなどが指摘されており、欧米各国ではトランス脂肪酸の使用規制や表示の義務化などが導入されつつある(*Neurology* **62**:1573-1579, 2004; *N. Engl. J. Med.* **354**:1601-1613, 2006)。しかし、トランス脂肪酸の作用機序などは十分に解明されていないため、規制の判断基準も分子レベルでの根拠に基づいているとは言い難い状況である。そのため、トランス脂肪酸の分子作用機序に関する知見の収集・蓄積が強く求められている。演者らは、脂肪酸を唯一の炭素源として生育できる出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を用いて、トランス脂肪酸の作用機構について研究を行っている。出芽酵母はトランス脂肪酸であるエライジン酸(18:1 *trans*-9)あるいはシス脂肪酸であるオレイン酸 (18:1 *cis*-9)を唯一の炭素源として培養することが可能であり、動物細胞に比べてトランス脂肪酸の影響をより直接的に解析できるという利点をもつ。本研究では、オレイン酸とエライジン酸をそれぞれ炭素源とした培地を用い、トランス脂肪酸が酵母細胞に与える影響について比較検討を行った。

脂肪酸のベータ酸化や呼吸に関わるペルオキシソームとミトコンドリアの形態に有意な違いは見られなかったが、細胞の増殖はオレイン酸培地の方が良好であり、脂肪滴の形成もオレイン酸培地の方が活発であった。また、両脂肪酸混合培地での増殖曲線からは、酵母がエライジン酸よりもオレイン酸を優先的に利用することが示唆された。一方、デサチュラーゼをコードする *OLE1* 遺伝子はオレイン酸培地でその発現が抑制されたが、同じ不飽和脂肪酸であるエライジン酸の培地では *OLE1* の転写レベル・タンパク質レベルの両方が上昇していた。また、脂肪酸を中性化できないアシル基転移酵素欠損株(*are1*Δ*are2*Δ*dga1*Δ*lro1*Δ)は、オレイン酸培地で増殖できなかったのに対し、エライジン酸培地では増殖可能であった。さらに、*are1*Δ*are2*Δ*dga1*Δ*lro1*Δ株以外にも両脂肪酸培地での生育が明らかに異なる変異株が確認された。これらの結果は、オレイン酸とそのトランス異性体であるエライジン酸が酵母の脂質代謝に対して異なる影響を及ぼすことを示しており、*S. cerevisiae* はトランス脂肪酸をシス脂肪酸に容易に変換できないと考えられた。

trans fatty acid, oleic acid, elaidic acid

講演番号：2F37p18
講演日時、会場：3 月 27 日 17:37～ F 校舎 37 会場

培養細胞由来の脂肪滴の脂質抽出物を用いた脂肪滴様エマルションと脂肪滴サイズの関連性

The relation between lipid droplet size and lipid emulsion using lipid extraction from lipid droplets of cultured cells

○有澤 琴子、市 育代、杉本 静、藤原 葉子（お茶大院ライフ）
○KOTOKO ARISAWA, IKUYO ICHI, SHIZUKA SUGIMOTO, YOKO FUJIWARA (Ochanomizu Univ.)

脂肪細胞において中性脂肪は脂肪滴として蓄積され、脂肪の蓄積に応じて脂肪滴は肥大化することが知られている。脂肪滴はリン脂質の一重膜が中性脂肪を囲んだ構造をしており、リン脂質一重膜の組成は脂肪滴膜タンパク質の働きを介して脂肪滴形成に関与することが最近報告されてきた。しかし、肥大化した脂肪滴に特徴的な膜の脂質組成（リン脂質・脂肪酸など）に対する知見は乏しく、脂肪滴を構成する脂質の組成と脂肪滴サイズとの関連性は明らかになっていない。我々はこれまでの研究において脂肪滴サイズにより脂肪滴の膜リン脂質脂肪酸組成が異なることを示しており、脂肪滴を構成する脂質の生物物理的性質が脂肪滴のサイズを規定するという可能性を示唆している。本研究では、脂肪滴サイズの異なる培養細胞から脂肪滴を分画し、脂肪滴由来の脂質を用いて試験管内で脂肪滴様エマルションを作製することで、脂肪滴の脂質組成と脂肪滴サイズの関連性を検討した。

脂肪滴に局在し脂質貯蔵を制御する Perilipin1（PLIN）と、脂肪滴の融合に関わる Fat specific protein 27（FSP27）は、細胞内で脂肪滴を肥大化・安定化させ大きなサイズに保つ働きを持つことが知られている。これらの遺伝子を、レトロウイルスを用いてマウス NIH3T3 細胞に安定発現させ(PLIN 細胞、FSP27 細胞)、コントロールには空ベクターを導入した（mock 細胞)。各細胞に混合脂肪酸 1 mM を添加して脂肪滴を形成させ、Oil Red O で染色し観察すると、FSP27 細胞でのみ脂肪滴の肥大化が見られ、mock 細胞、PLIN 細胞に比べて大きいサイズの脂肪滴が多数見られた。また、各細胞内の中性脂肪量を測定したところ、中性脂肪量に顕著な差は見られなかった。

次にこれらの細胞から脂肪滴を分画し、Bligh&Dyer 法により脂肪滴からの脂質抽出を行った。窒素乾固した脂質抽出物に Tris-NaCl バッファーを加え超音波処理し、エマルションを形成させた。二重膜のベシクルを取り除くため超遠心にかけ、遠心後の上層を脂肪滴様エマルション画分として回収、観察した。その結果、FSP27 細胞では大きなサイズのエマルションが多数観察されたのに対して mock 細胞、PLIN 細胞ではほとんどが小型のエマルションであり、細胞での観察結果と一致していた。今回、脂質抽出物のみで脂肪滴サイズの違いが見られたことから、脂肪滴を構成する脂質組成の違いが脂肪滴サイズの拡大に関与していることが示唆された。

lipid droplet, perilipin, FSP27

講演番号：2F37p19
講演日時、会場：3 月 27 日 17:48～ F 校舎 37 会場

黒豆由来 Cyanidin-3-glucoside による骨格筋の代謝活性化作用の解析

The metabolism enhancement effect of Cyanidin-3-glucoside derived from black soybean in skeletal muscle

○松川 隼也[1]、VILLAREAL Myra[2,3]、礒田 博子[2,3] ([1]筑波大院生命環境、[2]筑波大生命環境系、[3]筑波大北アフリカ研究センター)
○Toshiya MATSUKAWA[1], Myra VILLAREAL[2,3], Hiroko ISODA[2,3] ([1]Graduate School of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba, [2]Faculty of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba, [3]ARENA)

【目的】
生活習慣病の一つである肥満は、糖尿病・高血圧・動脈硬化などの他の生活習慣病の発症リスクを高めることから、その予防は特に重要である。肥満では、ミトコンドリアの機能障害などによって、生体内の代謝機能が低下するため、代謝活性化は肥満予防・改善に有効である。近年、食資源由来成分であるポリフェノール類には、代謝機能を活性化させることによる抗肥満効果が報告されている。これまでに我々は、黒豆の種皮に豊富に含まれるアントシアニンである Cyanidin-3-glucoside (Cy3G) に抗肥満効果があることを見出し、昨年度の本大会において報告を行った。しかしながら、Cy3G による抗肥満効果に関する研究の多くは脂肪細胞・組織にフォーカスされたものであり、代謝の主要な組織である骨格筋への影響についてはほとんど知られていない。そこで本研究では、骨格筋のモデル細胞である C2C12 筋管細胞を用いて、Cy3G の骨格筋の代謝機能に与える影響について評価、及び、その作用機序について解析を行った。
【方法】
Cy3G の骨格筋の代謝機能に与える影響の評価するために、骨格筋のモデル細胞である C2C12 筋管細胞を使用した。まず、C2C12 筋芽細胞より分化した C2C12 筋管細胞に Cy3G の処理を行った。その後、ミトコンドリア活性、細胞内 ATP 産生量、ミトコンドリア関連遺伝子の発現、リン酸化タンパク質の発現の定量を行った。
【結果・考察】
Cy3G を C2C12 筋管細胞に処理することによって、ミトコンドリア活性・細胞内 ATP 産生量の増大を認めたことから、Cy3G による骨格筋の代謝活性化作用が示された。また、ミトコンドリアの増進・活性化に関与する *PGC-1α*、*TFAM*、及び、ミトコンドリア膜タンパク質である *CPT-1β* の発現の増大を認めた。さらに、Cy3G 処理によるリン酸化 AMPK の発現増加を認めた。
以上のことから、Cy3G は AMPK 経路を介して、*PGC-1α*、*TFAM* の発現を増大させることによって、ミトコンドリアの増進・活性化を誘導し、骨格筋の代謝機能を活性化させることが示された。このことは、Cy3G による抗肥満効果に骨格筋の代謝活性化作用が関与している可能性を示す。現在、Cy3G の詳細な作用機序の解明のため、Cy3G の制御する AMPK の上流経路について検証を行っているところである。本大会ではこの結果も合わせて報告を行う予定である。

Cyanidin-3-glucoside, skeletal muscle, metabolism

講演番号：2F37p20
講演日時、会場：3 月 27 日 17:59～ F 校舎 37 会場

酢酸はラット培養筋管細胞において AMPK 活性化を介して *glut4* の発現を亢進する

Metabolism of exogenous acetic acid induces *glut4* expression through activation of AMP-activated protein kinase in rat L6 myotube cells

○吉村 征浩、丸田 ひとみ、荒木 彩、木本 眞順美、高橋 吉孝、山下 広美（岡山県大）
○Yukihiro Yoshimura, Hitomi Maruta, Aya Araki, Masumi Kimoto, Yoshitaka Takahashi, Hiromi Yamashita (OPU)

骨格筋は積極的にグルコースを取り込み、全身の血糖値をコントロールする重要な器官の一つである。AMP-Activated Protein Kinase（AMPK）は AMP により活性化され、グルコーストランスポーター４（GLUT4）の発現上昇を介して、骨格筋におけるグルコース取り込みを制御している。経口投与された酢酸は、速やかに消化器官から体内に吸収され血流に乗り、末梢組織に取り込まれ利用される。酢酸は骨格筋細胞に取り込まれた後、アセチル CoA 合成酵素の作用によりアセチル CoA へと変換される。その際、同時に AMP が生じるため、酢酸代謝により AMPK 活性化が起こることが期待される。本研究において我々は、ラット培養筋管細胞を骨格筋細胞のモデルとして用い、酢酸を添加することにより AMPK 活性化を介した GLUT4 発現亢進が引き起こされるかを検討した。添加された酢酸は速やかに筋管細胞に取り込まれ、細胞内の AMP を増加させるだけでなく、顕著な AMPK のリン酸化を引き起こし、AMPK 活性を増加させた。また、酢酸添加により筋管細胞における GLUT4 の発現が、タンパク質レベル、mRNA レベルで増加し、グルコースの取り込みも上昇した。これらの酢酸添加による GLUT4 発現上昇の効果は、AMPK 特異的阻害剤であるコンパウンド C の前処理により完全に消失したことから、酢酸は筋管細胞において AMPK 活性化を介して、*glut4* 発現を上昇させることが分かった。以上の結果は、酢酸が骨格筋における GLUT4 の発現上昇を介して、血糖値を低下させ、糖尿病における病態を改善し得ることを示唆している。

acetic acid, AMPK, GLUT4

講演番号：2F45a01
講演日時、会場：3 月 27 日 09:00～ F 校舎 45 会場

脂肪細胞分化促進作用を有するビワ葉由来物質の探索

Search for the functional components promoting adipocyte differentiation in loquat (*Eriobotrya japonica*) leaves

○神田 尚幸[1]、平井 静[1]、大江 靖雄[2]、江頭 祐嘉合[1] ([1]千葉大・園芸・応生化、[2]千葉大・園芸・食資)
○Naoyuki KANDA[1], Shizuka HIRAI[1], Yasuo OHE[2], Yukari EGASHIRA[1] ([1]Chiba univ., [2]Chiba university)

【背景・目的】

現在日本を含む先進諸国を中心に、肥満やメタボリックシンドロームを呈する人口の増加が社会問題となっている。肥満によって生じる肥大化脂肪細胞からは TNF-α などの炎症性アディポサイトカインが分泌され、それによってインスリン抵抗性が誘発され、メタボリックシンドローム発症の原因となる。一方、小型脂肪細胞は、アディポネクチンを多量に分泌し、肥満やインスリン抵抗性の改善を誘導する。核内受容体型転写因子である Peroxisome Proliferator-Activated Receptor（PPAR）γ は、脂肪細胞分化のマスターレギュレーターとして機能する。抗糖尿病薬として使用されていたチアゾリジン誘導体は、PPARγ を活性化させ、脂肪細胞分化を促進することで小型脂肪細胞数を増加させる。しかし、薬剤の強力な作用により肥満を誘発するなどの副作用が報告されており、穏やかに脂肪細胞分化を促進する、副作用のない食品由来成分が注目されている。そこで本試験では、古くから東洋医学において利用され、現在、抗炎症作用や抗糖尿病作用が報告されているビワ（*Eriobotrya japonica*）葉中から脂肪細胞分化を促進する物質を探索することを目的に実験を行った。

【方法】

アフリカミドリザル腎臓由来 CV-1 細胞に PPARγ レポーターベクターを導入し、その 4 時間後にビワ葉凍結乾燥サンプルの水抽出物（80℃ 3 時間抽出）を添加した。24 時間後にルシフェラーゼ活性を測定し、ビワ葉水抽出物が有する PPARγ アゴニスト活性を評価した（実験 1)。マウス由来 3T3-L1 前駆脂肪細胞が成熟脂肪細胞へと分化する期間を通して、各濃度のビワ葉水抽出物を添加し、脂肪滴の蓄積に及ぼす影響を Oil Red O 染色により評価した（実験 2)。ビワ葉水抽出物を逆相高速液体クロマトグラフィー(HPLC)により分画し、回収したフラクションを実験 2 と同様に 3T3-L1 細胞へ添加し、脂肪細胞分化促進作用を示すフラクションの絞り込みを行った（実験 3)。

【結果・考察】

PPARγ レポーターアッセイの結果、ビワ葉水抽出物は PPARγ 活性を濃度依存的に促進し、PPARγ アゴニスト作用を示した。また、ビワ葉水抽出物は 3T3-L1 脂肪細胞における脂肪滴の蓄積を濃度依存的に促進した。そこで、ビワ葉水抽出物を逆相 HPLC によって分画したところ、3T3-L1 前駆脂肪細胞における脂肪滴の蓄積を促進するフラクションが見出され、この中に PPARγ アゴニスト作用を有する成分が存在することが考えられた。

adipocyte differentiation, PPARγ, loquat leaves

講演番号：2F45a02
講演日時、会場：3 月 27 日 09:11～ F 校舎 45 会場

フェルラ酸の脂質代謝異常および慢性炎症への影響

Effects of ferulic acid on dyslipidemia and chronic inflammation

○上野 有紀、竹市 真奈、濱田 愛、山田 雄太、西川 佳那、大澤 俊彦（愛知学院大心身科学）
○Yuki UENO, Mana TAKEICHI, Ai HAMADA, Yuta YAMADA, Kana NISHIKAWA, Toshihiko OSAWA (Aichi Gakuin Univ.)

【目的】

糖尿病における脂肪毒性は、細胞・組織における慢性炎症を引き起こし、インスリン抵抗性や糖尿病性腎症の発症に関与すると言われている。本研究では、糖尿病モデルマウスを用いて、米ぬかに豊富に含まれるフェノール性化合物のフェルラ酸（FA）による脂質代謝異常と腎臓での炎症への影響を検討した。

【方法】

肥満・糖尿病モデルマウス ob/ob マウスと対照系統+/+マウス（5 週齢、雄）を 1 週間の予備飼育後、+/+マウスにはコントロール食、ob/ob マウスは 0.5%FA 含有食、または非含有食にて飼育した。組織における遺伝子発現は、DNA マイクロアレイ法、およびリアルタイム PCR 法により測定した。

【結果】

ob/ob マウス＋コントロール食群（DM+con）では、+/+マウス＋コントロール食群（non-DM+con）と比較して、血清トリグリセリドが増加したのに対し、ob/ob マウス+FA 群（DM+FA）では DM+con より低下した。肝臓における脂肪酸合成酵素（FAS）mRNA は、DM+con での増加が DM+FA において抑制された。AMP キナーゼ mRNA は、DM+con で低下したのに対し、DM+FA においてその低下を抑制した。また、腎臓におけるサイトカイン（TGF-β、IL-6、ICAM-1、MCP－１）の mRNA は、non-DM+con と比較して DM+con では増加したのに対し、DM+FA では DM+con より低下した。

【考察】

FA は、糖尿病モデル動物での肝臓における脂肪酸合成の増加を抑制し、脂肪酸酸化の低下を抑制したことから、脂質異常症の改善に働く可能性が考えられた。また、FA は糖尿病モデル動物の腎臓において、糖尿病性腎症の発症に関与するサイトカインの過剰発現を低下させた。これらの結果から、FA は脂質代謝異常および糖尿病性腎症進展に関与する炎症を抑制する可能性が示唆された。

ferulic acid, dyslipidemia, inflammation

講演番号：2F45a03
講演日時、会場：3 月 27 日 09:22～ F 校舎 45 会場

高エネルギー食摂取が世代を超えて肥満発症リスクに及ぼす影響

The effect of high-energy diet intake beyond one generation on the obesity risk

○畠山 雄有、都築 毅 (東北大院農)
○Yu Hatakeyama, Tsuyoshi Tsuduki (Tohoku Univ.)

【背景・目的】
肥満の予防は世界的な課題であり、肥満発症のメカニズムに関する研究の重要性が高まっている。肥満の主な要因としてはエネルギーの過剰摂取や運動不足が挙げられるが、いくつかの研究により、親の食生活が子の肥満発症リスクに影響を及ぼすことが明らかになった [1]。さらに、最近我々が行った研究から、3 世代にわたって高エネルギー食 (HD) を摂取したマウスでは、後の世代ほど肥満が重度になることが明らかとなり [2]、HD の影響が孫世代まで及ぶことが示唆された。また、この結果を受け、HD 摂取による子孫への影響は「親から子に」だけではなく、「親から孫に」も直接影響する可能性が考えられた。そこで本研究では親世代 (P) の HD 摂取が孫世代 (F2) の肥満に与える影響についてマウスを用いて検討することとした。
【実験方法】
3 週齢の ICR マウス (P) を高エネルギー食 (HD) で飼育した。8 週齢で一部を交配し、残りは 15 週齢で解剖した。続いて、P 群の仔 (F1) を離乳後コントロール食 (CD) で飼育した。F1 群の一部を 8 週齢で交配し、残りは 15 週齢で解剖した。F1 群の仔 (F2) は離乳後 HD で飼育し、15 週齢で解剖した。飼育期間中、体重と摂食量を測定した。また、解剖後に血清と肝臓の各種パラメーターを測定した。
【結果】
親世代の高エネルギー食摂取によって、孫世代の肥満発症リスクに世代を超えた影響が現れることが明らかとなった。
【参考文献】
[1] T. Tsuduki, Y. Kitano, T. Honma, R. Kijima, I. Ikeda. High dietary fat intake during lactation promotes development of diet-induced obesity in male offspring of mice. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)*, 2013; 59: 384-392.
[2]M. Takasaki, T. Honma, M. Yanaka, K. Sato, N. Shinohara, Y. Tanaka, T. Tsuduki, I. Ikeda. Continuous intake of a high-fat diet beyond one generation promotes lipid accumulation in liver and white adipose tissue of female mice. *J. Nutr. Biochem.*, 2012; 23(6): 640-645.

obesity, DOHaD, mice

講演番号：2F45a04
講演日時、会場：3 月 27 日 09:33～ F 校舎 45 会場

高脂肪負荷マウスへの自然薯ムカゴ投与の影響

Effects of wild yam propagules on high-fat loaded mice

○篠崎 文夏[1]、亀井 飛鳥[1]、渡部 由貴[1]、安岡 顕人[1]、近藤 香[1]、荒井 綜一[1,2]、近藤 隆[1]、阿部 啓子[1,3] ([1]神奈川科学技術アカデミー、[2]東農大総研、[3]東大院農生科・応生化)
○ Fumika SHINOZAKI[1], Asuka KAMEI[1], Yuki WATANABE[1], Akihito YASUOKA[1], Kaori KONDO[1], Soichi ARAI[1,2], Takashi KONDO[1], Keiko ABE[1,3] ([1]KAST, [2]Tokyo Univ. of Agri., [3]The Univ. of Tokyo)

【目的】自然薯 *Dioscorea japonica* は、滋養強壮、血糖降下作用や消化吸収促進作用などがあるとされ、重用されている。しかし、自然薯の葉の根元にできる栄養繁殖器官であるムカゴについては機能性に関する知見はほとんどない。我々は自然薯ムカゴの栄養成分、ポリフェノール含量および抗酸化能などを測定し、比較的ポリフェノール含量および抗酸化能が高いことを見出し、自然薯ムカゴが生理的機能性を有すると推察した。これまでに、自然薯ムカゴ摂取が高脂肪負荷マウス肝臓において脂質代謝関連遺伝子を変動させることを報告したのに続いて、本研究は高脂肪負荷マウスを用いて、自然薯ムカゴ摂取時の肝臓における遺伝子発現変動をさらに詳細に解析し、自然薯ムカゴの生理的機能を評価することを目的とした。
【方法】神奈川県伊勢原市産のムカゴは皮ごとスチーム加熱した後凍結乾燥を行い、微粉末化した。ムカゴ粉末の餌への添加はα―コンスターチと置き換えて全体の５％とした。動物実験はマウス(C57BL/6J、雄、3 週齢)を用いた。1 週間馴化後、試験食として通常脂肪餌、高脂肪餌、および高脂肪餌に加熱ムカゴ粉末を添加した餌（高脂肪ムカゴ餌）を与え、4 週間飼育した。餌と水は自由摂取とした。解剖は 16 時間の絶食後に行った。摘出した肝臓からトータル RNA を抽出し、DNA マイクロアレイによって遺伝子発現を解析した。
【結果】高脂肪餌群と高脂肪ムカゴ群で遺伝子発現を比較すると、高脂肪ムカゴ餌群の方が発現上昇したプローブセットは 827 個、発現低下したプローブセットは 330 個であった。これらの変動プローブセットのうち、通常脂肪餌群と高脂肪餌群との比較で発現変動したプローブセットと逆に方向に変動したもの、すなわち高脂肪餌の影響を解除したと考えられるプローブセットは高脂肪餌で低下し高脂肪ムカゴ餌で上昇したものが 135、逆に高脂肪餌で上昇し高脂肪ムカゴ餌で低下したものが 97 個あった。これらがどのような機能を持つものであるか調べたところ、高脂肪餌で低下し高脂肪ムカゴ餌で上昇したものは、酸化還元、脂質代謝、抗アポトーシスに関連するものであった。また、高脂肪餌で上昇し高脂肪ムカゴ餌で低下したものは細胞外マトリックス、コラーゲン代謝関連であった。以上の結果から、自然薯ムカゴ摂取は高脂肪負荷よって引き起こされるコラーゲン等の細胞外マトリックスの過剰な蓄積による肝障害の発生を遅延させると示唆された。

propagule, DNA microarray, high-fat diet

講演番号：2F45a05
講演日時、会場：3 月 27 日 09:44～ F 校舎 45 会場

長期高脂肪・高ショ糖食摂取マウスにおけるリンゴプロシアニジン類の尿中メタボロームへの影響

Effects of apple procyanidins on the metabolites in the urine of mouse feeding high-fat/high-sucrose diet

○庄司 俊彦[1]、升本 早枝子[2]、寺尾 明莉[2]、向井 孝夫[2]、三浦 富智[3]([1]農研機構・果樹研、[2]北里大・獣医、[3]弘前大院・保健)
○Toshihiko SHOJI[1], Saeko Masumoto[2], Akari Terao[2], Takao Mukai[2], Tomisato Miura[3] ([1]National Institute of Fruit Tree Science, [2]Kitazato University, [3]Hirosaki University)

【目的】プロシアニジン類はリンゴなどの果実中の主要なフラボノイド類で、カテキン類が複数重合しており、様々な機能性が報告されている。しかしながら、生体利用性が低く、特に、高重合体の生理機能性については不明な点が多い。本研究では、高脂肪・高ショ糖食の長期摂取マウスにおける肥満・脂質代謝に与えるプロシアニジン類の影響を検討するとともに、尿中代謝物を四重極・飛行時間型質量分析計（Q-TOF/MS）を用いて分析し、プロシアニジン類の生体利用性と機能性との関係について検討する。
【方法】既報に従ってリンゴよりプロシアニジン画分（APC）を調製し、さらに、順相クロマトグラフィーによってプロシアニジン低重合体画分（単量体から四量体; OP）とプロシアニジン高重合体画分（五量体以上; PP）に分画し、動物試験（雄性四週齢 C57BL/6J マウス）に供した。マウスは普通食（ND）群、高脂肪高ショ糖食（HFSD）群、高脂肪高ショ糖食群+APC（APC）群、高脂肪高ショ糖食＋OP（OP）群、高脂肪高ショ糖食＋PP（PP）群の５群に分け、各々自由飲水によって試料を摂取させた。20 週間飼育後、解剖を行い肝臓および脂肪組織重量の測定、血液生化学的一般成分分析を行なった。さらに、尿中代謝物は Q-TOF/MS により分析した後、代謝物の保持時間と *m/z* データをアライメントし、MarkerView® (AB Sciex) による主成分解析（PCA）行い、各群間のグルーピングを行った。さらに、ローディングプロットによって、各投与群のグルーピングに寄与する代謝物を特定し、精密質量や MS/MS によるプロダクトイオンのピークリストからその構造を推定した。
【結果と考察】20 週経過後、各群の体重は HFS 群と比較して APC 群の体重増加が有意に抑制された（$p<0.05$）。また、生体利用性が低い PP 群の体重増加も、APC 群や OP 群と同様に HFSD 群と比較し有意に抑制されていた（$p<0.05$）。尿中代謝物の PCA 解析の結果、５群は明確にグルーピングされ、各投与物に特異的なメタボライトが関与していると思われた。APC 群および OP 群の代謝物として、カテキン類のメチル化体あるいは硫酸、グルクロン酸抱合体が多数みられた。また、腸内細菌による分解物が多数検出された。一方、PP 群では、カテキン関連代謝物は見られず、トリプトファン代謝物などの内在性の代謝物が検出された。以上のことから PP は生体利用性は低いにもかかわらず、腸内環境を変化させ、生体恒常性に作用していることが示唆された。

Apple procyanidins, Obesity, Metabolomics

講演番号：2F45a06
講演日時、会場：3 月 27 日 10:05～ F 校舎 45 会場

ジペプチドによるインクレチン加水分解酵素阻害データの網羅的取得とその応用

Comprehensive analysis to identify dipeptides with inhibitory effects for human dipeptidyl peptidase IV

○伊藤 圭祐[1]、大野 真澄[1]、Vu Thi Tuyet Lan[1]、本山 貴康[2]、楠畑 雅[3]、遠目塚 千紗[3]、小山 洋一[3]、伊藤 創平[1]、河原崎 泰昌[1]([1]静県大院・薬食、[2]不二製油・基盤研、[3]ニッピ・バイオマトリックス研)
○Keisuke ITO[1], Masumi OHNO[1], Lan VU THI TUYET[1], Takayasu MOTOYAMA[2], Masashi KUSUBATA[3], Chisa TOMETSUKA[3], Yoh-ichi KOYAMA[3], Sohei ITO[1], Yasuaki KAWARASAKI[1] ([1]Univ. Shizuoka, [2]Fujioil Co., Ltd., [3]Nippi, Inc.)

ヒトジペプチジルペプチダーゼ（hDPP）IV はインクレチンを加水分解する血中プロテアーゼであり、その阻害剤には抗 2 型糖尿病効果が期待できる。ジ・トリペプチドは輸送体への親和性に応じて生体へ吸収される有望な食品機能成分である[1)]。これまでの解析から、アミノ酸は hDPPIV 阻害効果をほとんど示さず、またジペプチドの阻害効果はトリペプチドよりも高いことが明らかとなっている。そこで本研究では、ジペプチドによる hDPPIV 阻害効果の網羅的解析データを取得した。

hDPPIV 阻害効果に応じてジペプチドを 1 位～337 位までランキングした結果[2)]、ランキング 1 位のジペプチドは Trp-Arg （IC_{50}=0.020 mM）であった。阻害強度と過去の論文報告の有無は無関係であり、TOP17 のジペプチドからも 5 個の新規 hDPPIV 阻害ペプチド（Thr-His, Asn-His, Val-Leu, Met-Leu, Met-Met）が発見された。得られた網羅的解析データを用いることで、大豆ペプチド素材に含まれ、hDPPIV 阻害効果への寄与が大きい 9 個のペプチドが特定され、さらにアミノ酸配列における hDPPIV 阻害ペプチドの出現頻度とその阻害強度から、hDPPIV 阻害ペプチド源としての各種食品タンパク質のポテンシャルが評価された。

また、Trp-Arg の派生ペプチドより、世界初の不競合型 hDPPIV 阻害ペプチド Trp-Arg-Glu を発見した[3)]。作用メカニズムの解析により、Trp-Arg-Glu は hDPPIV の基質結合ポケットに覆い被さるように結合することが示唆されたため、続いて hDPPIV を阻害する各種食品素材との共存下における影響を解析した。その結果、Trp-Arg-Glu とコラーゲンペプチド素材の組み合わせにより、hDPPIV 阻害効果は相乗的に増強された。大豆ペプチド素材、カゼインペプチド素材との組み合わせではそのような効果は見られなかった。コラーゲンペプチド素材に大量に含有される Gly-Pro-Ala は特に高い競合型阻害効果を示し、Trp-Arg-Glu による相乗的阻害増強効果が確認された。これらの結果から、**Trp-Arg-Glu は他の機能性（ある種の競合型 hDPPIV 阻害）ペプチドの効果を増強する新タイプのペプチドである**ことが示唆された。

1) K. Ito et al. ***Nature Commun.*** 2013 4(2502).
2) V.T.T. Lan et al. ***Food Chem.*** (2014) *in press* (DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.11.131)
3) V.T.T. Lan et al. ***Peptides*** (2014) 54 166-170.

※本研究は戦略的イノベーション創造プログラム「次世代農林水産業創造技術」により実施された。

dipeptidyl peptidase IV inhibitory peptides, soy peptides, collagen peptides

講演番号：2F45a07
講演日時、会場：3 月 27 日 10:16～ F 校舎 45 会場

いも類・野菜類の抗糖化活性の検討

Anti-glycation activity of various vegetables

○須藤 麻里、吉原 潮梨、長谷部 久乃、佐久間 塁 (カルビー株式会社)
○Mari SUTO, Shiori YOSHIHARA, Hisano HASEBE, Rui SAKUMA (CALBEE,Inc.)

【目的】

糖化反応とは、体内にあるタンパク質と糖が非酵素的に結合する反応であり、最終産物として Advanced Glycation End Products(AGEs)を生成する。AGEs は加齢とともに体内に蓄積し、老化関連疾患の発症に関与している。皮膚中に蓄積すると、くすみ、しわ、しみ等の皮膚老化が進行し、また血中や骨中に蓄積すると動脈硬化、骨粗鬆症が発症する。また糖尿病では、生体タンパク質の糖化が進行し AGEs が蓄積することにより、合併症が発症・進行することが知られている。よって、生体内の糖化反応を抑制することは、加齢や糖尿病に伴う疾病の予防・改善に繋がるため非常に重要である。

いも類・野菜類には抗酸化成分をはじめとする機能性成分が含まれている。さらにそれらをフライ調理することによって水分が蒸発し、機能性成分は濃縮される。例えば、じゃがいもをフライ調理したポテトチップスには、ビタミン C や葉酸、クロロゲン酸などの機能性成分が、生じゃがいもよりも高濃度で含まれていることが明らかとなっている。そこで本研究では、いも類・野菜類の生およびフライ加工製品の抗糖化活性を調べることを目的とした。

【方法】

じゃがいも、たまねぎ、にんじん、ごぼう、さつまいも、さといも、かぼちゃ、にんにくの凍結乾燥した生野菜と市販フライ加工食品を試料とした。粉砕した試料 5g を水 45mL で 1 分間ホモジナイズし、ろ過したものを水抽出液とした。抗糖化活性は、ヒト血清アルブミンをモデルタンパク質として、グルコースと 60℃で 40 時間反応させることにより生じる蛍光性 AGEs の蛍光強度(励起波長 370nm、蛍光波長 440nm)により評価した。反応系に試料の水抽出液を添加した場合の蛍光強度の値から、AGEs 生成阻害率(%)および IC_{50}(mg/mL)を算出した。

【結果】

凍結乾燥した生のいも類・野菜類の抗糖化活性を測定したところ、ごぼう、じゃがいも、にんじん、たまねぎ、さつまいもの順に高い AGEs 生成阻害作用を示した。現在、品種差やフライ加工食品、活性候補成分について検討を進めている。

potato, anti-glycation, AGEs

講演番号：2F45a08
講演日時、会場：3 月 27 日 10:27～ F 校舎 45 会場

食餌脂肪の質の違いがラット腸内環境と脂質代謝に及ぼす影響

Effects of quality of dietary fats on colonic environment and lipid metabolism in rats

○岡崎 由佳子[1]、関田 彩夏[1]、福田 絵里[1]、知地 英征[1]、加藤 範久[2]([1]藤女子大・人間生活、[2]広島大院・生物圏科学)
○Yukako OKAZAKI[1], Ayaka SEKITA[1], Eri FUKUDA[1], Hideyuki CHIJI[1], Norihisa KATO[2] ([1]Fuji Women's Univ., [2]Hiroshima Univ.)

【目的】
高脂肪食の摂取は，肥満に加え，大腸がんや大腸炎といった大腸疾病の危険因子であると推測されており，脂肪の過剰摂取による腸内環境の変化が脂質代謝異常や大腸疾病発症に関与していると指摘されている。これまでに，摂取する脂肪の質の違いが脂質代謝に与える影響については検討されてきている。本研究では，脂肪の種類が異なる高脂肪食を摂取させたラットの腸内環境と脂質代謝への影響を検討した。

【方法】
4 週齢の SD 系雄ラットを 1 週間予備飼育後，6 群に分け（n=7），牛脂，ブドウ種子油，コーン油，オリーブ油，米油，ヤシ油をそれぞれ 20%添加した食餌を与え，3 週間飼育した。飼育終了後、盲腸内容物中の pH，盲腸有機酸含量（HPLC 法），糞および盲腸内容物の細菌叢（qPCR 法），糞中ムチン（蛍光光度法），血清及び肝臓脂質含量，血清アディポネクチン含量（ELISA 法）を測定した。

【結果】
食餌摂取量と体重増加量は，本食餌組成による影響を受けなかった。盲腸内容物重量は牛脂食群と比較して，ブドウ種子油食，コーン油食，オリーブ油食，ヤシ油食群で有意に増加し，内容物の pH は有意に低下した。また，米油食群においても盲腸内容物の pH の低下が認められた。盲腸内容物中の酢酸およびプロピオン酸含量は，牛脂食群と比較して，ブドウ種子油食，コーン油食，オリーブ油食群で有意に増加し，酪酸含量はブドウ種子油食群でのみ有意に増加した。糞中ムチン量，*Bifidobacterium* spp.および *Lactobacillus* spp.の割合は，牛脂食群と比較してヤシ油食群で有意に減少することが示された。血清 non-HDL コレステロールは，牛脂食群と比較して，ブドウ種子油食および米油食群で有意に低下した。また，動脈硬化指数および血清中性脂肪量は，ブドウ種子油食群で顕著に低下することが認められた。血清アディポネクチンについては，本実験条件による影響を受けなかった。以上の結果より，摂取する脂肪の質の違いは腸内環境に異なる影響を与え，特にブドウ種子油については，牛脂と比較して腸内発酵を促進させ，脂質代謝を改善する可能性が示された。

Quality of dietary fats, Colonic environment, Rat

講演番号：2F45a09
講演日時、会場：3 月 27 日 10:38～ F 校舎 45 会場

ネコのオーラルケアにおける抗歯周病原性細菌バイオフィルム鶏卵抗体（IgY）の効果

Oral care effect on the cat by the chicken egg antibody against the biofilm derived from periodontopathic bacteria

○山下 裕輔[1]、和田 大樹[2]、栗原 博之[2]、丸 勇史[1]、吉國 義明[1]、金 武祚[1]（[1]（株）ファーマフーズ、[2]日本ペットフード（株））
○Yusuke YAMASHITA[1], Hiroki WADA[2], Hiroyuki KURIHARA[2], Isafumi MARU[1], Yoshiaki YOSHIKUNI[1], Mujo KIM[1] ([1]Pharma Foods International Co., Ltd., [2]Nippon Pet Food Co., Ltd)

【目的】　3 歳以上のネコの 80%以上が歯周病をはじめとする何らかの歯周疾患に罹患している。歯周疾患は歯を失う原因となるだけでなく口臭との関連も深い。予防法のひとつは、歯垢（バイオフィルム；BF）内の嫌気性細菌である歯周病原性細菌を除去することである。我々はこれまでに、ヒト口腔内由来の BF に対する鶏卵抗体（BF IgY）を作製し、ヒトおよびイヌでの摂取試験により唾液中歯周病原性細菌の減少効果や口臭減少等オーラルケア効果を報告してきた。今回は、ネコにおけるオーラルケア効果を総合的に評価することを目的とした。
【材料および方法】　歯周病罹患または予備軍である成猫（日本猫）9 頭をランダムに 3 頭ずつ 3 群に分け、対照群（通常飼料）、BF IgY 低用量群（0.03% BF IgY 含通常飼料）、BF IgY 高用量群（0.06% BF IgY 含通常飼料）とした。通常飼料には市販ネコドライフードを用い、BF IgY は脱脂卵黄粉末形態で配合した。給餌は、各個体について体重維持量（平均値 16.1 g/kg/day）を 1 日 2 回に分け、4 週間行った。試験開始前後に口腔内検査として、前臼歯、犬歯における歯垢・歯石の付着程度、黒色化、歯肉の充血（各歯毎各項目 0～3 にスコア化）、および口臭官能検査（0～8 にスコア化）を行い評価した。さらに口腔内ガス中臭気成分をガスクロマトグラフィーにて分析した。また同時に、唾液中の嫌気性細菌数をプレート培養により測定した。
【結果および考察】　前臼歯、犬歯における歯垢・歯石の付着程度は、対照群では摂取前後でスコア変化は認められなかったのに対し、BF IgY 低用量群で 1 ポイント、高用量群で 1.4 ポイント、投与量依存的なスコアの減少傾向が認められた。黒色化、歯肉の充血に関しては、各群、摂取前後で有意な変動は認められなかった。口臭に関しては、官能評価では各個体バラツキが大きく各群有意な変動は認められなかった。しかし、臭気成分のうちメチルメルカプタンに関しては、対照群で摂取後に上昇する傾向を示したのに対し、BF IgY の 2 群では減少傾向を示した。唾液中の嫌気性細菌数は、全群で摂取後に減少傾向を示したが、BF IgY 高用量群においてのみ摂取後に菌数が 1/3 まで有意な減少が認められた($p<0.05$)。以上のことから、BF IgY はネコ口腔内の嫌気性細菌の数を減少させ、それに伴い、細菌が産生しうるメチルメルカプタンなどの口臭成分を減少させる作用があると推察された。ネコの歯周病、口臭対策には歯磨きが最良だが、ネコが嫌がることも多い。BF IgY は特異性が高いことから口腔内フローラを保ちつつ歯周病原性細菌を減少させることが期待でき、オーラルケアを訴求するキャットフードの新たな機能性素材として有用であることが示された。

egg yolk antibody, cat, Oral care

講演番号：2F45a10
講演日時、会場：3 月 27 日 10:49～ F 校舎 45 会場

プリン体を資化する乳酸菌の探索
Selection of *Lactobacillus gasseri* strain which has high ability in metabolizing purine
○山田 成臣、岩本 千鶴、添田 美里、坪井 洋、大柴 幸男、内田 勝幸、狩野 宏、浅見 幸夫、伊藤 裕之（（株）明治 食機能科学研）
○NARUOMI YAMADA, CHIZURU IWAMOTO, MISATO SOEDA, HIROSHI TSUBOI, YUKIO OHSHIBA, MASAYUKI UCHIDA, HIROSHI KANO, YUKIO ASAMI, HIROYUKI ITOH (Meiji Co., Ltd.)

＜目的＞
日本における高尿酸血症者数は約 1000 万人とも言われている。高尿酸血症は動脈硬化性疾患（脳梗塞や心筋梗塞）などのリスクを高めることが知られており、高尿酸血症を予防する食品の開発は社会貢献度が高いと考えられる。高尿酸血症のリスク要因の一つとして、食物中プリン体の過剰摂取が知られている。そこで、このリスク要因に着目し、食物中のプリン体を分解、あるいは資化することにより、プリン体の宿主側への吸収を低減する乳酸菌の探索を試みた。

＜実験方法＞
プリン塩基はプリンヌクレオチドやプリンヌクレオシドと比較して腸管から吸収されにくいことが報告されている。そこで乳酸菌ライブラリーの中から *Lactobacillus gasseri* を中心に、プリンヌクレオシドをプリン塩基に変換する Purine Nucleosidase 活性を測定した。上記検討の結果選抜された候補菌株を高尿酸血症モデルラットに対して経口投与することで、プリン体の吸収低減作用を検証した。

＜結果と考察＞
Purine Nucleosidase 活性が高い菌株として、*Lactobacillus gasseri* PA-3（以下 PA-3 株）が選抜された。本菌株は食物中のプリンヌクレオシドをプリン塩基に変換することで、消化管からのプリン体吸収を抑制することが予想された。さらに酵素活性の高い菌株について高尿酸血症モデルラットに PA-3 株を 10E+9cfu/kg で 8 日間投与した結果、コントロール群（生理食塩水投与）と比較して有意に血中尿酸値の上昇が抑制された。
以上のことから、PA-3 株は食物由来のプリン体を分解することによって宿主側に吸収されるプリン体の量を低減し、血中尿酸値の上昇を抑制したと考えられた。

purine, metabolism, *Lactobacillus gasseri*

講演番号：2F45a11
講演日時、会場：3 月 27 日 11:10～ F 校舎 45 会場

Lactobacillus gasseri CP2305 株と乳幼児期におけるストレスの緩和・自立性の支援 －ラットでの評価－

Lactobacillus gasseri CP2305 and stress release under repeated mother-infant separation in rats

澤田 大輔[1]、○藤原 茂[2] ([1]カルピス(株) 商開セ、[2]カルピス(株) 発酵研)
Daisuke Sawada[1], ○Shigeru Fujiwara[2] ([1]Products Development Center, CALPIS Co.,Ltd., [2]Microbiology & Fermentation Lab., CALPIS Co.,Ltd.)

［目的］

我々は *Lactobacillus gasseri* CP2305 株（CP2305 株）摂取によるストレス緩和効果について報告してきた。科学的なエビデンスを得るための検討の一環として、今回は、幼児期におけるストレス脆弱性形成のモデルであり、消化管機能障害の惹起が報告されている母子分離ストレス負荷モデルにおいて、仔ラットの身体機能および生化学マーカーの変化と CP2305 株摂取の影響について検証した。

［方法］

妊娠 14 日または 15 日目の SD ラット（日本チャールスリバー）9 頭を購入し、1 頭づつ個別に飼育した。餌 (CE-2：日本クレア)および水は自由摂取とし、ランダムに各 3 頭づつ下記の 3 群に割付けた。1）仔ラットへの CP2305 発酵乳粉末 5mg（6.0×10^6 個)投与＋母子分離ストレス負荷群、2）仔ラットへ粉末脱脂乳 5mg 投与＋母子分離ストレス負荷群、および 3）仔ラットへの粉末脱脂乳 5mg 投与群。出産を確認し、生後 4～19 日目の期間に、連日母子分離ストレスを負荷した。生理食塩水 25μL に分散した粉末の脱脂乳または発酵乳を投与した後、28℃に保温したマルチパネルヒーター(トリオコーポレーション)上に仔ラットを 4 時間分離した。生後 20 日目、体重を測定後、血漿を回収した上でコルチコステロンを測定し、直腸を摘出した上で遺伝子発現解析および組織検査に供した。

［結果および考察］

母子分離ストレス負荷により、離乳時の仔ラット体重の有意な減少、コルチコステロンの有意な上昇、さらに直腸部位での炎症惹起も確認された。CP2305 株の経口摂取により、これらの不利益な変化の殆どは解消され、母子分離ストレス無負荷時に近い値を示すようになった。乳幼児期の母子関係の未成熟性等に起因する精神的な影響のうち、その不利益な部分が、CP2305 株摂取によって緩和できる可能性が示された。母子分離ストレス負荷モデルでは、腸管透過性の亢進、クリプトの深長化、上皮の増殖亢進とその機能低下が示唆されており、ストレス負荷時の消化管機能の変化を評価するモデルとして優れている。また、脳における CRF 受容体発現量の変化等に見られる通り、脳腸相関の研究においても優れたモデルとして知られ、今後、CP2305 株摂取における脳腸相関を介した身体機能への影響について詳細に検討していきたいと考えている。

Lactobacillus gasseri CP2305, brain-gut interaction, mother-infant separation

講演番号：2F45a12
講演日時、会場：3 月 27 日 11:21～ F 校舎 45 会場

ヒト腸内細菌叢に与える花粉荷由来乳酸菌 *Lactobacillus kunkeei* YB38 の影響

Effects of the consumption of *Lactobacillus kunkeei* YB38 isolated from honeybee pollen on human microbiota.

○浅間 孝志[1]、木村 友香[1]、福島 忍[1]、佐道 哲也[1]、立藤 智基[1]、橋本 健[1]、辨野 義己[2]([1]株式会社山田養蜂場本社、[2]独立行政法人理化学研究所)
○ Takashi ASAMA[1], Yuka KIMURA[1], Shinobu FUKUSHIMA[1], Tetsuya SADO[1], Tomoki TATEFUJI[1], Ken HASHIMOTO[1], Yoshimi BENNO[2] ([1]Yamada Bee Company, Inc, [2]RIKEN)

【背景と目的】
ヒトでは 10^{14} 個以上の細菌が存在し、複雑な腸内細菌叢を形成している。それらが産生する代謝物は宿主の健康に様々な影響を与えるため、腸内細菌叢の制御は宿主の健康を維持する上で非常に重要である。特定の乳酸菌が腸内細菌叢を改善することは知られており、その単離源はヒト、動物、自然界等多岐にわたる。我々はこれまでにミツバチが作り出す花粉荷、花粉荷の発酵物である蜂パン及びミツバチの胃から乳酸菌を単離し、その IgA 産生促進作用を指標に花粉荷由来の *Lactobacillus kunkeei* YB38 を選抜してきた。本研究では YB38 の死菌体がヒト腸内細菌叢に与える影響を検証した。
【方法】
便秘傾向女性 29 名（50.4 ± 7.5 歳）を対象にプラセボ摂取期、YB38 2 mg/日摂取期、YB38 10 mg/日摂取期、YB38 50 mg/日摂取期、摂取終了後の各 2 週間の単盲検用量漸増試験を実施した。腸内細菌叢は qPCR 法（総菌数、*Blautia coccoides* グループ、*Atopobium* クラスター、*Bacteroides fragilis* グループ、*Clostridium leptum* サブグループ、*Bifidobacterium*、*Faecalibacterium prausnitzii*）により解析し、糞便中の IgA 量及び有機酸量も併せて測定した。
【結果】
菌叢解析の結果、プラセボ摂取期に $10^{9.8}$／g 糞便程度であった *B. fragilis* グループが、YB38 10 mg/日摂取期、YB38 50 mg/日摂取期及び摂取終了後にはおよそ $10^{9.1}$／g 糞便程度に有意に減少した。一方、糞便中の IgA 量には有意な差は認められなかったものの、YB38 用量依存的にその数値が上昇する傾向が認められた。また、糞便中の酢酸量は、プラセボ摂取期と比べて YB38 50 mg/日摂取期で増加傾向を示し、摂取終了後増加した。
【考察】
本研究により YB38 は腸内細菌叢に影響を与えることが分かった。摂取終了後に認められた *B. fragilis* グループ菌数の有意な減少は、YB38 50 mg/日摂取期の影響が残っているためかもしれない。さらに、*B. fragilis* グループはアレルギーへの関与が指摘されていることから（Fukuda et al., *J Adolesc Health*, 2004., Odamaki et al., *J Investig Allergol Clin Immunol*, 2007.）、YB38 は抗アレルギー作用を持つ可能性がある。また、菌叢の変化のみではなく糞便酢酸量の上昇も見られたことから、腸内環境を改善する可能性が示唆された。

Lactobacillus kunkeei YB38, microbiota, *Bacteroides fragilis* group

講演番号：2F45a13
講演日時、会場：3 月 27 日 11:32～ F 校舎 45 会場

日本の男女中高年における、ビフィズス菌含有乳酸菌飲料摂取と健康状態に関する横断研究　結果１－調査対象者の生活習慣、健康意識、生活習慣病の罹患経験－

Cross-sectional study on the relationship between probiotic milk consumption and health status in older Japanese: lifestyle, health consciousness and lifestyle-related disease

○柳澤 尚武[1]、南 淳一[1]、齋藤 さな恵[2]、小田巻 俊孝[1]、清水（肖） 金忠[1]、阿部 文明[1]、下田 妙子[2] ([1]森永乳業株式会社、[2]東京医療保健大学)
○ Naotake YANAGISAWA[1], Jun-ichi MINAMI[1], Sanae SAITOH[2], Toshitaka ODAMAKI[1], Jin-zhong XIAO[1], Fumiaki ABE[1], Taeko SHIMODA[2] ([1]Morinaga Milk Industry Co., Ltd., [2]Tokyo Healthcare University)

【目的】プロバイオティクスは腸内環境を整えたり、免疫機能を活性化したりするなどの効果がこれまでの研究で知られており、健康増進や生活習慣病の予防などの効果が期待されている。そこで我々は、ビフィズス菌を含む乳製品乳酸菌飲料と健康状態との関連を調べるために、当該飲料を中、長期に摂取している中高年（50 代～80 代）の男女を主な対象としてアンケート調査を行い、当該飲料の摂取頻度や対象集団の特徴（背景因子）を検討した。
【方法】調査は 2013 年 12 月から 2014 年 3 月までの期間で行われ、全国 8 地域 33 都道府県の当該飲料を摂取している家庭を中心に質問票を配布し、性別、年代、体重、当該飲料の摂取状況（期間や頻度）、生活習慣（睡眠時間や排便回数、飲酒頻度、喫煙習慣、運動習慣など）、体調および体感（食欲や疲れ、肌の調子など）など健康に関する症状、各種疾患の罹患経験の有無などを調査した。調査結果は性別および年代別に集計した。
【結果】調査では調査票を 921,10 部配布し、24,055 部が回収され、有効な回答数は 23,188 部（有効回答率 25.2%）であった。対象集団は男性が 6,817 人（29.4%）、女性が 16,371 人（70.6%）で男性が約 3 割程度であった。年齢構成は、男性ではそれぞれ 50 代、60 代、70 代、80 代で、778 人（11.4%）、1,971 人(28.9%)、2,730 人(40.1%)、1,338 人(19.6%)、女性では、2,595 人(15.9%)、5,597 人(34.2%)、5,807 人（35.5%）、2,372 人（14.5%）であり、男女ともに 70 代が最も多かった。当該飲料摂取状況については、男性では現在摂取中が 3,895 人(60.3%)、過去に摂取 863 人(13.4%)、摂取経験なし 1,700 人（26.3%）で、女性では、それぞれ 9,552 人（61.5%）、2,647 人（17.1%）、3,325 人（21.4%）であった。男女ともに年代が上がると現在摂取中の割合が増加し、80 代で最も多く、それぞれ 68.9%、74.0%であった。摂取期間（6 年以上）や頻度（週 4 回以上）においても、男女ともに年代が上がるとその割合が増加した。また、生活習慣の調査では、少なくとも週 1 回以上運動する人の割合が、男女とも年代と伴に増加する傾向にあった。排便回数は男女とも年代が上がると少なくなる傾向が認められ、高齢者ほど便秘気味であった。また、睡眠時間は、6 時間以上睡眠する人の割合は男女とも年代と伴に増加する傾向にあった。生活習慣病の罹患経験のある人の割合は、糖尿病（男性：17.4%；女性：8.6%)、高血圧（男性：44.8%；女性：35.9%)、脂質異常症(男性：15.7%；女性：20.6%)で糖尿病と高血圧は年代と伴に増加傾向にあった。以上の結果から、本調査の対象集団では、高齢者ほど当該飲料を長期間摂取し摂取頻度も高く、健康に対する意識が高い可能性が示唆された。

milk, bifidobacterium, QOL

講演番号：2F45a14
講演日時、会場：3 月 27 日 11:43～ F 校舎 45 会場

日本の男女中高年における、ビフィズス菌含有乳酸菌飲料摂取と健康状態に関する横断研究　結果２－乳酸菌飲料摂取と体重、排便状態、QOL および各種疾患経験との関係－

Cross-sectional study on the relationship between probiotic milk consumption and health status in older Japanese: relationship with body weight, defecation, QOL, and lifestyle-related disease

○南 淳一[1]、柳澤 尚武[1]、齋藤 さなえ[2]、小田巻 俊孝[1]、清水（肖） 金忠[1]、阿部 文明[1]、下田 妙子[2] ([1]森永乳業株式会社、[2]東京医療保健大学)
○Jun-ichi MINAMI[1], Naotake YANAGISAWA[1], Sanae SAITO[2], Toshitaka ODAMAKI[1], Jin-zhong XIAO[1], Fumiaki ABE[1], Taeko SHIMODA[2] ([1]MORINAGA MILK INDUSTRY, [2]TOKYO HEALTHCARE UNIVERSITY)

【目的】プロバイオティクスは腸内環境を整えたり、免疫機能の活性化したりするなどの効果がこれまでの研究で知られており、健康増進や生活習慣病の予防などの効果が期待されている。そこで我々は、ビフィズス菌を含む乳製品乳酸菌飲料を中、長期に摂取している中高年（50 代～80 代）の男女を主な対象として、当該乳酸菌摂取と健康状態との関連をアンケート調査により検討した。
【方法】調査は 2013 年 12 月から 2014 年 3 月までの期間、全国の当該飲料を摂取している家庭を中心に行われ、当該飲料の摂取状況（期間や頻度）や生活習慣（睡眠時間や排便回数、飲酒頻度、喫煙習慣、運動習慣など)、各種疾患の罹患経験の有無などを調査した。当該飲料の摂取有無により被験者から 2 群（摂取群:3 年以上、週 4 本以上摂取（男性:n=2194;女性:n=4962）;非摂取群:摂取経験なし（男性:n=1700;女性:n=3325)）を抽出し、生活習慣や各種疾患の罹患経験率などを性別ごとに年代を層別因子として群間比較した。
【結果】女性の摂取群では、非摂取群と比較して有意に体重が少なく、BMI(Body mass index)でも同様に女性の摂取群の方が低い値を示した。生活習慣調査において、高齢者ほど便秘の傾向にあることが観察されているが、排便回数については、男女ともに「週 4 回以下」となるリスクが摂取群で有意に低く、特に 80 代の女性で差が顕著であった。睡眠時間は男女とも群間に有意な差はなかったが、60 代の女性では、睡眠時間が「6 時間未満」となるリスクが摂取群で有意に低かった。体感調査では、男女ともに「物忘れがはげしい」の項目において、摂取群で有意にリスクが低かった。また、各種疾患の罹患経験率の群間比較において、男性では、「大腸ポリープ」、「肝臓病」、「胆石」、「睡眠障害」のリスクが摂取群で低く、女性では、「腎臓病」のリスクが摂取群で低かった。更に、過去 5 年間の骨折経験有無の比較では、男女ともに群間に有意な差は認められなかったが、当該飲料摂取期間が 10 年以上継続摂取したサブグループ解析の結果、女性において、摂取群で有意な骨折リスクの低下が認められ、特に 80 代で顕著なリスクの低下が見られた。以上の結果から、当該飲料の摂取は、体重管理や排便状況、QOL 改善、疾患予防など体調の管理に役立つことが示唆された。

milk, bifidobacterium, QOL

講演番号：2F45p02
講演日時、会場：3 月 27 日 14:11～ F 校舎 45 会場

とうふようもろみの消化酵素耐性抗酸化物質の単離

Isolation of digestive enzyme resistant antioxidant from moromi

○玉城 祐貴、屋良 瞳、仲真 弘樹、橘 信二郎 (琉大農)
○Yuki TAMASHIRO, Hitomi YARA, Hiroki NAKAMA, Shinjiro TACHIBANA (University of the Ryukyus)

【研究背景・目的】

「とうふよう」は、乾燥した豆腐を麹（紅麹及び黄麹)、泡盛および少量の食塩で調製した「もろみ」に漬け込んで発酵・熟成させる沖縄の伝統的な大豆発酵食品である。とうふよう熟成期間に、豆腐の主要大豆タンパク質は、もろみ中の麹菌が産生する各種プロテアーゼの作用によってペプチドおよびアミノ酸に分解される。当研究室ではこれまでに、発酵・熟成後のとうふよう及びもろみ中に消化酵素耐性の抗酸化活性が存在することを明らかにしている。とうふよう熟成に用いられるもろみのほとんどは漬け込みに再利用されるか廃棄されているため、もろみの抗酸化について明らかにすることで機能性食品素材として有効利用できることが期待される。本研究では、とうふよう漬込み後のもろみから消化酵素耐性の抗酸化物質を精製し、その化学構造と諸性質について明らかにすることを目的とした。

【方法】

とうふよう漬け込み後のもろみを凍結乾燥し、3 倍容の蒸留水を用いて水溶性画分を抽出して遠心分離により抽出液を得た。抽出液に対し、等量のメタノールを加えて高分子量タンパク質、デンプンおよび高分子オリゴ糖等を沈殿させ、遠心分離により上清を得た。得られた上清を順次ペプシン、キモトリプシンおよびトリプシンによる酵素消化を行い、消化酵素耐性画分を得た。逆相カラムを用いた中圧カラムクロマトグラフィーおよび HPLC により抗酸化物質を精製した。抗酸化活性は DPPH ラジカル消去活性および ORAC 抗酸化活性の定法に従い測定し、Trolox 当量で換算した。精製した抗酸化物質は ^{13}C-NMR、^{1}H-NMR、IR スペクトルおよび LC/MS 解析等により化学構造を解析した。

【結果および考察】

各種逆相カラムクロマトグラフィーにより単一活性ピークを得た。各種機器分析により、精製した抗酸化物質は天然アミノ酸のトリプトファンであることが示唆された。トリプトファンは炭水化物と容易にメイラード反応し、メラノイジン化合物を形成することが知られている。メラノイジン化合物は抗酸化能力が高く、食後血糖値の上昇抑制にも働くことが知られており、もろみの熟成による機能性向上が期待できることがわかった。

Tofuyo, Monascus, antioxidant

講演番号：2F45p03
講演日時、会場：3 月 27 日 14:22～ F 校舎 45 会場

紅麹水抽出物によるマウス骨芽細胞の石灰化関連遺伝子発現への影響
Effect of water extract from Beni-koji on gene expression of mineralization in murine MC3T3-E1 cells
○安里 雪乃、池尻 真美、橘 信二郎（琉大農）
○YUKINO ASATO, MAMI IKEJIRI, SHINJIRO TACHIBANA (University of the Ryukyus)

【研究背景・目的】紅麹菌（*Monascus* 属菌）は子嚢菌類に属するカビであり、沖縄県では琉球王朝時代より豆腐ようの製造に用いられている。紅麹は、血中コレステロール低下作用をはじめとする様々な生理活性が報告されている。近年、紅麹抽出物による骨形成促進効果やモナコリンによる骨密度増大効果が臨床で報告され、紅麹代謝産物による骨粗鬆症の代替治療モデルとして注目されている。骨粗鬆症は、一般的に骨代謝バランスの崩壊による骨密度の減少が主な病因とされている。すなわち、骨芽細胞における石灰化促進は、骨粗鬆症において骨吸収に傾いた骨代謝バランスの改善に寄与することが期待されている。そこで、当研究室では紅麹の機能性食品素材開発の一環として、マウス骨芽細胞 MC3T3-E1 を用いた紅麹抽出物による骨石灰化促進効果のスクリーニングを行ってきた。これまでに幾つかの紅麹菌株を選抜する事ができた。本研究では、MC3T3-E1 細胞を用いて紅麹水抽出物による骨形成関連遺伝子の発現変動について調べたので報告する。
【方法】紅麹菌を用いて、米または麦で調製した各紅麹水抽出物を凍結乾燥後、滅菌水に再溶解して濾過滅菌し、紅麹抽出物試料（10 mg/ml）とした。マウス MC3T3-E 1 細胞は、10%牛胎仔血清および抗生物質を含む α-MEM を基本培地として 37℃、5% CO_2 条件下で培養した。基本培地でコンフルエントになるまで培養し、L-アスコルビン酸および β-グリセロリン酸を含む分化培地に交換して分化誘導刺激を与えて骨芽細胞へ分化させるとともに石灰化を誘導した。また、紅麹試料添加群は分化培地に対し 10%（v/v）となるように各紅麹抽出物試料を添加して 2～3 日毎に培地を交換して培養した。紅麹試料添加群として終濃度 1 mg/ml および 0.1 mg/ml となるように調製したものを用い、培地に対して 10%（v/v）となるように滅菌水を加えたものを対照群とした。紅麹抽出物による未分化細胞に対する急性細胞毒性を、WST-1 法を用いて評価した。また、21 日間培養した分化骨芽細胞による骨石灰化形成を Alizarin red S 染色及び von Kossa 染色により評価した。さらに、各細胞から total RNA を抽出し、Real-time PCR 法により骨形成関連遺伝子の発現量を調べた。
【結果】幾つかの紅麹試料添加群において対照群よりも高い石灰化が Alizarin red S 染色で観察された。また、これらの紅麹試料は、未分化の MC3T3-E1 細胞に対して対照群と同等の高い生存率を示した。石灰化染色において石灰化が確認された紅麹試料添加群において、対照群と比較して骨形成関連遺伝子の発現量の増大が観測された。今後、骨形成促進に関わる生理活性物質の単離・同定をすることで紅麹のさらなる有効利用と紅麹による骨形成促進メカニズムの解明が期待できる。

Beni-koji, MC3T3-E1, mineralization

講演番号：2F45p04
講演日時、会場：3 月 27 日 14:33～ F 校舎 45 会場

Effect of water extract of red mold rice using *Monascus pilosus* on adipogenesis inhibition
○Shinjiro TACHIBANA, Pradeep Wanninaika Indika, Hirohide TOYAMA (University of the Ryukyus)

[Background & Objectives] Obesity and overweight is one of serious risk factors of pathogenic diseases such as diabetes, heart disease, hypertension, and osteoporosis. *Monascus*-fermented rice, known as red mold rice (RMR) or beni-koji, has been traditionally consumed as an herbal medicine to improve those diseases in East Asian countries. RMR produces diverse secondary metabolites by solid-state fermentation, and monacolin out of them, water-insoluble polyketide, is well known and used as antihyperlipidemic agent. However, in recently, it has been attracted attention that the water extract of RMR possesses also adipogenesis inhibitory activity with different mechanism from monacolin. So far, we also found the water extract of RMR using *Monascus pilosus* NBRC4507, free from lovastatin and citrinin at least, can inhibit adipogenesis *in vitro*. The aim of this study is to reveal the effects of RMR extracts on lipogenesis and lipolysis during differentiation of 3T3-L1 preadipocytes.
[Methods] RMR of *M. pilosus* was cultivated at 30ºC for 7, 10, 14, 17, and 20 days. Water extracts prepared from each RMR were used as the sample for 3T3-L1 cell assay. Mouse 3T3-L1 cells were maintained in a basal medium DMEM containing 10% FCS and antibiotics, and initiate differentiation with DMEM containing 10% FBS, antibiotics, IBMX, DEX, and insulin. After differentiation induction for 2 days, cells were further cultivated with RMR treatment for 8 days. Intracellular lipid accumulation, triglyceride content, glycerol-3-phosphate dehydrogenase activity, and extracellular glycerol release were determined.
[Results & Discussion] All extracts of RMR showed excellent cell viability on 3T3-L1 preadipocytes. The water extract of RMR, 14 days cultivation, concentration-dependently inhibited the lipid accumulation, TG content, and GPDH activity in 3T3-L1 cells. To the contrary, free glycerol released into the medium was increased. These results suggest that the water-soluble components of RMR might inhibit adipogenesis process by the both impacts of lipogenesis inhibition and lipolysis promotion.

Monascus pilosus, adipogenesis inhibitor, secondary metabolites

講演番号：2F45p05
講演日時、会場：3 月 27 日 14:44～ F 校舎 45 会場

α-エチルグルコシドの保湿効果に関与する新規機能性

The novel function of ethyl α-D-glucoside involved in skin moisturization.

○坊垣 隆之[1,2]、宮西 史則[1]、佐藤 敦[1]、打越 仁子[1]、若林 美芳[1]、園部 政和[1]、尾関 健二[1] ([1]金工大・バイオ研、[2]大関（株）・総研)
○Takayuki BOGAKI[1,2], huminori MIYANISHI[1], atsushi SATO[1], satoko UTIKOSHI[1], miho WAKABAYASHI[1], masakazu SONOBE[1], kenji OZEKI[1] ([1]KIT, [2]Ozeki corp.)

【目的】清酒の主要な成分の一つであるα-エチル-D-グルコシド(α-EG)は、α-グルコシダーゼの転移反応によって、マルトオリゴ糖などからエタノールをアクセプターとして生成する低分子の配糖体である。清酒の呈味に関与する重要な成分であるだけでなく、美容効果として外用で表皮細胞の角化を促進し、増殖とのバランスを調節し、その結果水分の蒸発を抑制する長時間での保湿効果が報告されている。また飲用では肘の表皮水分量に働く保湿効果が報告されている天然の機能性素材である。我々は外用では短時間に働くバリア機能と飲用では真皮の繊維芽細胞に働く新規機能について明らかにすることを目的として本研究を行った。
【方法と結果】酒粕再発酵液（2.5%α-EG、15%アルコールの2倍希釈系列のサンプルと同アルコール濃度のコントロール水と比較）の保湿効果試験をパッチテストにより行った。サンプル100μlを含むパッチシートを前腕に貼り2分間放置後剥がしとり、以後15分毎に120分後まで肌水分量を測定した。α-EG濃度が0.04%という低濃度でも、水分がコントロール以上に保持されていた。また保湿効果に有意差が観察されるまでの時間はα−EGの濃度に依存していた。低濃度のα-EGに短時間で働く新規のバリア機能の保湿効果があることを確認できた。

α-EG の 2 時間までの短時間での保湿効果が確認できたので、その作用機序の解明を目的として細胞試験を実施した。ヒト正常繊維芽細胞を 0.0001%～0.005%（最終濃度）含む DMEM 培地で 48 時間培養し、培地を除去した後、細胞数と細胞が生産しているコラーゲンを定量した。α-EG 濃度が 0.0001%の低濃度で無添加のコントロールと比較して、有意差がある細胞数増殖とそれに伴うコラーゲン量の生産が増加した。α-EG の添加量を増やすと生産量は低下しコントロールと同等の生産となった。この結果から、α-EG の飲用の保湿効果には真皮層に存在する繊維芽細胞の細胞数とコラーゲンの増加に関与していると考えられた。
【考察】これまで報告されている機能以外に、ヒト肌試験による外用での試験では 2 時間までの短期間で水分蒸散量を抑制する保湿機能が明らかとなった。また飲用では、これまでに角化による保湿効果が報告されていたが、今回の細胞実験から低濃度で繊維芽細胞での細胞数の増加によって、保湿効果のある素材として知られているコラーゲン生産量が増加することを発見した。これにより外用では洗顔、スキンケア製品などに配合する日用品への商品展開、飲用ではコラーゲン量を増加する新規機能性素材として新しい用途開発が可能となる。

ethyl α-D-glucoside, moisturization, collagen

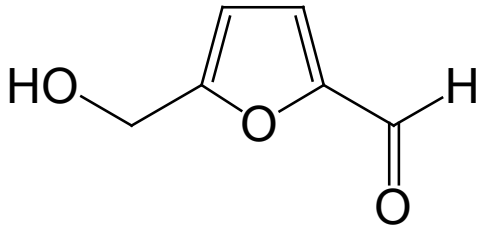
講演番号：2F45p06
講演日時、会場：3 月 27 日 15:05～ F 校舎 45 会場

褐変した白味噌から単離した哺乳類 DNA ポリメラーゼ阻害活性物質の健康機能性について
The healthy function by the mammalian DNA polymerase inhibitor identified from the browning Shiro-Miso

○今西 貴紀[1]、松永 大輝[2]、紙透 伸治[2]、菅原 二三男[2]、小野寺 威文[3,4,5]、木村 明博[3]、坂本 裕香[3]、水品 善之[3,4] ([1]株式会社　本田味噌本店、[2]東京理大・理工、[3]神戸学院大・栄養、[4]神戸学院大・LSC、[5]神戸学院大・薬)
○Takanori IMANISHI[1], Daiki Matunaga[2], Shinji Kamisuki[2], Fumio Sugawara[2], Takefumi Onodera[3,4,5], Akihiro Kimura[3], Yuka Sakamoto[3], Yoshiyuki Mizushina[3,4] ([1]Honda Miso Honten Co. Ltd., [2]Faculty of Sci. & Technol., Tokyo Univ. of Sci., [3]Faculty of Nutrition, Kobe Gakuin Univ., [4]LSC, Kobe Gakuin Univ., [5]Faculty of Pharmaceutical Sci., Kobe Gakuin Univ.)

【目的】味噌の健康機能性と味噌関連副産物（廃棄物）の有効利用を目指して、白味噌を製造後に長期間経過して変色した「褐変白味噌」に注目した。褐変白味噌には、DNA 合成酵素である DNA ポリメラーゼ(Pol)阻害活性が見られたので、活性成分を単離・精製してから同定した。また、哺乳類の Pol 阻害活性に基づいた健康機能性を検討した。
【方法】褐変白味噌は（株）本田味噌本店（京都市）から提供された。哺乳類由来の Pol 分子種の精製酵素を準備して、Pol 活性測定は、基質として合成 DNA である poly(dA)/oligo(dT)$_{18}$ と[^{3}H]-dTTP を用いて、Pol によるトリチウム[^{3}H]の取り込み量を液体シンチレーションカウンターで定量測定した[1]。抗炎症活性は、マウス耳介へ起炎剤 TPA（12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate）を塗布して誘導した炎症(浮腫)に対する耳の単位面積あたりの重量変化を測定した。マウス受身皮膚アナフィラキシー（PCA）反応抑制活性は、常法に従った。
【結果】褐変白味噌のエタノール抽出物に Pol 阻害活性があったので、本抽出物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにかけて Pol 阻害活性を指標にして活性成分を単離・精製した。NMR, MS により化学構造を解析した結果、5-(Hydroxymethyl) furfural であった。本物質は哺乳類の Pol 群のうち、ヒト Polλだけを特異的に阻害した。本物質を基本骨格である Furfural (2-Furaldehyde) には Pol 阻害活性が見られなかったことから、Hydroxymethyl 基が Polλの阻害活性に重要であることが示唆される。また Furan やその誘導体にも阻害活性が見られなかったことから、Aldehyde 基も阻害に必須な構造であると考えられる。マウス耳抗炎症活性において、本物質は既知の抗炎症剤であるグリチルレチン酸よりも 1.5 倍以上強い活性を示した。また、マウス PCA 反応抑制活性において、本物質は既知の抗アレルギー剤であるトラニラストよりも弱めではあるが活性が見られたことから、抗アレルギー作用があると考えられる。
【考察】褐変白味噌中に存在する 5-(Hydroxymethyl) furfural は、Polλ阻害活性に基づいた抗炎症・抗アレルギー作用が期待できる。通常は廃棄してしまう褐変白味噌の有効利用が示唆される。

[1] 特許第 3821867 号、発明者：水品他



5-(Hydroxymethyl) furfural の構造

DNA polymerase, 5-(Hydroxymethyl) furfural, anti-inflammation

講演番号：2F45p07
講演日時、会場：3 月 27 日 15:16～ F 校舎 45 会場

培養細胞系を用いた黒ウコンによる単球接着抑制作用の解析

Inhibitory effect of the extract from *Kaempferia parviflora* (Black ginger) on monocytic adhesion.

○堀籠 悟[1,2]、吉田 泉[2]、伊藤 志保美[2]、鈴木 美そら[2]、伏見 啓[2]、永井 武[2]、猪之鼻 修一[2]、山口 昭弘[2,3]、里山 俊哉[2,4]、吉安 友二[2]、勝田 真一[2]、鈴木 忍[2]、渡井 正俊[2]、広瀬 直人[5]、三枝 隆裕[6]、白川 仁[1]、駒井 三千夫[1] ([1]東北大院農・栄養学、[2]日本食品分析セ、[3]酪農学園大、[4](株)久原本家食品、[5]沖縄県農研セ、[6]沖縄高専)

○Satoru HORIGOME[1,2], Izumi YOSHIDA[2], Shihomi ITO[2], Misora SUZUKI[2], Kei FUSHIMI[2], Takeshi NAGAI[2], Shuichi INOHANA[2], Akihiro YAMAGUCHI[2,3], Toshiya SATOYAMA[2,4], Tomoji YOSHIYASU[2], Shin-ichi KATSUDA[2], Shinobu SUZUKI[2], Masatoshi WATAI[2], Naoto HIROSE[5], Takahiro MITSUE[6], Hitoshi SHIRAKAWA[1], Michio KOMAI[1] ([1]Grad.Sch.Agri.Sci.,Tohoku Univ., [2]Japan Food Research Laboratories, [3]Rakuno Gakuen Univ., [4]Kubara Honke Shokuhin Co.,Ltd., [5]Okinawa Prefectural Agricultural Research Center, [6]Okinawa National College of Technology)

【目的】生活習慣病と密接に関わっている動脈硬化の発生と進展には，血液細胞のひとつである単球，血管を構成する血管内皮細胞などの炎症反応による活性化が深く関与している。これまでの我々の研究から，黒ウコン及び含有成分である 5,7-dimethoxyflavone(DMF)，5-hydroxy-3,7,3',4'-tetra-methoxyflavone(TMF)が抗炎症作用を有する可能性が示唆されている。そこで，アテローム性動脈硬化の発生プロセスにおける，血管での主要なイベントに対する黒ウコン，DMF，TMF の作用について，培養細胞を用いて解析した。

【方法】①マウスマクロファージ様細胞 RAW264.7 を用いた NO 産生試験：RAW264.7 を 96well プレートに播種し，リポポリ多糖(LPS)及び黒ウコン 50%エタノール抽出液(KP)，DMF，TMF の各試験液をそれぞれ添加した。1 日間培養後，培養上清を分取し，Griess 法により培養上清中の一酸化窒素(NO)量を測定した。②ヒト臍帯静脈内皮細胞 HUVECs 及びヒト単球由来細胞 THP-1 を用いた細胞接着試験：HUVECs を 24well プレートに播種し，4～6 日間培養した。培養後，各試験液を添加し，TNF-α で 3 時間刺激した。刺激後，BCECF-AM で蛍光標識した THP-1 を加え，30 分間培養した。培養後蛍光顕微鏡による観察及び蛍光強度を測定した。③HUVECs を用いた細胞内抗酸化試験：HUVECs を 96well プレートに播種し，2 日間培養した後各試験液を添加し，20 時間培養した。培養後，CM-H_2DCFDA 及び活性酸素(ROS)の産生を誘導するピオシアニンを添加し，1 時間刺激した後，蛍光強度を測定した。

【結果】LPS 刺激でマクロファージの炎症モデルとした，RAW264.7 を用いた NO 産生試験において，KP 及び DMF で濃度依存的な NO 産生の抑制が認められた。TMF においては弱い抑制傾向が見られた。細胞接着試験においては，KP 及び DMF で濃度依存的な細胞接着の抑制が認められた。また，細胞内抗酸化試験では KP において濃度依存的に ROS 産生を抑制し，DMF，TMF においても抑制の傾向が観察された。

【考察】アテローム性動脈硬化の発生及び進展プロセスでは，単球の血管内皮細胞への細胞接着因子を介した接着，単球の内膜への侵入とマクロファージへの分化及び活性化，酸化ストレスによる炎症の誘発など知られている。KP がマクロファージの炎症に伴う活性化の指標となる NO の産生，細胞接着及び細胞内での ROS の産生を抑制したことから，黒ウコンに含まれる成分がアテローム性動脈硬化の発生及び進展に対して抑制作用を示し，これらの抑制作用の一部に，黒ウコンに特徴的に含まれる DMF または TMF が寄与している可能性が示唆された。

Kaempferia parviflora, monocytic adhesion, atherosclerosis

講演番号：2F45p08
講演日時、会場：3 月 27 日 15:27～ F 校舎 45 会場

黒ウコン抽出物による性ホルモン産生促進作用

Effect of extracts from black ginger on steroidogenesis in testis derived cells

○白川 仁、前田 美里、堀籠 悟、駒井 三千夫（東北大院農）
○Hitoshi SHIRAKAWA, Misato MAEDA, Satoru HORIGOME, Michio KOMAI (Grad. Sch. Agric. Sci, Tohoku Univ.)

研究背景　黒ウコン（黒ショウガ、*Kaempferia parviflora*）はショウガ科の植物であり、我が国ではサプリメントとして利用されている。また、タイにおいては抗炎症薬や胃腸薬、調味料として伝統的に用いられている。これらの効果に加えて、黒ウコンによる男性への性腺機能改善作用についても近年注目されている。しかし、性腺機能改善を示す黒ウコン中の活性成分については明らかとなっていない。そこで本研究では、黒ウコンの抽出物、および抽出物に含まれるポリメトキシフラボノイド（PMF）について、性ホルモン産生に与える影響を精巣由来培養細胞を用いて解析した。

方法・結果、および考察　黒ウコンの乾燥粉末を 50%エタノールで抽出し、ヘキサンおよび水で分液操作を行った後、ヘキサン層をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供し分画した。マウス精巣由来癌細胞 I-10 をこれらの分画物で処理し、24 時間後の培地中に分泌されたテストステロン（Ts）、およびプロゲステロン（Ps）量を ELISA 法により測定した。その結果、1 フラクションを除く、残りの全ての画分において Ts 分泌量の増加が見られた。Ts 分泌量を増加させた画分の GC/MS によるライブラリー検索より PMF の存在が示唆されたことから、5,7-dimethoxyflavone（DME）に着目し解析を進めた。DME は I-10 細胞の Ts、Ps 分泌量を濃度依存的に増加させた。次に、DME の作用点を推定するため、Ts 合成経路の上流因子に当たるアデニル酸シクラーゼ（AC）や A キナーゼ（PKA）の阻害剤を処理して同様の測定を行った。また、cAMP 応答配列をプロモーターに有するレポータージーンを I-10 細胞に導入し、DME によるレポーター活性の変化を解析した。さらに、細胞内 cAMP 量を ELISA 法により測定した。その結果、PKA 阻害剤により Ts 分泌増加作用が阻害された。レポータージーンアッセイでは、DME によりレポーター活性の上昇が見られた。また、DME 処理により細胞内 cAMP 量が増加した。以上のことから、黒ウコン中の DME は Ts 産生を増加させ、その作用は cAMP 量の増加による PKA の活性化を介することが示唆された。

testosterone, Kaempferia parviflora

講演番号：2F45p09
講演日時、会場：3 月 27 日 15:38～ F 校舎 45 会場

卵黄タンパク由来の新規育毛成分の開発

Effect of novel egg yolk peptides on hair growth in vivo models.

○中村 紀夫、原田 清佑、丸 勇史、吉國 義明、金 武祚 ((株)ファーマフーズ)
○Toshio NAKAMURA, Seiyu HARADA, Isafumi MARU, Yoshiaki YOSHIKUNI, Mujyo KIM (pharma Foods international Co., LTD)

【目的】脱毛症は多くの成人男性にとって悩みの種であり、QOL（Quality of life）の低下から社会生活に大きく影響するケースも少なくない。このような精神的・環境的ストレスは脱毛症をより悪化させるリスク素因となるため、薄毛や脱毛症を未然に防ぐ育毛対策への関心はきわめて高い。当社はこれまで卵黄タンパク質由来の生理活性物質を見出し、骨代謝改善や軟骨再生に寄与する機能性食品を開発してきた。今般、ヒナが羽毛をまとって誕生することに着目し、卵黄中には育毛作用を示す有効成分が存在する事を想起して、ヒト毛乳頭細胞を活性化させる卵黄タンパク由来のペプチド成分(卵黄ペプチド)を見出した。本研究では、育毛系モデル動物を用いて、この卵黄ペプチドの経口摂取による育毛・抗脱毛作用を検証することを目的とした。

【方法】本件では脱脂卵黄から調製した卵黄ペプチド成分の育毛作用を評価した。モデル動物として、C3H マウス(雄性)および C57BL/6 マウス(雌性)を用いた。7 週齢の C57BL/6 マウスは毛周期が第 2 休止期にあるが、除毛により毛成長が誘導され、成熟した成長期(AnagenⅥ)に達すると皮膚が黒色化する。その変化を経過観察し、経口投与した卵黄ペプチドの効果を検証した。一方で、抗脱毛作用の検証する場合には、除毛後にジヒドロテストステロン(DHT)を皮下注射した。ヒトにおいて DHT は毛成長を妨げることが報告されているが、げっ歯類でも同様な毛成長遅滞が起こる。そこで、DHT 投与下で卵黄ペプチドを経口投与し、そのような発毛遅滞に対する改善作用を検証した。

【結果】C3H マウスを用いた育毛試験では、マウスの背面を除毛後、ミノキシジルの塗布群を陽性対照として卵黄ペプチド混餌群の被毛再生を検討した。その結果、卵黄ペプチドの混合率に付随して被毛再生面積が増加し、0.1%以上の卵黄ペプチド混餌群では有意な発毛促進作用が示された。さらに、C57BL/6 マウスを用いて発毛促進作用について検証した。卵黄ペプチド混餌群では皮膚の黒色化が早まったことから、卵黄ペプチドが成長期の誘導や毛包の成熟化を促す可能性が示唆された。一方で、DHT 投与によって毛成長遅滞を誘導したところ、卵黄ペプチド混餌群ではそのような毛成長遅滞が短縮化された。DHT による毛成長遅滞に拮抗することから、卵黄ペプチドが抗脱毛作用を示す可能性が考えられた。これらの知見を元に今後、卵黄ペプチドの作用メカニズムを明らかにしてゆきたい。

hair growth, peptide, egg yolk

講演番号：2F45p10
講演日時、会場：3 月 27 日 15:49～ F 校舎 45 会場

毛乳頭細胞に対する卵黄由来新規育毛成分の生理作用

Effects of novel egg yolk peptides on human follicle dermal papilla cells.

○原田 清佑、中村 紀夫、丸 勇史、吉國 義明、金 武祚 ((株)ファーマフーズ)
○Seiyu HARADA, Toshio NAKAMURA, Isafumi MARU, Yoshiaki YOSHIKUNI, Mujo KIM (Pharma Foods International Co., Ltd.)

【目的】受精後わずか 21 日間でヒナを育む鶏卵には、多様な生理活性成分が凝縮されている。鶏卵から孵化したヒナは、羽毛をまとっている。このことは、ヒナの発生過程で発毛シグナルの活性化や毛包形成を促す未知分子がタマゴ中に存在することを意味している。そのような生理活性成分を追究し、新規育毛素材への応用を考案した。本研究では、ヒトの毛髪成長の司令塔として機能する毛乳頭細胞に対する生理作用を指標として、卵黄タンパクから調製されたペプチド成分(卵黄ペプチド)の育毛作用を検証した。さらに、そのようなペプチド成分が毛乳頭細胞を活性化する分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。

【方法】ヒトの毛根では、毛乳頭細胞から産生される成長因子によって毛周期(ヘアサイクル)が調節されている。ヘアサイクル成長期には、毛乳頭細胞から血管内皮細胞増殖因子(VEGF)が分泌され、栄養供給網となる毛細血管が発達する。そこで、ヒト毛乳頭細胞の培養液中に卵黄ペプチドを添加し、VEGF 産生量をモニタリングした。さらに、そのような作用を指標として卵黄ペプチドから有効成分の単離・同定を行うとともに、阻害剤やタンパク解析を用いて分子メカニズムの解明を試みた。

【結果】ヒト毛乳頭細胞に対する VEGF 産生促進作用は卵黄ペプチドに特徴的であり、卵白タンパク由来のペプチド成分には認められなかった。そこで、卵黄ペプチドから高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いて多数の分画物を調製し、スクリーニングを行った結果、有効成分が高度に濃縮された活性画分が見出された。その構成成分を単離して構造解析を行った結果、卵黄タンパクに由来した短鎖の活性ペプチド分子が見出された。さらに、種々の阻害剤およびタンパク解析を用いて作用機序を検証した結果、そのような VEGF 産生促進作用は、細胞表面のインスリン様成長因子-1(IGF-1)受容体を介したリン酸化カスケードの活性化に起因することが示唆された。
近年、女性用育毛剤へのニーズが顕在化し、男女の美容習慣に育毛対策が定着しつつある。毛乳頭細胞を活性化させ、ヘアサイクル成長期を誘導・持続させることは、加齢による軟毛化や壮年性脱毛症の改善に有効な手段となる。本研究の成果は、ヒナの誕生に隠された毛髪科学を発掘するとともに、既存の育毛剤とは異なった分子メカニズムを介した新たな育毛対策の可能性を切り拓いた。

hair growth, peptide, egg yolk

講演番号：2F45p11
講演日時、会場：3 月 27 日 16:10～ F 校舎 45 会場

セサミンとジクロフェナクの相互作用―*in vitro*、*in vivo* 両面からの解析―
Sesamin-diclofenac interaction -*in vitro* and *in vivo* analysis-

○上野 千来、上田 恵里花、武田 貴恵、安田 佳織、西川 美宇、鎌倉 昌樹、生城 真一、榊 利之（富山県立大学・工・生物工）
○Sera UENO, Erika UEDA, Kie TAKEDA, Kaori YASUDA, Miyu NISHIKAWA, Masaki KAMAKURA, Shinichi IKUSHIRO, Toshiyuki SAKAKI (Dep. of Biotech., Fac. of Engineer., Toyama Pref. Univ.)

【目的】近年、予防医療の観点から食品成分をサプリメントとして摂取する機会が増えている。サプリメントと医薬品を併用した場合、サプリメント中の食品成分が医薬品の代謝を阻害し、深刻な副作用を起こすことがある。なかでも Mechanism-based inhibition(MBI)は、長く阻害効果が続く不可逆阻害と短時間で酵素の活性が戻る準不可逆阻害がある。我々はセサミンが薬物代謝型シトクロム P450 の一つである CYP2C9 によって代謝されること、また、セサミンがヒト由来 CYP2C9 に対して MBI を起こすことを *in vitro* 系で明らかにした。本研究の目的はラットを用いた動物実験により、ヒト体内で起こるセサミンと医薬品の相互作用を予測することを目的とする。

【方法・結果】ラット肝ミクロソーム画分を用いた試験から、ラットでもヒトと同様にセサミンによるジクロフェナク代謝酵素（CYP2C11）に対する MBI がみられることがわかった。そこで、SD 系ラットにセサミン(0, 10, 100 mg/kg 体重)を 3 日間経口投与、さらに最終投与 3 時間後にジクロフェナクを経口投与し、0～24 時間後のジクロフェナク血中濃度を HPLC で分析した。C_{max}、T_{max}、$AUC_{0\text{-}24h}$ を算出したところ、いずれの値もコントロール群およびセサミン摂取群とで有意差がみられなかった。また、セサミン(0, 10, 100 mg/kg)を 3 日間経口投与したラットから肝ミクロソーム画分を調製し、ジクロフェナク水酸化活性および CYP2C11 発現量を調べたところ、各群で有意差はなかった。ヒト肝およびラット肝ミクロソーム画分を用いたスペクトル解析とセサミン代謝物の経時変化を調べた結果、セサミン代謝物中間体は一時的に CYP2C9 あるいは CYP2C11 のヘム鉄と複合体を形成するが、10 分程度で遊離すると推測された。

【結論】セサミンは、代謝中間体がシトクロム P450（P450）のヘム鉄に結合することより MBI が生じるが、複合体の安定性が低く、短時間で P450 の活性が回復した。この結果はラットを用いた *in vivo* 実験においてセサミンの影響が認められなかった事実と合致している。したがって、セサミンはヒト CYP2C9 あるいはラット CYP2C11 に対して準不可逆阻害を起こしていると考えられる。今回ラットに摂取させたセサミン量は、ヒトでの目安摂取量(約 10 mg/日程度)に比べてはるかに高い投与量であることから、実際にヒトが CYP2C9 代謝型医薬品とセサミンを併用した場合の影響はほとんどないと推測される。

Sesamin, CYP2C9, food-drug interaction

講演番号：2F45p12
講演日時、会場：3 月 27 日 16:21～ F 校舎 45 会場

クワの実凍結乾燥粉末投与によるインドメタシン誘発性胃潰瘍形成抑制効果の検討

Mulberry fruits juice prevents the indomethacin-induced gastric ulcer formation.

○畑生 俊光[1]、定兼 侑里[1]、藤原 崇子[2]、大西 直規[2]、村田 芳行[1]、舟橋 弘晃[1] ([1]岡山大院環境生命科学、[2]岡山県青果物販売)
○Toshimitsu HATABU[1], Yuri SADAKANE[1], Takako FUJIWARA[2], Naoki Onishi[2], Yoshiyuki MURATA[1], Hiroaki FUNAHASHI[1] ([1]Okayama Univ., [2]OkayamakenSeikabutuhanbai)

【目的】クワの実は、アントシアニンやレスベラトロールをはじめとするポリフェノールを多く含む。これら含有ポリフェノールには、視覚機能改善、胃潰瘍形成抑制効果、脂質過酸化抑制効果があると報告されている。近年、インドメタシンを含む非ステロイド性抗炎症薬（NSAIDs）の利用が高まるのと同時に、副作用としての胃潰瘍が問題となっている。インドメタシンによる胃潰瘍形成機構の一つとして、COX 非依存性経路が知られ、脂質過酸化や酸化ストレスによる胃粘膜障害が、この経路の主因と考えられている。本研究では、クワの実凍結乾燥粉末投与によるインドメタシン誘発性胃潰瘍形成抑制効果およびその機構、特に COX 非依存性経路の関与について検討を行った。
【材料・方法】クワの実ジュースの凍結乾燥粉末（クワの実）を用いた胃潰瘍抑制試験は、Wistar ラット（7 週齢 雄）を用いて行った。クワの実は、Control, Low, Middle, High の 4 濃度群を設定し、胃ゾンデで強制経口投与した。インドメタシンは、Control, Indomethacin の 2 濃度群を設定し、クワの実各濃度群にクワの実投与から 1 時間後に腹腔内投与した。試験群は、クワの実-Control 群 4 群およびクワの実-Indomethacin 群 4 群の計 8 群とした。ラットは、クワの実投与の 24 時間前から絶食させ、インドメタシン投与から 4 時間後に胃と血漿を採取した。採取した胃は、肉眼的な観察、組織学的な観察に用いた。脂質過酸化の測定は、胃粘膜組織と血漿について行った。
【結果・考察】胃の肉眼的観察において、インドメタシン非投与群では出血、潰瘍形成がほとんど観察されなかった。インドメタシン投与群では出血、潰瘍形成が観察されたが、クワの実濃度依存的に抑制された。潰瘍指数の結果は、インドメタシン投与群において、インドメタシン非投与群と比較して有意に高い値を示した。クワの実-Indomethacin 群の 4 群間では、クワの実濃度依存的に、潰瘍指数が減少した。胃の組織学的観察において、インドメタシン投与群では、胃組織の損傷が観察された。Control-Indomethacin 群は、Control-Control 群に対して粘膜層の厚さが薄くなっていた。
Low-Indomethacin 群は、粘膜層がほとんど染まっていなかったが、High-Indomethacin 群では、胃小窩が染まっていた。脂質過酸化の測定結果は、胃粘膜組織、血漿ともに試験群間で有意な差は認められなかった。
以上のことから、クワの実投与は、濃度依存的なインドメタシン誘発性胃潰瘍抑制効果を有すると考えられた。また、クワの実によるインドメタシン誘発性胃潰瘍形成抑制機構は、脂質過酸化経路以外によるものであると推察された。

Mulberry, Indomethacin-induced gastric ulcer formation, Lipid peroxidation

講演番号：2F45p13
講演日時、会場：3 月 27 日 16:32～ F 校舎 45 会場

ブルーベリー葉抽出物（BLEx）のアルコール代謝亢進作用およびアルコール性肝障害抑制作用
Blue berry leaf extraction (BLEx) promotes alcoholic metabolism and alleviates alcoholic liver injury.

○山崎 楓[1]、河村 由樹[2]、長友 宏賢[2]、菅本 和寛[3]、甲斐 孝憲[4]、亀長 浩蔵[4]、竹下 正彦[5]、菊地 幸治[5]、松浦 靖[6]、柚木崎 千鶴子[6]、江藤 敏治[7]、西山 和夫[1,2]、山崎 正夫[1,2]([1]宮大院農応生科、[2]宮大農応生科、[3]宮大工環応化、[4]（株）な葉コーポレーション、[5]南日本酪農協同（株)、[6]宮崎県食品開発センター、[7]宮崎県立看護大)

○Kaede YAMASAKI[1], Yuki KAWAMURA[2], Hirotaka NAGATOMO[2], Kazuhiro SUGAMOTO[3], Takanori KAI[4], Kozo KAMENAGA[4], Masahiko TAKESHITA[5], Koji KIKUCHI[5], Yasushi MATSUURA[6], Chizuko YUKIZAKI[6], Toshiharu Eto[7], Kazuo NISHIYAMA[1,2], Masao YAMASAKI[1,2] ([1]Grad. sch. of Agri., Univ. of Miyazaki, [2]Faculty of Agri., Univ. of Miyazaki, [3]Faculty of engineering, Univ. of Miyazaki, [4]Nanaha Co., Ltd, [5]Minami Nippon Dairy Co-op Co., Ltd, [6]Miyazaki prefecture foods development center, [7]Miyazaki prefectural nursing univ.)

飲酒は健康障害のリスク要因であるが、社会生活を送る上で飲酒を避けることは難しい。健康障害を緩和する方法として、エタノールやその代謝物であるアセトアルデヒドの毒性から肝臓を保護すること、アルコール代謝を亢進させてエタノールやその代謝物を生体内から速やかに分解することが重要である。そこで本研究では肝臓保護作用が報告されているブルーベリー葉抽出物(BLEx)に注目し、Sprague-Dawley（SD）ラットにおけるアルコール代謝亢進作用およびアルコール性肝障害抑制作用を評価した。また、ヒト試験によって BLEx の効果を検証した。SD ラットを用いた実験では、尾採血を行った後、BLEx を 1.0 mg/g 体重になるように経口投与した。control 群には水を投与した。30 分後に 2.0 mg/g 体重になるように 40 %エタノール水溶液を経口投与した。エタノール投与 30 分，1，2，4，6 時間後に尾採血を行った。その後、心採血によって屠殺し、肝臓を摘出した。ヒト試験ではブルーベリー葉エキス 1 %含有の飲料を 100 ml 摂取後、アルコール相当量として 0.5 g/kg 体重になるようにビールを摂取した。摂取終了直後から 0，30 分，1，2，4，6 時間後に採血を行った。採血で得られた血液から血漿を分離した。SD ラットの血清エタノール濃度は control 投与群と比較して BLEx 投与群では 30 分後と 4 時間後で有意に低値を示し、血清エタノール濃度の曲線下面積（AUC）は control 投与群と比較して BLEx 投与群で有意に低値を示した。SD ラットの肝臓 Alcohol dehydrogenase（ADH）活性はエタノール投与群で有意に増加したが、BLEx 投与群でその増加が有意に抑制された。SD ラットの肝臓 Aldehyde dehydrogenase（ALDH）活性は有意な変化は見られなかった。SD ラットの血清 GPT 活性はエタノール投与によって増加傾向にあったものが BLEx 投与でエタノール非投与群に近い状態に戻った。ヒト血漿エタノール濃度はプラセボ群と比較してエキス飲料群では 1 時間後で有意に低値を示した。ヒト血漿アセトアルデヒド濃度も、30 分後，4 時間後，6 時間後においてエキス飲料群で有意な減少が見られた。このことから、BLEx が飲酒による毒性から肝臓を保護し、アルコール代謝を亢進させてエタノールやその代謝物を生体内から速やかに分解する作用があることが期待される。

blue berry leaf extraction (BLEx), alcoholic metabolism, alcoholic liver injury

講演番号：2F45p14
講演日時、会場：3 月 27 日 16:43～ F 校舎 45 会場

ポリアミン経口摂取による肝再生促進効果と熱ストレス精巣障害の保護効果

Effects of liver regeneration and heat-stress condition testicular disease recovery by oral administration of polyamine

○渡辺 卓巳[1]、坂野 綾子[1]、伊地知 哲生[1]、土井 淳司[2,3]、奥村 晋也[3]、藤本 康弘[2,3]、笠原 尚哉[2]、浦橋 泰然[2]、高山 達也[2]、寺谷 工[2] ([1]コンビ株式会社、[2]自治医大医、[3]京都大医)
○Takumi WATANABE[1], Ayako SAKANO[1], Tetsuo IJICHI[1], Atsushi DOI[2,3], Shinya OKUMURA[3], Yashuhiro FUJIMOTO[2,3], Naoya KASAHARA[2], Taizen URAHASHI[2], Tatsuya TAKAYAMA[2], Takumi TERATANI[2] ([1]Combi Corp., [2]Jichi Medical Univ., [3]Kyoto Univ.)

【目的】ポリアミンは核酸・蛋白質の合成促進作用、酵素活性化作用など様々な生理活性を有しており、ヒト線維芽細胞を賦活化させるという報告例もある。そこで本研究では、ポリアミンの経口摂取による組織や臓器などに対する有効性を次の実験で検討した。実験１では、生体間における過小グラフト肝移植を想定した擬似肝移植モデルラットを用いた肝再生率の検討。実験２では、精巣に熱ストレスを負荷した精巣障害モデルでの回復効果を検討した。
【方法】実験１、28-32 週齢・オスの Lewis ラットの肝臓を 70%切除した。尚、生体肝移植のレシピエントおよびドナーを想定し虚血再灌流障害の有無においても検討した。肝切施行 3 日前から実験飼料（ポリアミン不含飼料およびポリアミン 0.05%含有飼料）に切り替え、肝切後 7 日目に犠牲死させ、生存率、肝再生率、病理標本にて評価した。
実験２、7 週齢・オスの ICR マウスを麻酔下にて半身を 42℃の温水に 30 分浸水させ精巣に熱ストレスを負荷させた。ストレス負荷後に飼料を実験飼料（(ポリアミン不含飼料、ポリアミン 0.05%含有飼料および大豆抽出ポリアミン含有飼料）に切り替えた。その後、1 週間毎に解剖し精巣を摘出し病理学的観察およびポリアミン濃度等で評価した。
【結果】実験１、レシピエントを想定した虚血再灌流障害有りモデルでは、ポリアミン含有飼料群で有意に肝臓再生促進の効果が認められた。また、生存率においてもポリアミン不含飼料群は 3/6 だったのに対し、ポリアミン含有飼料群は 6/7 であった。Ki67 陽性細胞率を計測した結果、術後 24 時間でポリアミン含有飼料群において有意に高値を示した。ドナーを想定した虚血再灌流障害無しモデルに対しても、ポリアミン含有飼料群で有意に肝臓再生促進の効果が認められた。
実験２、熱ストレス負荷 1 週間後においてポリアミン不含有飼料では精細管で脱細胞の現象が認められた。それに対しポリアミン含有、大豆ポリアミン含有飼料は脱細胞が認められなかった。
【考察】肝再生に関しては、虚血再灌流障害の有無に関わらずポリアミン 0.05%含有飼料を術前 3 日前から経口摂取することで再生促進に寄与することが判明した。また、熱ストレス負荷精巣障害モデルにおいてはポリアミン経口摂取により脱細胞を抑制することが判明した。以上よりポリアミンを摂取することで生体肝移植時の補助療法や男性不妊、家畜の夏季不妊に対して有用性が期待できる。

polyamine, liver, testis

講演番号：2F45p15
講演日時、会場：3 月 27 日 16:54～ F 校舎 45 会場

カルノシンによる腸管上皮細胞におけるミトコンドリア生合成の促進とその分子制御機構の解明

The regulatory mechanism of facilitating mitochondrial biogenesis by Carnosine in the intestinal epithelial cells

○藤井 薫[1]、松本 貴之[2]、佐藤 三佳子[2]、森松 文毅[2]、片倉 喜範[1,3]([1]九大院シス生、[2]日ハム中研、[3]九大院農院)

○kaoru fujii[1], takashi matsumoto[2], mikako sato[2], fumiki morimatsu[2], yoshinori katakura[1,3] ([1]Grad. Sch. Sys. Life Sci., Kyushu Univ., [2]R&D Center Nippon Meat Packers, Inc., [3]Fac. Agri., Kyushu Univ.)

【背景・目的】

我々はこれまでに、食肉成分の一種であるカルノシンが、腸管上皮細胞において転写共役因子 PGC-1α を活性化することで、ミトコンドリアの新生を亢進する働きを有することを明らかにしている。本研究では、カルノシンが PGC-1α を活性化するまでの分子制御機構を明らかにするとともに、腸管上皮においてミトコンドリアの生合成が促進されることで腸管にもたらされる影響について解析することを目的とした。

【方法】

ヒト腸管上皮細胞のモデルとしてヒト結腸癌由来 Caco-2 細胞を用いた。カルノシンを添加し培養した Caco-2 細胞より全 RNA を抽出し、qRT-PCR により PGC-1α の mRNA 発現量を追跡した。ミトコンドリアは MitoTracker Red を用いて染色し、その数及び面積を IN Cell Analyzer 1000 により定量化した。リン酸化型 AMPK は免疫染色法により定量した。SIRT1 については qRT-PCR を用いて mRNA 発現量を追跡するとともに、その補因子 NAD^+に関しては NAD^+/NADH Quantification Colorimetric Kit を用いて定量した。

【結果】

qRT-PCR 及び IN Cell Analyzer 1000 を用いた解析結果から、カルノシンは Caco-2 細胞において PGC-1α の発現を増強し、その結果としてミトコンドリアの数およびミトコンドリア DNA のコピー数を有意に増加させることが明らかとなった。免疫染色法により、カルノシンは AMPK のリン酸化を促進する傾向が認められたが、SIRT1 の mRNA 発現量に大きな変化はみられなかった。一方、カルノシンによって Caco-2 細胞内の NAD^+/NADH の比率が増加していたことから、カルノシンは細胞内 NAD^+量を増加させることで SIRT1 の脱アセチル化酵素としての活性化を促す可能性が示唆された。

【結論】

本研究により、カルノシンは腸管上皮細胞において AMPK を活性化することで NAD^+量を増加させ、これにより SIRT1 による PGC-1α の脱アセチル化が促進され、その結果ミトコンドリアの新生が亢進されるという一連の反応プロセスが明らかとなった。今後は AMPK 活性化に重要なセカンドメッセンジャーである細胞内 Ca^{2+}動態を追跡する。

Carnosine, mitochondria, Caco-2

講演番号：2F45p16
講演日時、会場：3 月 27 日 17:15～ F 校舎 45 会場

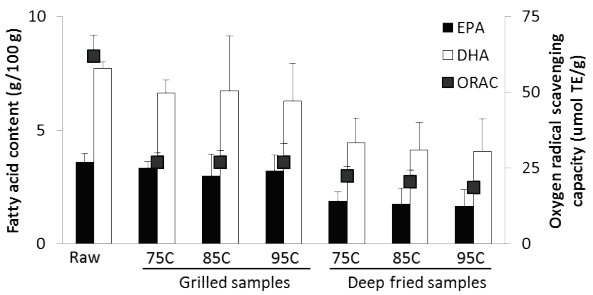
Effects of heat treatments on the health properties of Pacific saury

○Lennie CHEUNG, Haruo TOMITA, Toshikazu TAKEMORI (Delicious and Healthy Cooking Science Laboratory, Energy Technology Laboratories, Osaka Gas Co., Ltd.)

Introduction: Pacific saury (*Cololabis saira*), a fish commonly consumed in the Japanese diet, contains high contents of the essential fatty acids eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA). Heat treatment by traditional cooking methods may decrease the contents of these thermally-unstable nutrients. Therefore, this study aimed to assess the effects of gas grilling and deep frying on the health properties of whole Pacific saury.

Methods: Fresh Pacific saury were grilled or deep fried in oil until center temperatures of 75, 85, and 95 °C. EPA and DHA contents, thiobarbituric acid reactive species (TBARs), carbonyl value, and oxygen radical scavenging activity (ORAC) were measured before and after cooking, while sensory characteristics of grilled samples were assessed instrumentally and by human panelists.

Results: Grilled samples were found to contain significantly higher EPA and DHA contents than deep fried samples. Decreases in EPA and DHA contents after grilling may, in part, be due to physical losses, as suggested by the presence of EPA and DHA in leaked fish oil recovered after grilling. Both cooking methods resulted in significantly lower ORAC values, while increases in TBARs and carbonyl values were not significant. The three final center temperatures used were not found to affect EPA and DHA contents, markers for lipid oxidation, and ORAC values of cooked samples. In preliminary sensory evaluations, samples grilled to higher final center temperatures were found to have higher hardness and lower juiciness, results that were consistent with those obtained instrumentally. The overall texture properties of fish samples may be influenced by those of the skin and dark meat, as opposed to the white meat obtained near the spine. Significant differences in taste attributes and overall deliciousness were not observed.



Conclusion: These results suggest that the final center temperature of grilled, whole Pacific saury may be adjusted to suit personal preferences without significant effects on health properties.

heat treatment, thermal stability, fatty fish

講演番号：2F45p17
講演日時、会場：3 月 27 日 17:26～ F 校舎 45 会場

Cs と Sr の吸収抑制及び排泄促進効果を示す食品素材・成分の探索

Effect of food materials and components on absorption and excretion of cesium and strontium

○上原 祐也、島村 裕子、保田 倫子、増田 修一 (静県大食)
○Yuya UEHARA, Yuko SHIMAMURA, Michiko YASUDA, Shuichi MASUDA (University of shizuoka)

【背景】福島第一原発の事故により、多くの放射性物質が環境中に放出され、放射線被曝によるヒトへの生体影響が危惧されている。特に、放射性物質の中でも Cs-137 と Sr-90 は半減期が長いため、これら放射性物質に汚染された食品の摂取により、長期的な内部被曝が起こることが考えられる。したがって、Cs-137 や Sr-90 の体内への吸収を抑制することや、体内に取り込まれた場合、迅速に排泄することが重要である。本研究では、Cs または Sr の吸収を抑制及び排泄を促進する食品素材や成分を探索することを目的として実験を行った。
【実験】本実験には安定同位体である CsCl や $SrCl_2$を用いた。(1) in vitro 試験において、食物繊維等成分(アルギン酸ナトリウム、イヌリン、ラミナラン、メチルセルロース、ムチン)やそれらを含む食品(モロヘイヤ、昆布)を水に溶解または懸濁し、CsCl または $SrCl_2$水溶液を加えて 30 分間放置した。遠心式限外ろ過(15000×g, 20min, 37℃)を行い、ろ液中の Cs 及び Sr 濃度を ICP-MS を用いて測定し、各試料の Cs 及び Sr との結合性を求めた。(2) in vitro 試験において結合性が確認できた試料を、ICR マウス(5 週齢、雄)に経口投与後、直ちに CsCl または $SrCl_2$水溶液を単回経口投与し、24 時間後に解剖を行った。Cs 投与群については、肝臓、腎臓、大腿筋、ふくらはぎ、血漿を採取し、Sr 投与群については、肝臓、腎臓、大腿筋、大腿骨、血漿を採取した。各生体試料を、硝酸を用いて酸分解した後、ICP-MS で Cs 及び Sr 量を測定した。
【結果】(1)in vitro 試験において、アルギン酸ナトリウム及びメチルセルロースが、Cs との結合性を示した。Sr においては、アルギン酸ナトリウム、メチルセルロースに加え、昆布、モロヘイヤ、ラミナランが結合性を示した。(2)in vivo 試験において、アルギン酸ナトリウムの投与による Cs 量の減少は、各臓器で確認できなかった。また、アルギン酸ナトリウム、メチルセルロース、昆布、モロヘイヤ、ラミナランは、大腿骨における Sr 濃度を減少し、これらの素材、成分に Sr の吸収抑制効果が確認できた。現在、Cs または Sr の吸収抑制及び排泄促進効果を示す食品素材や成分の探索を継続して行っている。

cesium, strontium, absorption

講演番号：2F45p18
講演日時、会場：3 月 27 日 17:37～ F 校舎 45 会場

粉末あるいは固形飼料を摂取させたラットの摂食行動および視床における発現遺伝子の比較解析
Comprehensive thalamic gene expression analysis of rats fed a soft diet and those fed a hard diet

○永井 俊匡[1]、清水 愛恵[1]、齊藤 美佳[1]、緑川 景子[2]、熊倉 慧[1]、阿部 啓子[2]、朝倉 富子[2]([1]高崎健大・栄養、[2]東大院・農生科・応生化)
○ Toshitada NAGAI[1], Manae SHIMIZU[1], Mika SAITO[1], Keiko MIDORIKAWA[2], Kei KUMAKURA[1], Keiko ABE[2], Tomiko ASAKURA[2] ([1]Takasaki Univ. of Health and Welfare, [2]Univ. of Tokyo)

【目的】 咀嚼は、単に口腔内における消化作用の一つであるだけでなく、脳の活性化やアルツハイマー病の進行防止、運動機能の向上など、広範な生理効果を持つことが明らかになっている。しかし、これら咀嚼の効果について、行動学的・生化学的な研究は進んでいるが、遺伝子レベルの研究についての報告は少ない。本研究は、咀嚼がラットの身体、特に脳にどのような変化を及ぼすかを、行動学的解析に加えて、遺伝子発現の比較解析をすることによって明らかにすることを目的とした。そこで、粉末飼料と固形飼料の飼料性状の差をもって咀嚼量に差があると見なし、両群の視床における遺伝子発現を DNA マイクロアレイ解析で比較した。
【方法】 3 週齢の Wistar 系雄ラットを 2 群に分け、AIN-93G 粉末飼料または AIN-93G に準じた組成の固形飼料を与え、15 週間飼育した。その間、体重、摂食量を測定し、デジタルビデオカメラを使用して夜間の行動を観察した。解剖直前に血圧を測定後、大脳半球、視床、視床下部、小脳、延髄、血清、血漿を採取した。視床から total RNA を抽出し、Affymetrix Rat Genome 230 2.0 Array を用いた DNA マイクロアレイ解析を行った。データを GCRMA 法で正規化し、階層的クラスタリングを行った。さらに rank products 法を用いて 2 群間比較を行い、false discovery rate (FDR) <0.05 のプローブセットを有意に発現変動した遺伝子 (differentially expressed genes, DEGs) として抽出した。DEGs を DAVID で機能的にクラス分けし、FDR 補正 *p*-value <0.01 の Gene Ontology (GO) タームを、QuickGO を用いて階層化した。
【結果】 体重および摂食量は、15 週間にわたって両群間に有意差はなかった。夜間の行動については、粉末群の全体行動量と、餌以外の物を噛む行動の頻度が、固形群と比較して多かった。また、粉末群の平均血圧、拡張期血圧が有意に上昇した。収縮期血圧も、有意差はなかったものの、同様に粉末群が高い傾向にあった。よって、咀嚼機会の減少によって行動量や血圧が上昇することが示唆された。
　視床における遺伝子発現解析の結果、粉末群の 1 サンプルを除いて、粉末群と固形群はぞれぞれのクラスターを形成した。粉末群で有意に上昇したプローブセットは 187 個、低下したプローブセットは 728 個であった。GO 解析の結果、神経伝達物質の分泌制御、カテコールアミン代謝、カリウムイオンの恒常性制御などの神経細胞活動や機械刺激応答などに関与する遺伝子群の発現変動が示唆された。
【謝辞】 本研究は、総合科学技術・イノベーション会議の SIP（戦略的イノベーション創造プログラム）「次世代農林水産業創造技術」によって実施されました。

DNA microarray, thalamus, mastication

講演番号：2F45p19
講演日時、会場：3 月 27 日 17:48～ F 校舎 45 会場

ラクトフェリシンおよびアミド化ラクトフェリンのアカントアメーバシスト体における抗アメーバ活性

Amoebicidal activity of lactoferricin and amidated lactoferrin against *Acanthamoeba* sp. cysts.

○鈴木 智恵[1]、野町 美弥[2]、今安 正樹[2]、佐々木 香る[3]、冨田 信一[1]([1]玉川大農、[2]株式会社メニコン、[3]JCHO 星ヶ丘医療センター)
○Chie SUZUKI[1], Miya NOMACHI[2], Masaki IMAYASU[2], Kaoru SASAKI[3], Shinichi TOMITA[1] ([1]Tamagawa Univ., [2]Menicon Co., Ltd., [3]JCHO Hoshigaoka Medical Center)

［背景および目的］アカントアメーバによる角膜炎は，ソフトコンタクトレンズ装用者での発症が多く，病期が進みアメーバがシスト化すると治療は困難となる．ラクトフェリン（LF）は，牛乳や母乳，涙液中などに含まれる鉄結合性の塩基性糖タンパク質であり，鉄をキレートすることで抗微生物活性を示すことが知られている．これまでに，ウシ LF（bLF）のアカントアメーバにおける抗アメーバ活性について検討したところ，鉄不飽和 bLF（apo-bLF）は栄養体に対して非常に高い抗アメーバ活性を示したが，シスト体に対しての抗アメーバ活性では低下が認められた．

LF はアミド化することである種の微生物に対する抗微生物活性が増加するといわれている．また，LF のペプシン分解物中に見出される抗菌性ペプチドのラクトフェリシン（LFcin）は，LF よりも数十倍から数百倍の抗微生物活性を有する．そこで本研究では，薬剤耐性の高いシスト体の消毒を目的として，アミド化 bLF および LFcin の成熟シスト体に対する抗アメーバ活性について検討した．

［方法］実験には *Acanthamoeba* sp. AA014 臨床分離株を用いた．これを EM 培地で２週間培養して成熟シスト体の懸濁液（1×10^6 cells/mL）を調製し，各サンプルによる 1，4 および 24h 処理後のシスト体の生残性を Log reduction 法ならびに ATP 法で検討した．また，$DiBAC_4(3)$および PI を用いたフローサイトメトリー法でアメーバの表層状態について検討した．

［結果および考察］LFcin 300 ppm で成熟シスト体を処理したところ，1h および 4h 処理でそれぞれ約 0.5 log，24h 処理で約 2 log の低下を示した．栄養体の場合と比べると長い処理時間を必要としたが，十分な抗アメーバ活性が認められた．次いで，ATP 量について，apo-bLF ならびにアミド化 bLF 8000 ppm で成熟シスト体を 24h 処理した場合，未処理に比べて apo-bLF では ATP 量が約 60%の減少を示した．一方，同一条件でのアミド化 bLF および LFcin では，ATP 量はそれぞれ約 90%および 95%の減少を示した．このように，アミド化 bLF および LFcin では，成熟シスト体に対して apo-bLF より高い抗アメーバ活性を示すことが明らかとなった．さらに，アミド化 bLF および LFcin 処理によって，$DiBAC_4(3)$や PI による蛍光強度が増加したことから，成熟シスト体の表層に損傷を与えている可能性が示唆された．

lactoferrin, lactoferricin, *Acanthamoeba*

講演番号：2G41a01
講演日時、会場：3 月 27 日 09:00～ G 校舎 41 会場

野沢菜抽出物による免疫賦活作用とそのメカニズム

Mechanism of Immunomodulation by the Extract of *Brassica rapa* L. var. *hakabura*

○田中 沙智[1]、古屋 花暖[1]、山田 和輝[1]、山本 佳奈[1]、杉山 陽司[2] ([1]信州大農、[2]まるたかグループ)
○ Sachi TANAKA[1], Kanon Huruya[1], kazuki Yamada[1], Kana Yamamoto[1], Yoji Sugiyama[2] ([1]Shinshu Univ., [2]Marutaka Group)

【背景と目的】野沢菜は長野県野沢温泉村を中心とした信越地方で栽培される野菜で、野沢菜の利用法としては、葉と茎を漬物にした野沢菜漬けが有名である。野沢菜の栄養成分は、カロテンやビタミン C、食物繊維が多く含まれていることが知られているが、免疫に対する作用についてはよくわかっていない。そこで本研究では、野沢菜の抽出物による免疫賦活作用について検討した。
【実験方法】野沢菜をオートクレーブで処理することにより、野沢菜熱水抽出物を得た。得られた抽出物をマウス脾臓細胞に添加し、４８時間培養したときの上清中に含まれる IFN-γ産生量を ELISA で測定した。また、骨髄由来樹状細胞（BMDC）に野沢菜抽出物を添加した時の IL-12 産生レベルを ELISA で測定し、細胞表面マーカー（MHC クラス II、CD86）の発現変化をフローサイトメーターで調べた。さらに、野沢菜を 24 時間漬込んだ浅漬と、６ヶ月間漬込んだ古漬からそれぞれ熱水抽出物を調製し、マウス脾臓細胞に添加した時の IFN-γ産生誘導能を検討した。
【結果と考察】野沢菜抽出物は、マウス脾臓細胞に対して Type1 サイトカインである IFN-γを産生誘導した。野沢菜抽出物を BMDC に添加したところ、IL-12 が産生され、細胞表面マーカーである MHC クラス II と CD86 の発現が上昇した。また、脾臓細胞からの IFN-γ産生は抗 IL-12 抗体の処理により阻害された。さらに、野沢菜の浅漬と古漬の抽出物は、生の野沢菜の抽出物に比べて、IFN-γの産生誘導能が著しく亢進していた。以上のことから、野沢菜抽出物は樹状細胞からの IL-12 産生を促し、IFN-γ産生を誘導することにより、Type1 免疫を賦活化することが示された。また、漬物にした場合、免疫賦活効果が亢進することから、野沢菜漬を摂取した場合の免疫機能制御が期待できる。今後は、活性成分の同定と免疫賦活メカニズムを詳細に明らかにする予定である。

immunomodulation, IFN-gamma, dendritic cells

講演番号：2G41a02
講演日時、会場：3 月 27 日 09:11～ G 校舎 41 会場

緑茶浸出液中に含まれる RNA のプロファイリングとマクロファージ様細胞に対する食作用活性増強効果

The profiling of RNA in green tea infusion and its biological effect on the enhancement of the phagocytic activity of macrophage-like cells.

○物部 真奈美、野村 幸子、荻野 暁子、谷口 郁也（（独）農研機構野菜茶業研究所）
○Manami MONOBE, Sachiko NOMURA, Akiko OGINO, Fumiya TANIGUCHI (NARO Institute of Vegetable and Tea Science)

【目的】緑茶（*Camellia sinensis* L.）は様々な健康効果を有する機能性食品として注目されており，その健康機能の１つとして以前から免疫調節能が報告されている。緑茶抽出液中に多く含まれる水溶性高分子やカテキン類は免疫調節機能を有する主要な成分として知られている。しかし，カテキン類については比較的よく調べられているものの，水溶性高分子についてはほとんど調べられていない。以前我々は，緑茶幼葉由来水溶性高分子（iTPS）がマクロファージ様細胞の食作用活性を増強することを発見し，その作用機序として，iTPS 中の１本鎖 RNA が Toll 様レセプター7（TLR7）を介して活性を誘導していることを報告した。そこで，今回は緑茶浸出液中に含まれる RNA の大きさや種類を調べ，これらの違いにより活性に違いがあるのかどうかを調べたので報告する。

【方法】
（cDNA 合成と RNA 配列決定）緑茶浸出液中に含まれる RNA をエタノールで抽出し、精製後 cDNA を合成した。合成した cDNA は T-Vector pMD20 にライゲーションしてクローン化した。M13 primers (M13 primer RV, M13 primer M4）でクローン化した領域を PCR 増幅し，増幅された断片をシーケンスし配列を決定した。シーケンスは Quality の低い配列，ベクターを取り除いてアッセンブルを行った。
（RNA 活性測定）HL60 細胞をカルシトリオール（活性型ビタミン D）で１週間刺激しマクロファージ様細胞へ分化誘導させた後，マクロファージ様細胞へ緑茶 RNA を作用させた（final conc. 3 μg/mL)。マクロファージ様細胞の食作用活性変化は、蛍光ビーズの取り込み活性指標にフローサイトメーターを用いて測定した。

【結果】今回，緑茶浸出液中から 88 個の配列が得られた。得られた 88 種類の配列からランダムに 15 種類を選び出して活性を調べたところ，リボゾーム RNA 由来の RNA の活性が弱い傾向にあった。チャ新芽中の発現遺伝子では（900bp 以上のものを除くと）各サイズの RNA がほぼ同じ比率で含まれているのに対して，今回の方法で得られた緑茶浸出液中の RNA は 100bp から 300bp のサイズに偏ったものが得られた。この偏ったサイズはクローニング方法によるものなのかどうかは不明であるが，RNA の長さ（66-630 bp）と活性に相関性は認められなかった。また，今回活性が得られた緑茶 RNA と既に報告されている TLR7 を活性化する RNA に相同配列は含まれていなかった。

Green tea (*Camellia sinensis* L.) RNA, Macrophage, phagocytic activity

講演番号：2G41a03
講演日時、会場：3 月 27 日 09:22～ G 校舎 41 会場

イタドリ（*Polygonum cuspidatum*）葉 MeOH 抽出物中の抗アレルギー成分の解明
Isolation and Identification of Anti-allergy Compounds in *Polygonum cuspidatum* Leaf

○木下 あゆみ[1]、栗田 せりか[1]、市田 彩香[1]、野村 凛[1]、柏木 丈拡[1]、菅原 卓也[2]、島村 智子[1]、受田 浩之[1]（[1]高知大農、[2]愛媛大農）
○Ayumi KINOSHITA[1], Serika KURITA[1], Saika ICHIDA[1], Rin NOMURA[1], Takehiro KSHIWAGI[1], Takuya SUGAWARA[2], Tomoko SHIMAMURA[1], Hiroyuki UKEDA[1] ([1]Kochi Univ., [2]Ehime Univ.)

【目的】近年、アレルギー症状を訴える人が年々増加し社会問題となっている。アレルギー疾患は大きくⅠ型～Ⅴ型の 5 種に分類され、中でもⅠ型のアレルギーは日常的に起こる花粉症やアトピー性皮膚炎、気管支喘息などの発症機構として知られている。Ⅰ型アレルギーは抗原の感作による IgE の産生と、続くマスト細胞からのヒスタミンの放出によって引き起こされる。当研究室は、イタドリの MeOH 抽出物がマスト細胞からの脱顆粒を強く抑制することを見出した。イタドリは東アジア原産のタデ科の多年生植物で、高知県ではイタドリの新芽や葉などを食する文化がある。本研究では、高い活性を示したイタドリの葉に含まれる抗アレルギー活性成分の解明を試みた。
【方法】イタドリの葉 500 g を 80%MeOH で抽出し、濃縮乾固後 1.0 g 当量/mL に定容したものをイタドリ葉粗抽出液とした。その抽出液を液液分配、ODS 中圧カラムクロマトグラフィー、逆相系 HPLC で順次分画し、活性を調べた。抗アレルギー活性は脱顆粒抑制と正の相関があるヒアルロニダーゼ阻害活性を指標とした。サンプルにヒアルロニダーゼ溶液を加え、インキュベート（37℃、20 分）後、活性剤を添加し、さらにインキュベート（37℃、20 分）した。その後、基質としてヒアルロン酸 Na を加え 60 分間（37℃）反応させた後、0.4 N NaOH を加え、反応を停止させた。そこにホウ酸カリウム溶液（pH 9.3）を加え、インキュベート（100℃、3 分）後、DMAB 溶液を加え、インキュベート（37℃、20 分）し、585 nm の吸光度測定を行い、サンプル 50 mg 当量/mL における阻害率をもとに評価した。単離・精製した活性成分は LC-MS および NMR 分析にて構造解析を行った。
【結果および考察】イタドリ葉 80%MeOH 抽出物のヒアルロニダーゼ阻害活性を測定したところ、高い活性（117%）が認められた。この MeOH 抽出液を液液分配により分画した結果、水層上清が高い活性（102%）を示した。この水層上清を ODS カラムクロマトグラフィーで 0%、20%、40%、100%MeOH 画分に分画したところ、40%MeOH 画分に高い活性（43%）が認められた。そこで 40%MeOH 画分を HPLC に供し、保持時間に従い、Fraction1～7 に分画し、活性を測定した。その結果、各画分は単独では活性が非常に低いものの（0～2%）、全ての画分を混合すると、活性が大幅に増加した（22%）。従って、イタドリ葉が示すヒアルロニダーゼ阻害活性は複数の成分が、相加的あるいは相乗的に作用することで発現していることが示唆された。現在、これらの関与成分を単離し、構造解析を行っている。

Polygonum cusoidatum, anti-allergic activity, hyaluronidase inhibitor

講演番号：2G41a04
講演日時、会場：3 月 27 日 09:33～ G 校舎 41 会場

新規作用機構を持つイチジク茶の抗アレルギー作用

Novel mechanism of anti-allergic effect by fig tea

○阿部 竜也、高橋 徹、沖浦 文（公益財団法人　東洋食品研究所）
○Tatsuya ABE, Toru TAKAHASHI, Aya OKIURA (Toyo Institute of Food Technology)

【背景・目的】

当研究所の所在地である、兵庫県川西市は、イチジク（*Ficus carica L.*）の産地として知られている。我々は、イチジクを題材とした食品機能性研究から、葉を加工した茶に抗アレルギー性成分が含まれていることをラット好塩基球性白血病細胞 RBL-2H3 株を用いて明らかにした。また、イチジク茶を処理した細胞では、IgE 抗体の結合量が半分に減少しており、イチジク茶の作用機構は、IgE 抗体と Fc ε RI 受容体の結合阻害であることを明らかにした。そこで、抗アレルギー性食品としてのイチジク茶の利用を目的とし、標的分子の探索と有効成分の同定を試みた。

【方法・結果】

作用機構からイチジク茶成分は、感作前の IgE 抗体あるいは Fc ε RI 受容体のどちらかと作用することで、抗体－受容体の結合阻害を引き起こすと推測された。感作前にイチジク茶で処理した抗体と細胞を用いて、アレルギー反応を誘発させたが、抑制効果は確認されなかった。イチジク茶の標的分子が抗体－受容体複合体であると仮定し、感作状態にある細胞をイチジク茶で処理し、培養液中に放出される IgE 抗体量をイムノブロット法により測定したところ、イチジク茶処理区における培養液中の遊離 IgE 抗体量は、対照区の 4 倍以上に増加していた。この結果から、イチジク茶の標的分子は、抗体-受容体の複合体であり、その作用機構は、感作状態の細胞に作用し、受容体に結合した抗体を解離させることと推測された。

有効成分探索のため、C18 カラムを用いて、イチジク茶成分を極性に従って分画したところ、保持時間の最も短い高極性画分（保持時間 0-1 分）で、イチジク茶より強い抑制作用が確認された。この高極性画分の作用機構を確認した結果、処理後 3 時間で培養液中の遊離抗体量が対照区の 2 倍になり、その後 12 時間で 4.6 倍まで増加した。現在、当該画分の同定を進めている。

anti-allergy, food function, RBL-2H3

講演番号：2G41a05
講演日時、会場：3 月 27 日 09:44～ G 校舎 41 会場

マウス T 細胞応答に及ぼす粉体麹の調節作用

Regulatory effects of koji on murine T cell responses

○利根川 直也[1]、若井 寿樹[1]、鴨井 聖広[1]、関口 昭博[2]、榎本 淳[1] ([1]群大院理工、[2]群馬産技セ)
○Naoya TONEGAWA[1], Toshiki WAKAI[1], Kiyohiro KAMOI[1], Akihiro SEKIGUCHI[2], Atsushi ENOMOTO[1] ([1]Gunma Univ., [2]Gunma Industrial Technology Center)

【目的】粉体麹は通常の麹と比較して、酵素やビタミンなどの産生量が 2～5 倍に増大するが、免疫系に及ぼす作用が検討された例はほとんどない。本研究では種々の粉体麹を作製し、主にマウス T 細胞の増殖応答ならびにサイトカイン応答に与えるそれらの効果について検討することを目的とした。
【方法】関口らが開発した方法（特許 3858068 号）を用いて、原料（米糠、小麦粉、飛粉）および麹菌（清酒用種麹（黄麹)、本格焼酎麦用種麹（白麹)、醤油用種麹（醤油麹)、全て樋口松乃助商店製）の組合せを変え、6 種類の粉体麹を作製した。BALB/c マウス（8～9 週齢、♀）をあらかじめ CFA と共に主要な鶏卵アレルゲンであるオボアルブミン（OVA）にて免疫した後、それらのリンパ節細胞を取り出し、その抗原特異的なあるいは抗 CD3 抗体刺激による T 細胞増殖応答を ^{3}H 標識チミジンの細胞内取込み量を指標として測定した。そこに上記粉体麹を 0.1～100μg/ml 添加し培養することにより、T 細胞増殖応答に及ぼす粉体麹の影響について調べた。同じく OVA で免疫した BALB/c マウスの脾臓細胞を抗原、抗 CD3 抗体、さらには粉体麹（0.1～100μg/ml）を添加して 3 日間培養した。培養 1～3 日目の培養上清をそれぞれ回収し、それらに含まれる IL-4、6、10、12、IFN-γ産生量を ELISA により測定・比較し、各種サイトカイン応答に及ぼす粉体麹の効果を検討した。
【結果および考察】6 種類の粉体麹から米糠および黄麹で製造した粉体麹を選択し、抗原特異的なあるいは抗 CD3 抗体刺激によるマウス T 細胞増殖応答に対する影響を検討したところ、その添加濃度に関わらず、促進も抑制もしないことが明らかとなった。次に、同じくマウス T 細胞の抗原および抗 CD3 抗体刺激により誘導される各種サイトカイン応答に及ぼすこの粉体麹の作用を検討した。その結果、IL-6 応答に対してはほとんど影響しないものの、IL-4 や IL-10 応答を添加濃度依存的に抑制し、逆に IFN-γ応答をやはり濃度依存的に促進する傾向があることが見出された。なお IL-12 応答に関しては、抗原や抗 CD3 抗体刺激によりほとんど誘導されず、そこにこの粉体麹を添加しても、それが増大することはなかった。このような傾向は原料や麹菌の異なる残り 5 種類の粉体麹を用いた場合においても、同様に観察された。最後に、このような粉体麹の効果が麹菌に起因するのかどうか確認するために、粉体麹の代わりに 3 種類の麹菌を用いて同様な実験を試みた。その結果、どの麹菌を用いても粉体麹と同様な傾向が見出されたが、特に黄麹を用いた場合が顕著であった。以上の結果から、粉体麹および麹菌はマウス T 細胞の増殖応答にはほとんど影響を与えないものの、Th1 応答を高め、逆に Th2 応答を弱める効果があると考えられた。

Koji, T cell response, Cytokine

講演番号：2G41a06
講演日時、会場：3 月 27 日 10:05～ G 校舎 41 会場

スサビノリ由来硫酸化多糖体ポルフィランの生物活性
Bioactivities of porphyran isolated from nori (*Porphyra yezoensis*)
井坂 章吾、上野 幹憲、山口 健一、○小田 達也 (長崎大水)
Shogo ISAKA, Mikinori UENO, Kenichi YAMAGUCHI, ○Tatsuya ODA (Nagasaki Univ.)

【目的】ノリ（海苔）の原料であるスサビノリの養殖現場では、近年、珪藻赤潮の発生に伴う海域の栄養塩の不足などが原因で生長不良による色落ちノリ問題が深刻化している。色落ちノリは商品価値が極めて低い事から、色落ちノリの有効利用法が求められている。一方、スサビノリの主要成分である硫酸化多糖体ポルフィランは様々な生理活性を示す事が知られている。本研究では、色落ちノリの有効利用法の手がかりを得る事を目的して、色落ちノリからポルフィランを抽出し、その生物活性について正常ノリ由来ポルフィランと比較した。
【方法】ノリサンプルからアルコール抽出により色素成分を除去後、熱水抽出及びアルコール沈殿によりポルフィランを得、続いて種々のクロマトグラフィーに供し、ポルフィランを調製した。生物活性としてリポポリサッカライド (LPS) 刺激マウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 細胞からの一酸化窒素 (NO) 産生放出及び腫瘍壊死因子 (TNF-α) 放出に対するポルフィランの影響をそれぞれ、Griess 法及び ELISA 法により測定した。ポルフィランの抗酸化活性としてスーパーオキサイド及びヒドロキシラジカル消去活性を化学発光法及び ESR 法によりそれぞれ測定した。
【結果及び考察】ポルフィラン収率は色落ちノリの方が正常ノリより約 2 倍高かった。糖組成は両者で大差なかったが、正常ノリ及び色落ちノリ由来ポルフィランの平均分子量はそれぞれ約 220,000 及び 30,000 で、色落ちノリ由来ポルフィランは低分子量であった。両ポルフィランとも RAW264.7 細胞に対して 1,000 μg/ml まで細胞毒性は無かった。興味ある事に、LPS 刺激による RAW264.7 細胞からの NO 産生に対して色落ちノリ由来ポルフィランのみ強い抑制効果がみられた。また、色落ちノリ由来ポルフィランの TNF-α放出に対する効果は NO 産生に対する阻害効果に比べ、著しく劣っていた。従って、NO 及び TNF-α産生放出に対するポルフィランの作用機構は異なると推定された。一方、正常ノリ及び色落ちノリ由来ポルフィランはスーパーオキサイド及びヒドロキシラジカルに対してほぼ同程度の消去作用を示した。色落ちノリ由来ポルフィランを陰イオン交換クロマトグラフィーに供した結果、素通りした画分(F1)が得られたが、正常ノリの F1 画分量は痕跡程度であった。さらに、F1 画分は他の画分に比べより強い NO 産生抑制効果を示した。以上の結果から、色落ちノリからは正常ノリに比べより高収率でポルフィランが得られる事、さらに色落ちノリ由来ポルフィラン、特に F1 画分はマクロファージに対するより強い抗炎症作用を有する事から、色落ちノリは抗酸化及び抗炎症作用を有するポルフィランの原料として有用である事がわかった。

porphyran, antioxidant, anti-inflammatory

講演番号：2G41a07
講演日時、会場：3 月 27 日 10:16～ G 校舎 41 会場

マコンブ由来 F-フコイダンの I 型アレルギー抑制効果に対するガレクチン 9 の関与
Anti-allergic effect of galectin-9 secreted by F-fucoidan from *Laminaria Japonica*
○谷野 有佳[1]、橋本 堂史[1]、藍原 祥子[1]、尾島 孝男[2]、水野 雅史[1] ([1]神戸大院・農、[2]北海道大院・水産)
○ Yuka TANINO[1], Takashi HASHIMOTO[1], Yoshiko AIHARA[1], Takao OJIMA[2], Masashi MIZUNO[1] ([1]Kobe Univ., [2]Hokkaido Univ.)

【目的】褐藻類由来の食物繊維として知られているフコイダンは、免疫応答を調節することが報告されている。褐藻類の中でもマコンブに多く含まれる F-フコイダンは経口で摂取した際、生体内でどのような作用をするのかは不明な点が多い。これまでに F-フコイダンが I 型アレルギーに対して抑制効果を有していることを見出し、その効果は抗原提示や抗体産生に対する作用ではないということを明らかにした。その作用機序の解明を Caco-2 細胞と RBL-2H3 細胞の *in vitro* 共培養系を用いて試みたが、*in vivo* と同様の抑制効果はみられなかった。そのため、マウスの腸には発現しているが、Caco-2 細胞には発現していない因子が F-フコイダンの I 型アレルギー抑制効果に関与しているのではないかと考えた。そこで IgE と結合して肥満細胞の活性化を抑制するガレクチン 9 に着目し、F-フコイダンの I 型アレルギー抑制効果に対するガレクチン 9 の関与を調べた。

【方法】受動皮膚アナフィラキシー (PCA) 反応試験 : BALB/c マウス (5 週齢、雌) に抗原特異的 IgE を尾静脈から投与し、その 30 分後に抗原を耳介に塗布した。抗原塗布前と 2 時間後の耳介厚を測定し、その差を浮腫として浮腫形成の程度を比較した。F-フコイダンは PCA 反応試験の 4 日前から 200 μg/日となるように胃内強制投与及び腹腔内投与した。ガレクチン 9 の関与を調べる際には PCA 反応試験の 1 時間前に抗ガレクチン 9 抗体を尾静脈注射した。PCA 反応試験の 2 回目の耳介厚測定後に腸上皮細胞を剥離、RNA を回収し、ガレクチン 9 mRNA 発現量を測定した。

【結果】PCA 反応試験前に抗ガレクチン 9 抗体を血中に注入しておくと、IgE/抗原により誘導される浮腫形成に対する F-フコイダンの抑制効果が打ち消された。ガレクチン 9 は腸上皮細胞や免疫細胞など様々な細胞から分泌されることが知られているので、F-フコイダンがどのように作用してガレクチン 9 分泌を促しているのかを調べるため、F-フコイダンを胃内強制投与した場合と腹腔内投与した場合で比較した。その結果、PCA 反応試験における F-フコイダンの浮腫抑制効果は F-フコイダンの胃内強制投与時にのみみられ、腹腔内投与では効果がみられなかった。このことから F-フコイダンは腸上皮細胞に対して作用し、ガレクチン 9 を分泌させているのではないかと推測した。そこで F-フコイダンを 4 日間胃内強制投与したマウスの回腸上皮細胞でのガレクチン 9 mRNA 発現量を調べたところ、F-フコイダン非投与群に比べ発現量が増加していた。これらのことから F-フコイダンが腸上皮細胞に作用してガレクチン 9 分泌量を増加させ、その結果、IgE と親和性の高いガレクチン 9 が結合するため肥満細胞との結合が阻害され、I 型アレルギー反応が抑制されたと考えた。

fucoidan, allergy, galectin-9

講演番号：2G41a08
講演日時、会場：3 月 27 日 10:27～ G 校舎 41 会場

酸性多糖-オボアルブミン複合体のアレルギー改善効果

Improving allergy effect of acidic polysaccharide-ovalbumin conjugate

○平林 正大、片山 茂、山口 裕太、中村 宗一郎 (信州大農)
○Masahiro HIRABAYASHI, Shigeru KATAYAMA, Yuta YAMAGUCHI, Soichiro NAKAMURA (Shinshu Univ.)

【背景・目的】私達はこれまでにアレルギー性タンパク質-中性多糖複合体を調製し，得られた複合体にアレルギー改善効果があることを報告してきた 1)。今回は，中性多糖に代えて酸性多糖を用いて同様の研究を行った。これまでの研究で，オボアルブミン感作アレルギーモデルマウスにおいて，コンドロイチン硫酸にはアレルギー状態を改善する免疫調節機能を示すことが明らかにされている 2)。また，抗血液凝固剤として知られているヘパリンは，炎症細胞の浸潤を抑えることで抗炎症作用を示すとされている 3)。このように酸性多糖類は潜在的な糖鎖供与候補であるにも関わらず，分子中にカルボキシル基や硫酸基を有するため，天然の状態でタンパク質と複合体を形成することは困難であった。本研究では，酸性多糖類に亜硝酸ナトリウムを使用した加水分解により酸性多糖のグリコシド結合をランダムに切断して還元末端を増やす方法と，タンパク質と化学的共有結合を施すためのエネルギー供与過程を溶液状態で与える溶液法の 2 つの方法を用いて，オボアルブミン（OVA）との複合体形成を試み，OVA のアレルギー性の変化を調べたので報告する。
【方法】供試酸性多糖にはヘパリン（Hep）を，標的タンパク質には鶏卵主要タンパク質であるオボアルブミン（OVA）を用いた。酸性多糖の活性化には亜硝酸処理を用い，複合体形成には溶液法を用いた。まず，Hep を酸性条件下で終濃度 0.5%（w/v）となるように亜硝酸ナトリウムを加え加水分解を行った。これらの亜硝酸処理した酸性多糖と OVA とを混合し 0.1M NaCl 入り 50mM リン酸緩衝液に溶解し，60℃で所定時間反応させ，その後 1M シアノトリヒドロホウ酸ナトリウム溶液を加え，引き続きインキュベーションすることによって複合体を作成した。アレルギー性の変化は，鶏卵アレルギー患者血清を用いた dot blotting によって行った。
【結果・考察】Hep を亜硝酸処理し，溶液中で反応させたものにおいて複合体形成が確認できた。Dot blotting の結果，OVA-Hep 複合体において患者血清との反応性が著しく低下していることが認められた。OVA への糖鎖導入によりエピトープ部位の表面構造の変化から抗原性が低下したものと考えられる。当日はオボアルブミン感作アレルギーモデルマウスでの炎症反応抑制についても報告する。

【文献】1)Suzuki, Y. et al. J. Agric. Food Chem., 57, 9787-9792, 2009.
2) Akiyama, H. et al. J. Biochemistry., 382, 269-278, 2004.
3) Ogawa, T. et al. Allergology International., 62, 77-83, 2013.

ovalbumin, acidic polysaccharide, allergy

講演番号：2G41a09
講演日時、会場：3 月 27 日 10:38～ G 校舎 41 会場

メイラード型糖修飾はクルマエビトロポミオシンの抗原性低減化に効果的ではない

The maillard-type glycosylation is not effective method in masking of antigen structures of kuruma shrimp tropomyosin.

○臼井 将勝[1]、竹内 沙織[1]、佐藤 裕一[1]、田中 真澄[1]、安本 信哉[2]、近藤 昌和[2]、宮崎 泰幸[1]([1]水大校・食品科学、[2]水大校・生物生産)
○ Masakatsu USUI[1], Saori TAKEUCHI[1], Yuichi SATO[1], Masumi TANAKA[1], Shinya YASUMOTO[2], Masakazu KONDO[2], Taiko MIYASAKI[1] ([1]Fisheries Univ. Food science, [2]Fisheries Univ. Aquabiology)

【目的】これまでに我々は数種の球状タンパク質において抗原構造のマスキングにメイラード型多糖修飾法が有効であることを報告してきた。しかし，複雑な高次構造を持たない繊維状タンパク質に対しては，その有効性は明らかにされていない。そこで本研究では，エビの主要アレルゲンであるトロポミオシンをモデルとして，繊維状タンパク質に対する糖修飾のエピトープ被覆効果について検討した。
【方法】エビトロポミオシンは，クルマエビ可食部より非加熱条件下で抽出し，等電点沈殿法，硫安分画およびイオン交換クロマトグラフィーにより精製した。精製されたクルマエビトロポミオシン（Pen j 1）のメイラード型糖修飾には，単糖として Glucose，オリゴ糖として D(+)-Maltotriose，Maltopentaose，Maloheptaose，多糖としてガラクトマンナンを使用した。低分子の糖類はモル比で Pen j 1：糖＝1：50 となる様に，ガラクトマンナンは重量比で Pen j 1 の 10 倍となるように混合し，恒温恒湿器内で 60℃・相対湿度 35%の条件のもとで乾燥加熱した。糖修飾の確認は SDS-PAGE 解析にて行い，エピトープ被覆効果の評価は患者血清を用いて Dot blot 解析で行った。
【結果】乾燥加熱による Pen j 1 と各糖類の複合体形成を SDS-PAGE にて解析した。その結果，Pen j 1＋Glucose では乾燥加熱 3 時間後に Pen j 1 の分子量に数 kDa 増加が確認されたが，それ以降のサンプルは不溶化が激しく解析不能であった。同様に Pen j 1＋Maltotriose ではすべての乾燥加熱サンプルで不溶化が起こった。 Pen j 1＋Maltopentaose および Pen j 1＋Maloheptaose では 1 日後から 14 日後にかけて Pen j 1 の高分子化が確認された。Pen j 1＋ガラクトマンナンでは，3 日後から 14 日後の全てにおいて 35 kDa 付近から約 200 kDa を超えるものまでの広範囲に及ぶ Pen j 1 の高分子化が確認された。これらの Pen j 1－糖複合体の Dot blot 解析では，いずれの複合体も患者血清中 IgE との結合阻害は見られずエピトープ被覆効果は低いと考えられた。

shrimp tropomyosin, glycosylation, reduction of antigenicity

講演番号：2G41a10
講演日時、会場：3 月 27 日 10:49～ G 校舎 41 会場

高圧下ペプシン処理がβ-ラクトグロブリンの抗原性に及ぼす影響

Effects of pepsin treatment under high hydrostatic pressure on antigenicity of β- lactoglobulin

○楯岡 潤、齋藤 里穂、藤原 麻美、勝俣 雅之、東 徳洋、山田 潔（宇都宮大農）
○Jun Tateoka, Riho Saitou, Asami Fujiwara, Masayuki Katsumata, Norihiro Azuma, Kiyoshi Yamada (Utsunomiya Univ)

【目的】β-ラクトグロブリン（β-LG）は主要な牛乳アレルゲンである。これまでに、高圧下でタンパク質分解酵素の処理を行うことによる様々なアレルゲンタンパク質の低アレルゲン化が報告されているが、β-LG における手法は十分には確立されていない。我々はこれまで、400 MPa、600 MPa 10 分間の高圧下ペプシン処理で低アレルゲン化ができることを明らかにし、昨年度本大会で報告した。本研究では 400 MPa および 600 MPa という高圧条件下でペプシン処理するときの処理時間がβ-LG の低アレルゲン化に及ぼす影響と、低アレルゲン化β-LG による経口免疫寛容の誘導について検討した。
【方法】β-LG 溶液（10 mg/mL）にペプシン（基質：酵素＝100：1）を添加し、400 または 600 MPa で 5、10、20 分間高圧処理してペプシン分解物を得た。β-LG 分解物のアレルゲン性の評価は次のように行った。BALB/c マウス（6 週齢、メス）に、1 回 50 μg のβ-LG を Alum アジュバントと共に腹腔内に 2 回注射した。最初の免疫から 1 ヵ月後に、β-LG もしくはβ-LG 分解物を腹腔内投与し、全身性アナフィラキシーショックを誘導した。また、経口免疫寛容の誘導は次のように行った。BALB/c マウスに、β-LG またはβ-LG 分解物を 5 日間で 5 回経口投与した後に、両後足裏にβ-LG を CFA で免疫した。その 1 週間後に膝下リンパ節を摘出し、リンパ節細胞をβ-LG と共に培養した。培養 72 時間後に上清を回収し、サイトカイン産生量を ELISA 法で解析した。また、トリチウムラベルしたチミジンの取り込み量を指標とした細胞増殖応答試験を行った。
【結果と考察】Alum 免疫したマウスの腹腔内へβ-LG を投与したときに誘導される全身性アナフィラキシーを直腸温の低下を指標として評価した結果、400 または 600 MPa で 5、10、20 分間処理したいずれのβ-LG 分解物においても直腸温の低下は認められなかった。一方、未処理のβ-LG 投与では直腸温が顕著に低下した。このことから、いずれの条件でもアナフィラキシーショックを回避できる低アレルゲン化が可能であることが示唆された。次に、400 MPa 10 分間、600 MPa 10 分間の条件で処理したβ-LG 分解物による経口免疫寛容の誘導について検討した。いずれの分解物を経口投与した場合もβ-LG 依存的な細胞増殖応答の抑制が認められた。また、Th1 サイトカインである IFN-γ産生においても、これらの分解物の経口投与により抑制された。このことから 400MPa 10 分間、600MPa 10 分間高圧下ペプシン処理β-LG 分解物は経口免疫寛容誘導能を保持している可能性が示唆された。

food Allergy, beta-lactoglobulin, oral tolerance

講演番号：2G41a11
講演日時、会場：3 月 27 日 11:10～ G 校舎 41 会場

in vivo imaging による化学発光を指標とした DSS 誘導性の新しい評価法の構築

Evaluation of DSS induced colitis by in vivo imaging as an index of chemiluminescence

○山本 岳史[1]、真田 洋平[1]、金井 すみれ[2]、加藤 範久[1]、van de Loo Fons A.J.[3]、矢中 規之[1]([1]広島大院　生物圏、[2]広島大　生物生産、[3]Radboud University Nijmegen Medical Centre)
○takafumi yamamoto[1], yohei sanada[1], sumire kanai[2], norihisa kato[1], Fons A.J. van de Loo[3], noriyuki yanaka[1] ([1]The Graduate School of Biosphere Sci., Hiroshima Univ, [2]Faculty of Applied Biological Sci., Hiroshima Univ, [3]Radboud University Nijmegen Medical Centre)

〈目的〉潰瘍性大腸炎などの腸疾患の罹患者数は増加しており，食品素材を利用した予防法の確立が求められている．デキストラン硫酸ナトリウム（DSS）の飲水投与によって大腸炎様症状が簡便に発症することから，マウス DSS モデルは食品素材の機能性評価に広く利用されている．DSS モデルの評価においては肛門周囲や糞便の観察，大腸長などが測定されていが，スコア化における客観性が問題になるだけでなく，外観から判断できない腸炎発症の初期段階での症状を評価することは難しく，さらに継時的に評価するためには多くの実験動物が必要である．そこで，動物を麻酔下で非侵襲的に機能性評価することを目的として，生体内における化学発光イメージングを大腸炎の評価に応用することを研究目標とした. 炎症時に発現応答する因子として *Serum amyloid A3*（*SAA3*）遺伝子に着目し，*SAA3* プロモーター領域の下流に luciferase 遺伝子を連結した transgenic マウスを作製した．本研究では同マウスを急性炎症モデルに供するとともに，DSS 大腸炎を *in vivo* イメージングで評価する試験方法として検証した.

〈方法・結果〉*SAA3* 遺伝子の発現は DSS モデルの大腸組織において約 10 倍に増加した．そこで，マウス *SAA3* 遺伝子のプロモーター領域（-314/+50）に *luciferase* 遺伝子を連結させた transgenic マウス（Saa3-Luc マウス）を作製した．まず，Saa3-Luc マウスの腹腔内に lipopolysaccharide を投与し，急性炎症を誘導した．大腸組織において *SAA 3* 遺伝子プロモーターによる luciferase 活性が 2 倍上昇し，また *in vivo* イメージングの結果，肝臓を含む，腹部で化学発光を確認した．Saa3-Luc マウスに 2%DSS 溶液を 7 日間飲水投与し，7 日目の大腸で luciferase 活性が 2 倍上昇することを確認した．DSS 投与 Saa3-Luc マウスの経時的な *in vivo* イメージング解析により，肛門周囲や糞便の性状の変化が観察される以前に luciferase による化学発光が検出され，さらに DSS 投与後 7 日目に開腹し，化学発光が大腸由来であることを確認した．以上の結果から，作製した Saa3-Luc マウスは DSS 飲水投与により大腸組織で luciferase による化学発光が誘導され，*in vivo* イメージングにより腸炎を初期段階から検出できる可能性が示され，非侵襲的に経時的な評価を行える新規大腸炎モデルとして利用できると考えられる．今後は DSS 飲水投与した Saa3-Luc マウスの *in vivo* イメージングによる炎症評価と，炎症時の大腸組織における化学発光に関して組織化学的解析により検証する予定である．さらに，食品素材を DSS 飲水投与している Saa3-Luc マウスに投与し，大腸での luciferase の発現に対して検討を行う予定である.

in vivo imaging, DSS induced colitis

講演番号：2G41a12
講演日時、会場：3 月 27 日 11:21～ G 校舎 41 会場

べにふうき緑茶が食餌誘導性肥満マウスの炎症と腸内細菌叢に及ぼす影響の解析

Effects of Benifuuki Green tea on intestinal bacterial flora and inflammation of diet-induced obesity mice

○荻田 佑、若木 学、渡辺 純、後藤 真生、石川（高野） 祐子（農研機構　食総研）
○ Tasuku OGITA, Manabu WAKAGI, Jun WATANABE, Masao GOTOU, Yuko ISHIKAWA(TAKANO) (NARO NFRI)

【目的】肥満は全身性の炎症を誘導しうることが近年明らかとなりつつある。それには、腸内細菌叢や免疫応答、生体内の活性酸素種のバランスの変化が関与すると考えられている。本研究では、抗肥満効果、アレルギー性炎症抑制能、抗酸化能の確認されている、べにふうき緑茶をマウスに高脂肪食とともに与え、肥満誘導性の炎症及び腸内細菌叢への影響を検討した。

【方法】6 週齢の雄性 C57BL/6 マウスに高脂肪食を 9 週間摂取させて、肥満を誘導した。高脂肪食とともに、べにふうき緑茶を飲水として投与した。飼育後、盲腸内容物を採取し、腸内細菌叢を PCR-DGGE 法、短鎖脂肪酸量を HPLC で定量した。また、脂肪組織を採取し、炎症関連遺伝子の発現をリアルタイム PCR で解析するとともに、血漿中の酸化ストレスマーカーを測定した。

【結果】DGGE バンドのクラスター解析により、べにふうき緑茶投与群と非投与群で盲腸内容物の腸内細菌叢が異なることが確認された。また、盲腸内容物の短鎖脂肪酸のうち、Acetate の量は投与群で増加する傾向にあった。脂肪組織での TNF-α の遺伝子発現、血漿中の酸化ストレスマーカーである HODE（Hydroxyoctadecadienoic acid）量は、投与群でそれぞれ有意に減少した。

【考察】肥満マウスへのべにふうき緑茶の投与は、肥満により誘導される脂肪組織での炎症を軽減するとともに、腸内細菌叢を変化させた。炎症軽減の一因として腸内細菌叢の変化が考えられた。現在、菌種レベルでのより詳細な変化を確認するため 16SrRNA 遺伝子配列解析を行っている。

Benifuuki green tea, diet-induced obesity mice, intestinal bacterial flora

講演番号：2G41a13
講演日時、会場：3 月 27 日 11:32～ G 校舎 41 会場

生薬シコンの有効成分シコニンの好中球自然免疫応答への影響とその作用機序の解明

Effects and mechanisms of action of shikonin, an active compound of the herbal medicine 'Shikon', on the neutrophil inflammatory response

○數村 公子[1]、吉田 ルシア幸子[2]、土屋 広司[1]、小池 隆[3]、岡崎 茂俊[4]、湯田 康勝[2]、大室 弘美[2]（[1]浜松ホトニクス・中研、[2]武蔵野大・薬・薬学研、[3]浜松ホトニクス・電子管、[4]浜松医大・MPRC）
○Kimiko KAZUMURA[1], Lucia Sachiko YOSHIDA[2], Hiroshi TSUCHIYA[1], Takashi KOIKE[3], Shigetoshi OKAZAKI[4], Yasukatsu YUDA[2], Hiromi TAKANO-OHMURO[2] ([1]Hamamatsu Photonics CRL, [2]Fac. Pharmacy & Res. Inst. Pharmaceutical Sci., Musashino Univ., [3]Hamamatsu Photonics Electron, [4]Hamamatsu Univ. Sch. Med.)

【目的】好中球の自然免疫応答を光情報に変換して検出する技術を構築し、食品等やそれらの成分の抗酸化（活性酸素消去作用）、抗炎症（活性酸素産生抑制及び過剰な炎症抑制作用）及び自然免疫賦活作用の 3 つの生理活性を同時に評価可能な手法を開発し、既に様々な機能性成分の評価結果を報告している。今回は、抗炎症作用、抗酸化作用及び創傷治癒作用等を有する生薬「シコン」の有効成分シコニン（既に抗炎症作用の分子機序や NO 合成酵素活性阻害作用等を報告済み）を対象とし、上記の 3 つの生理活性を評価した。
【方法】ヒト前骨髄性白血病細胞 HL-60 を誘導して得た好中球様細胞の懸濁液 1.5mL（1×10^5 cells/mL）にシコニン（0.033～3.3μM）を添加した後に、好中球刺激誘引物質 fMLP により惹起される(1)細胞内 Ca^{2+}濃度上昇及び(2)$O_2^{\cdot-}$（スーパーオキシド）産生について、それぞれ Ca^{2+} 濃度測定用蛍光指示薬（Fluo-3）による蛍光及び $O_2^{\cdot-}$ 検出用化学発光試薬（CLA）による化学発光を同時に検出した。シコニン添加による蛍光及び化学発光の発光量変化をもとに、シコニンが好中球の自然免疫応に及ぼす影響を評価した。
【結果】シコニン（0.1 及び 0.33 μM）を添加した好中球様細胞（懸濁液）を fMLP で刺激したところ、細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇及び $O_2^{\cdot-}$ 産生は対照（溶媒添加好中球様細胞）と比較して 1.3~1.4 倍であった。これは、シコニンが低濃度で好中球の自然免疫の賦活化作用を示す可能性を示した初めての知見である。一方、0.33μM 以上の濃度で、シコニンは細胞内 Ca^{2+}濃度上昇及び $O_2^{\cdot-}$産生の両方を濃度依存的に抑制し、3.3μM では 100%抑制した。つまり、シコニンが細胞外からの Ca^{2+}の流入又は小胞体からの Ca^{2+}の放出を抑制したことにより、$O_2^{\cdot-}$の産生を抑制したと考えられた。既にシコニンの $O_2^{\cdot-}$産生抑制作用の作用機序として、シコニンが好中球の $O_2^{\cdot-}$産生酵素（NADPH oxidase）の活性を阻害することが報告されている。本研究により、シコニンの好中球における $O_2^{\cdot-}$産生抑制作用の新しい作用機序が明らかになった。さらに、シコニンの蛍光・化学発光強度のタイムプロファイルを検討したところ、対照と比較して形状に変化が見られたため、シコニンが細胞外からの Ca^{2+}流入経路の一部を抑制する可能性が示唆された。現在、EGTA（細胞外の Ca^{2+}をキレートする）及び 2-APB （IP_3 阻害及び小胞体からの Ca^{2+}の流出を阻害する）等を用い、シコニンの Ca^{2+}流入阻害作用の機序を検討中である。当該結果についても併せて報告する。

shikonin, innate immune response, neutrophil

講演番号：2G41a14
講演日時、会場：3 月 27 日 11:43～ G 校舎 41 会場

哺乳類免疫系における植物ブラシノステロイドの生理活性
Biological activities of plant brassinosteroid for mammalian immune system
○高橋 加奈[1]、小川 健司[2]、市川 保恵[2]、藤岡 昭三[3,4]、寺本 祐之[1]、中野 雄司[3,4] ([1]（株）ファンケル総研、[2]理研・化学遺伝、[3]理研・抗生物質、[4]理研・CSRS)
○ KANA TAKAHASHI[1], KENJI OGAWA[2], YASUE ICHIKAWA[2], SHOZO FUJIOKA[3,4], SACHIYUKI TERAMOTO[1], TAKESHI NAKANO[3,4] ([1]FANCL Corporation, [2]Chemical Genetics Lab. RIKEN, [3]Antibiotics Lab. RIKEN, [4]CSRS RIKEN)

ステロイドホルモンは生物種を越えて広く保存される生理活性物質であり、細胞の伸長や分裂の促進という生物種間に共通な生理活性を持つと共に、哺乳類における妊娠や生殖の制御、昆虫における脱皮の制御など各生物種に固有の生理活性も併せ持つ特徴的な天然化合物である。高等植物においては、ブラシノステロイドと総称されるステロイドホルモンが生合成されることが明らかになっており、植物成長の促進という他種生物と共通の活性と共に、葉緑体における光合成活性制御という植物独自の活性を持つこと、さらに植物自然免疫を活性化する機能が知られている。

植物ブラシノステロイド研究においては、生合成研究と平行して、シグナル伝達機構の解明が進められている。動物の核内転写因子型ステロイドホルモン受容体の相同遺伝子は植物ゲノム上には存在しないと考えられているが、一方で、分子遺伝学的手法により同定した新規なブラシノステロイドのシグナル伝達遺伝子 *BIL* 群の中には、動物の自然免疫のシグナル伝達に関わる遺伝子に類似したものが含まれていることを明らかにした。これらの *BIL* 遺伝子群は、植物の成長制御だけでなく、一部は植物自然免疫の活性化に関わることも確認した。さらにブラシノステロイド受容体 BRI1 は、細胞外に LRR ドメインを持つ 1 回膜貫通型タンパク質であり、その構造は、哺乳類の自然免疫系受容体 TLR(Toll-like receptor)と類似性を持つとも考えられる。これらの知見から、植物ブラシノステロイドは、植物における発生と自然免疫の制御機構に関与しているだけでなく、動物の自然免疫系においても活性を持つ可能性があるのではないか、と着想した。

マウスを用いたブラシノステロイド投与試験の結果、腹腔内注射実験において、ブラシノステロイド投与による抗体産生細胞の増殖促進や自然免疫シグナル遺伝子群の発現促進が認められた。さらに、マウスへの経口投与実験によっても、自然免疫マーカー遺伝子や免疫関連タンパク質の発現上昇が認められ、ブラシノステロイドの摂取が哺乳類の免疫系を活性化している可能性が示された。

さらに、一般食品におけるブラシノステロイドの内生量を解析したところ、青汁の原料として知られているアブラナ科のケールの花芽において、他のアブラナ科植物の花芽に比べて、活性型ブラシノライドとその前駆体を多く内生していることが明らかとなった。

brassinosteroid, immune system, kale

講演番号：2G41p02
講演日時、会場：3 月 27 日 14:11～ G 校舎 41 会場

経口免疫寛容で誘導された T 細胞群による腸管抗体産生の解析

Analysis of intestinal antibody production regulated by oral tolerance-induced T cells

○芝原 恭子[1,2]、八村 敏志[1,2] ([1] 東大院農生科・応生化、[2] 東大院農生科・食の安全研セ)
○Kyoko Shibahara[1,2], Satoshi Hachimura[1,2] ([1]Dept. Appl. Biol. Chem., Univ. Tokyo, [2]Res. Cent. Food Safety, Univ. Tokyo)

【背景と目的】腸管免疫系は食品や微生物といった多様な抗原に常に暴露されており、病原菌や共生菌に対しては IgA 抗体を産生する一方で、食品抗原に対しては「経口免疫寛容」という免疫反応を抑制する機構が存在する。どちらも腸管免疫系に特徴的な現象であるが、このふたつの現象の関係は明らかでない。近年、濾胞ヘルパーT 細胞(Tfh 細胞)という抗体産生促進に特化した T 細胞サブセットが発見され、腸管においても抗体産生を制御していることが明らかになっている。一方で、経口免疫寛容は T 細胞依存的に誘導されるが、経口抗原特異的 T 細胞の詳細な機能はいまだ十分に明らかになっていない。そこで、本研究では経口免疫寛容に伴って誘導された T 細胞サブセットが腸管における抗体産生に影響を与える可能性を検討した。
【方法】抗原特異的 T 細胞の応答を解析するために、DO11.10 マウスを用いた。このマウスは卵白アルブミン(OVA)特異的 T 細胞抗原レセプター(TCR)遺伝子が挿入された遺伝子改変マウスであり、T 細胞の多くが OVA 特異的となる。DO11.10 マウスに OVA を溶解した飲水を 7 日間自由摂取させることで経口免疫寛容を誘導し、コントロールとして滅菌水で飼育したマウスを用いた。経口免疫寛容誘導後、腸間膜リンパ節(mLN)およびパイエル板(PP)を採取して、$CD4^+DO11.10TCR^+$T 細胞、$B220^+$B 細胞および $B220^-IgA^+$抗体産生細胞をフローサイトメトリーによって解析した。
【結果】mLN および PP の抗原特異的 T 細胞について、Tfh 細胞に発現する CXCR5 および PD-1 を解析したところ、経口免疫寛容群でコントロール群に対して、mLN と PP ともに、$CXCR5^+PD\text{-}1^+$細胞が増加していることが示された。すなわち、経口免疫寛容の誘導に伴い抗原特異的な Tfh 細胞が誘導されることが示唆された。そこで、B 細胞の産生する抗体のクラスが、経口免疫寛容誘導時に変化しているかどうか解析した。その結果、mLN、PP ともに IgA^+B220^+B 細胞の数に変化はなかったが、PP において経口免疫寛容群でコントロール群に対して、IgA^+B220^-抗体産生細胞が有意に増加していた。また、mLN では IgM^+B220^+B 細胞が有意に増加しており、PP では $IgG1^+B220^+$B 細胞が有意に増加していることが示された。以上の結果から、経口免疫寛容に伴って誘導された Tfh 様の細胞が、腸管における抗体産生に影響を与えている可能性が示唆された。

oral tolerance, follicular B hepler T cell, immunoglobulin A

講演番号：2G41p03
講演日時、会場：3 月 27 日 14:22～ G 校舎 41 会場

腸間膜リンパ節 CD11b$^-$CD103$^+$PD-L1$^+$ 樹状細胞は遊走性サブセットの特徴を有し腸管指向性制御性 T 細胞を高く誘導する

Mesenteric Lymph Node CD11b$^-$CD103$^+$PD-L1$^+$ Dendritic Cells Have Migratory Phenotypes and Highly Induce Gut-tropic Regulatory T Cells.

○上滝 隆太郎[1,2]、塩河 亜弥[1,2]、八村 敏志[2] ([1]東大院農生科・応生化、[2]東大院農生科・食の安全研セ)
○Ryutaro KOTAKI[1,2], Aya SHIOKAWA[1,2], Satoshi HACHIMURA[2] ([1]Dept. Appl. Biol. Chem., Univ. Tokyo, [2]Res. Cent. Food Safety, Univ. Tokyo)

【背景】 経口摂取された食品や腸内共生細菌に対して過剰な免疫応答が起こると、食物アレルギーや炎症性腸疾患などの発症に繋がると考えられる。そのため腸管免疫系では、そのような過剰な応答が起こらないように経口免疫寛容などの制御メカニズムが発達している。その機序の一つとして腸間膜リンパ節 (mesenteric lymph node; MLN) の樹状細胞 (dendritic cell; DC) による制御性 T (regulatory T; T_{reg}) 細胞の誘導が挙げられる。腸管で管腔の抗原を取り込んだ DC は所属リンパ節である MLN へと遊走し、抗原特異的な T_{reg} 細胞を誘導することで管腔の抗原に対する免疫応答を制御している。

当研究グループは MLN DC が表面分子 CD11b, CD103, PD-L1 の発現によって 4 つのサブセットに分けられることを明らかとしており、CD11b$^-$CD103$^+$PD-L1$^+$ サブセットが T_{reg} 細胞のマスターレギュレーター分子 Foxp3 を高く誘導することも発表している。今回は、これらのサブセットの表面分子の発現をより詳細に解析し、また各サブセットが誘導する T_{reg} 細胞が腸管指向性のケモカイン受容体 CCR9 を発現するか調べた。

【方法】 BALB/c マウスの MLN 細胞から MACS 法により DC (CD11c$^+$ 細胞) を精製し、フローサイトメトリーによって表面分子の発現を調べた。また、このように精製した DC を蛍光セルソーターによって各サブセットに分離し、卵白アルブミン抗原特異的な CD4$^+$ T 細胞と卵白アルブミン由来ペプチドの存在下で培養後、フローサイトメトリーによって Foxp3 と CCR9 の発現を解析した。

【結果】 MLN DC は CD11b$^+$CD103$^+$PD-L1$^+$, CD11b$^-$CD103$^+$PD-L1$^+$, CD11b$^-$CD103$^+$PD-L1$^-$, CD11b$^+$CD103$^-$PD-L1$^+$ の 4 つのサブセットに分けられた。各サブセットは共刺激分子 CD80, CD86 をともに発現していた一方、PD-L2, CD8α, F4/80 といった分子の発現に違いが見られた。また、CD11b$^+$CD103$^+$PD-L1$^+$, CD11b$^-$CD103$^+$PD-L1$^+$ の両サブセットは腸管から MLN へと遊走するサブセットの特徴 (CCR7 発現, MHCII 高発現) を有していた。さらに、CD11b$^-$CD103$^+$PD-L1$^+$ サブセットは CCR9$^+$Foxp3$^+$ T 細胞を高く誘導した。

これらの結果より、MLN DC の中でも特に CD11b$^-$CD103$^+$PD-L1$^+$ DC は腸管管腔由来の抗原を取り込んで MLN へと遊走し腸管指向性の T_{reg} 細胞を誘導することで、腸管免疫系の過剰な応答を制御していると考えられる。これは食物アレルギーや炎症性腸疾患発症のメカニズムの解明や治療法の開発に繋がる基礎的な知見の一つとなると期待される。

oral tolerance, dendritic cells, regulatory T cells

講演番号：2G41p04
講演日時、会場：3 月 27 日 14:33～ G 校舎 41 会場

腸内細菌は腸管上皮細胞における miRNA の発現に影響を及ぼす

Commensal bacteria affect miRNA expression in intestinal epithelial cells

○中田 一彰[1]、高橋 恭子[1]、杉 由高[1,2]、小早川 哲朗[1]、細野 朗[1]、上野川 修一[1] ([1]日大生資科、[2]感染研)
○Kazuaki NAKATA[1], Kyoko TAKAHASHI[1], Yutaka SUGI[1,2], Tetsuro KOBAYAKAWA[1], Akira HOSONO[1], Shuichi KAMINOGAWA[1] ([1]Nihon Univ., [2]NIID.)

［目的］
腸管の管腔と体内を隔てる腸管上皮細胞(IEC)では、管腔に大量に生息する腸内共生菌に対する過剰な応答が誘導されないように厳密に制御機構がされている。この機構には共生菌がもたらす宿主遺伝子の DNA メチル化の変化が関わることをこれまでに明らかにしており、腸内細菌が IEC にエピジェネティックな遺伝子発現の変化を引き起こすことにより共生を可能とすると仮説を立てた。本研究では、エピジェネティックな遺伝子発現制御を担う因子として近年注目されている miRNA に着目し、腸内細菌が IEC における miRNA の発現に及ぼす影響とその役割を明らかにすることを目的とする。
[方法]
通常および無菌の雌性 BALB/c マウス(10-12 週齢)の中位小腸および大腸より IEC を調製した。これらの細胞から低分子量 RNA を含む総 RNA を抽出し、miRNA アレイにより miRNA の発現の網羅的解析を行った。さらに、定量 RT-PCR によりこれらの IEC に発現する miRNA を定量した。また、ヒト IEC 株 HT-29、SW480 を用い、LPS、Pam3CSK4、*Bacteroides acidifaciens* type A43 (BA)および *Lactobacillus johnsonii* 129 (LJ)加熱死菌体で刺激後、細胞を回収し、定量 RT-PCR により miRNA の発現解析を行なった。
［結果］
通常および無菌マウスの IEC における miRNA の網羅的発現解析の結果、小腸および大腸の IEC において通常マウスと無菌マウスで発現量に差がある miRNA が存在した。したがって、IEC における miRNA の発現に腸内細菌が影響を及ぼすことが明らかになった。miR-21-5p は、このアレイ解析において腸内細菌により発現が上昇する miRNA の候補として同定され、その発現が実際に通常マウスの IEC で無菌マウスの IEC より高いことが定量 PCR により確認された。腸内細菌の菌体及び菌体成分の刺激による miR-21-5p の発現量への影響をヒト IEC 株を用いて解析した結果、すべての刺激により miR-21-5P の発現が上昇していた。どの菌体リガンド刺激によっても発現が上昇したこと、特に TLR-MyD88 経路のみを活性化する Pam3CSK4 の刺激により miR-21-5P の発現量が上昇したことから、この発現上昇は MyD88 依存的な経路を介することが示唆された。以上より、腸内細菌の菌体成分により IEC において miR-21-5p の発現が誘導されると考えられた。これらの結果から、腸内細菌が miRNA の発現を調節することにより IEC における遺伝子発現を制御し、腸内における共生の成立に寄与する可能性が示された。

commensal bacteria, intestinal epithelial cells, miRNA

講演番号：2G41p05
講演日時、会場：3 月 27 日 14:44～ G 校舎 41 会場

無菌マウスと通常マウスにおける大腸免疫系細胞フェノタイプの特徴

Characteristics of the phenotype of the large intestinal lymphocytes from germ-free or conventional mice

○於 鉄峥[1]、鈴木 誠[1]、沓掛 優香[1]、八村 敏志[2]、高橋 宜聖[3]、高橋 恭子[1]、上野川 修一[1]、細野 朗[1] ([1]日大生資科・食品生命、[2]東大院農生科・食の安全研セ、[3]感染研・免疫)

○Tetsuzen Oh[1], Makoto Suzuki[1], Yuka Kutsukake[1], Satoshi Hachimura[2], Yoshimasa Takahashi[3], Kyoko Takahashi[1], Shuichi Kaminogawa[1], Akira Hosono[1] ([1]Department of Food Bioscience and Biotechnology, Nihon University, [2]Research Center for Food Safety, Graduate School of Agricultural and Life Science, The University of Tokyo, [3]Department of Immunology, NIID)

【目的】

腸の中には膨大な数と種類のさまざまな細菌が共生しており、これらの腸内共生菌が腸管免疫系に強い影響を与えていると考えられる。近年、腸内細菌叢を構成している細菌種の中に宿主の炎症症状や生活習慣病との関連が指摘されているものもあり、腸内共生菌と腸管免疫系との相互関係について解明することは我々の健康にとっても重要である。ほとんどの腸内共生菌は大腸部位に存在しているが、これまでに解明されている腸管免疫系についての研究は小腸に関するものが多く、大腸免疫系において膨大な数の腸内細菌に対して炎症反応を起こさずに腸内環境を維持できる仕組みや組織の発達、機能はまだ十分に解明されていない。そこで本研究では、大腸部位の腸管関連リンパ組織の細胞を小腸パイエル板細胞と比較することによりその特徴を明らかにすることをめざした。

【方法】

無菌（GF）および通常（CV）環境下で飼育した BALB/c マウス（10~12 週齢）のマウスから腸管関連リンパ組織として小腸パイエル板（PP)、盲腸リンパ節（CeP)、結腸リンパ節（CoP)、腸間膜リンパ節（MLN）を採取し、各リンパ組織を構成している細胞の特徴を調べるため、フローサイトメトリーによる細胞フェノタイプの解析を行った。

【結果・考察】

各リンパ組織の $CD3^+$細胞中の $CD4^+$および $CD8^+$細胞、または $B220^+$細胞などの構成比は GF マウスと CV マウス間で顕著な差は認められなかった。一方、$CD4^+$ T 細胞の活性化/ナイーブマーカーである CD45RB および CD69 分子の発現については、GF マウス由来の CoP 細胞において $CD4^+$ $CD45RB^{low}$ および $CD4^+$ $CD69^{high}$ の発現が GF マウスの PP 細胞に比べて有意に低く、CV マウスにおける構成比に比べても顕著に低値を示した。このことから、腸内共生菌の存在の有無によって、大腸部位の CoP 細胞の $CD4^+$ T 細胞のフェノタイプが影響を受けることが示唆された。したがって、CoP 細胞は通常および無菌環境下においていずれも PP 細胞と比べて $CD4^+$ T 細胞のフェノタイプの発現において異なる特徴がみられ、結腸部位の CoP 細胞の特性が PP 細胞とは異なる可能性が考えられる。

colon

講演番号：2G41p06
講演日時、会場：3 月 27 日 15:05～ G 校舎 41 会場

ビフィズス菌株による大腸炎抑制効果の比較および作用メカニズムの解析

Comparison of anti-colitic effects of Bifidobacterium strains and analysis of mechanisms

○川崎 吾子[1]、宮内 栄治[2]、川住 雅美[2]、森田 英利[3]、大野 博司[1,2] ([1]横浜市大・生命医科学、[2]理研・IMS、[3]麻布大・獣医)
○Wako Kawasaki[1], Eiji Miyauchi[2], Masami Kawasumi[2], Hidetoshi Morita[3], Hiroshi Ohno[1,2] ([1]Yokohama City Univ., [2]RIKEN IMS, [3]Azabu Univ.)

【目的】

ある種のビフィズス菌株は大腸炎抑制効果を有することが確認されている。しかし、そのメカニズムや活性成分については未だに不明な点が多くのこされている。本研究では、全ゲノムが公開されているビフィズス菌 5 菌株の大腸炎抑制効果を比較するとともに、作用メカニズムの解析を行った。また、比較ゲノム解析により活性成分の同定を試みた。

【方法】

デキストラン硫酸ナトリウム（DSS）誘導性大腸炎モデルマウスにビフィズス菌株をそれぞれ経口投与し、大腸炎抑制効果の比較検討を行うとともに、大腸上皮の細胞死および細胞増殖を TUNEL 染色および Ki-67 免疫染色でそれぞれ解析した。また、ヒト腸管上皮様 Caco-2 細胞を用いてビフィズス菌の作用に関与する細胞内シグナル経路を解析した。

【結果と考察】

Bifidobacterium longum subsp. *longum* NCC2705 の投与により DSS 誘導性大腸炎の指標である体重減少、大腸萎縮、および血便が抑制された。一方、他のビフィズス菌株投与ではこれらの抑制効果は確認できなかった。NCC2705 株の作用メカニズムを解析した結果、NCC2705 株が大腸上皮の細胞死を抑制するとともに、細胞増殖を促進することが明らかになった。また、NCC2705 株投与により上皮のβ-catenin 蓄積が確認され、Wnt/β-catenin 経路の標的遺伝子である c-Myc および cyclin D1 遺伝子発現量が増加した。一方、Wnt リガンドである Wnt3、Wnt3a、およびアンタゴニストである Dkk1 遺伝子発現量は NCC2705 株投与で変化しなかった。これらの結果から、NCC2705 株は大腸上皮に直接作用することで Wnt/β-catenin 経路を活性化し、上皮細胞の増殖・修復を抑制することが示唆された。

そこで、Caco-2 細胞に NCC2705 株を添加することにより更なる細胞内シグナル経路の解析を行った。NCC2705 株添加によりβ-catenin の Ser675 のリン酸が誘導されるとともに、c-Myc および cyclin D1 遺伝子発現量が増加した。さらに、これらの作用には ERK のリン酸化が関与していることが示唆された。以上の結果から、NCC2705 株は ERK の活性化を介してβ-catenin の蓄積・核内移行を促進することで Wnt/β-catenin シグナル経路活性化を誘導すると考えられた。

現在、比較ゲノム解析により NCC2705 の作用に関与する遺伝子の同定を進行中である。

Bifidobacterium, colitis, Wnt

講演番号：2G41p07
講演日時、会場：3 月 27 日 15:16～ G 校舎 41 会場

共役リノール酸ナノエマルションによる炎症性腸疾患の病態改善作用

Alleviative effect of conjugated linoleic acid nano emulsion on the symptoms of inflammatory bowel disease

○金崎 寿敏[1]、木下 和昭[1]、山本 建次[2]、濱山 真吾[2]、清水 正高[2]、西山 和夫[1]、山崎 正夫[1]([1]宮崎大農、[2]宮崎県工業技術センター)
○ Hisatoshi KANAZAKI[1], Kazuaki KISHITA[1], Kenji YAMAMOTO[2], Shingo HAMAYAMA[2], MASATAKA SHIMIZU[2], Kazuo NISHIYAMA[1], Masao YAMASAKI[1] ([1]Miyazaki Univ., [2]Miyazaki Prefecture Industrial Technology Center)

〔目的〕
炎症性腸疾患（inflammatory bowel disease：IBD）は主として消化管に炎症をおこす慢性疾患である。現在、IBD 患者は日本全国に 16 万人いるとされているが、発症要因が不明であり、明確な治療法も確立されていない。共役リノール酸（conjugated linoleic acid：CLA）は IBD の病態改善作用を有することが報告されているが、その効果は十分ではない。ナノ粒子がこれらの疾患の病巣に取り込まれやすいことから、CLA ナノエマルション（CLA-NE）の作製を行い、マクロファージの炎症応答に対する作用と IBD モデルマウスに対する作用を検討した。
〔方法〕
シラス多孔質ガラス膜、Anodisc 膜を使用した膜透過により、トリグリセリド型 CLA を油相として平均粒径 90 nm と 200 nm の 2 つの o/w 型ナノエマルションを調製した。マウスマクロファージ様細胞株である RAW264.7 細胞を 90 nm、200 nm CLA ナノエマルション存在下で 24 時間培養後、炎症誘発物質であるリポ多糖(LPS)を添加した。24 時間培養後、培養上清を回収し、nitric oxide (NO) と Monocyte Chemotactic Protein-1 (MCP-1) 産生量を測定した。IBD モデルは BALB/c マウスに 2%デキストラン硫酸ナトリウム(DSS)含有水を 10 日間、自由飲水させることで作成した。DSS 投与開始 6 日前に control 群、DSS 群、CLA-NE + DSS 群、CLA + DSS 群の 4 群に分け、その日から control 群には PBS、DSS 群にはナノエマルションの外水相、CLA-NE + DSS 群には 90 nm CLA-NE、CLA + DSS 群にはトリグリセリド型 CLA を試験終了まで 1 日おきに経口投与した。DSS 投与開始日を 0 日目として、体重、糞便スコア、潜血スコアの測定を 1 日おきに行い、10 日目に屠殺し、各分析に供した。
〔結果〕
膜透過により平均粒径 84.0 nm と 205.5 nm の CLA-NE が得られた。*In vitro* において 90 nm CLA-NE は炎症誘発物質である NO と MCP-1 産生を抑制したが、200 nm CLA-NE は NO と MCP-1 産生を抑制しなかった。*In vivo* において IBD モデルマウスに対する作用を検討したところ、CLA-NE による炎症性腸疾患の病態スコアの有意な抑制は認められなかったが、炎症初期において体重減少抑制や糞便の状態を表す糞便スコアの増加抑制傾向が観察された。これらのことから、CLA-NE は抗炎症作用を有し、炎症性腸疾患の病態を改善する可能性があることが示唆された。

inflammatoy bowel disease, conjugated linoleic acid, inflammation

講演番号：2G41p08
講演日時、会場：3 月 27 日 15:27～ G 校舎 41 会場

代表的な腸内細菌である乳酸菌のリノール酸代謝産物 10-hydroxy-*cis*-12-octadecenoic acid は GPR40/MEK-ERK を介して腸管バリア保護効果を発揮する

A lactic acid bacterial metabolite of linoleic acid, 10-hydroxy-*cis*-12-octadecenoic acid, ameliorates intestinal epithelial barrier impairments via GPR40/MEK-ERK pathway.

○宮本 潤基[1,2]、水呉 太一[1]、PARK Si-Bum[3]、岸野 重信[3]、小川 順[3]、木村 郁夫[4]、鈴木 卓弥[1]、田辺 創一[1]([1]広島大院生物圏科学、[2]日本学術振興会 特別研究員、[3]京都大院農、[4]東京農工大院農)
○ Junki MIYAMOTO[1,2], Taichi MIZUKURE[1], Si-Bum PARK[3], Shigenobu KISHINO[3], Jun OGAWA[3], Ikuo KIMURA[4], Takuya SUZUKI[1], Soichi TANABE[1] ([1]Hiroshima Univ., [2]JSPS Researcher, [3]Kyoto Univ., [4]Tokyo Univ. of Agriculture and Technology)

【目的】

我々は、代表的な腸内細菌である乳酸菌のリノール酸代謝産物（10-hydroxy-*cis*-12-octadecenoic acid; HYA）[1] が、*in vitro* で G protein-coupled receptor 40（GPR40）を介して TNF receptor (TNFR) 2 の発現を制御し、腸管バリア保護効果を発揮すること、HYA の経口投与がデキストラン硫酸ナトリウム誘導性の腸炎モデルマウス（DSS 腸炎マウス）の症状を回復することを明らかにしている[2]。本研究では、より詳細に HYA の腸管バリア保護メカニズムを明らかにするために、MAPK 経路との関わりに着目して検討を行った。

【方法】

二層式の培養装置（Transwell）で培養したヒト腸管上皮様細胞株 Caco-2 細胞に HYA を作用させ、MAPK 経路のリン酸化を解析した。また、GW1100（GPR40 antagonist）を Caco-2 に作用させ、GPR40 を介した HYA による同リン酸化を評価した。

次に、Caco-2 を IFN-γ 単独あるいは IFN-γ + TNF-α で刺激した時の HYA による TNFR2 タンパク質発現抑制および腸管バリア保護（経上皮電気抵抗（TER）および FITC-conjugated dextran（FD-4）の透過におよぼす U0126（MEK inhibitor）の影響を検討し、MEK-ERK 経路の関与を検討した。

【結果・考察】

HYA は、MAPK 経路の一つである ERK のリン酸化を促進した。一方、p38 や JNK のリン酸化には影響を与えなかった。また、GW1100 存在下では、HYA による ERK リン酸化が消失したことから、HYA は GPR40 を介して ERK をリン酸化することが明らかとなった。さらに、HYA は IFN-γ によって誘導された TNFR2 発現を抑制したが、U0126 の共存によってその効果が消失した。加えて、HYA は IFN-γ + TNF-α によって誘導された TER 低下および FD-4 透過亢進を有意に回復したが、その効果は U0126 によって部分的に消失した。

これらの知見は、HYA が GPR40／MEK-ERK を介して TNFR2 発現を制御し、腸管バリア保護効果を発揮することを示唆している。今後、DSS 腸炎マウスにおいても、HYA の腸炎抑制効果と GPR40 シグナルの関連に着目して検討する予定である。

1) Kishino *et al.*, 2013. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110 (44): 17808-17813.
2) Miyamoto *et al*. *J Biol Chem. in press*.

lactic acid bacterial metabolite, GPR40, MEK-ERK

講演番号：2G41p09
講演日時、会場：3 月 27 日 15:38～ G 校舎 41 会場

食事脂質の腸内細菌代謝産物が M2 型マクロファージの分化に及ぼす影響

Effects of gut microbial food lipid metabolites on differentiation of M2 macrophages.

○安岡 祐美子[1]、大植 隆司[1,2]、後藤 剛[1,2]、北村 苗穂子[3]、朴 時範[4]、岸野 重信[3]、小川 順[2,3]、高橋 信之[1,2]、河田 照雄[1,2]（[1]京大院農・食品生物、[2]京大・生理化学研究ユニット、[3]京大院農・応用生命、[4]京大院農・産業微生物）

○ Yumiko Yasuoka[1], Ryuji Ohue[1,2], Tsuyoshi Goto[1,2], Nahoko Kitamura[3], Si-Bum Park[4], Shigenobu Kishino[3], Jun Ogawa[2,3], Nobuyuki Takahashi[1,2], Teruo Kawada[1,2] ([1]Div. Food Sci. Biotechnol., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]Res. Unit Physiol. Chem., Kyoto Univ., [3]Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [4]Lab. Ind. Microbiol., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)

【背景・目的】

乳酸菌は、ヒトの乳児期から相利共生を営む身近な腸内細菌であるとともに、古来より発酵食品などに広く利用されてきた歴史的経緯から、生体調節機能を有した菌株および代謝産物の存在が多数報告されている。近年、腸内細菌の一種である乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* AKU 1009a が食事脂質を代謝して産生する新規脂肪酸代謝物の存在が明らかになった。一般に、脂肪酸は、重要な免疫調節因子となり得ることが知られている。例えば、パルミチン酸などの飽和脂肪酸の作用により、マクロファージ(Macrophage:Mφ)は M1 型 Mφへと分化し、慢性炎症部位における炎症悪化に関与することが提唱されている。また近年、オレイン酸やリノール酸などの不飽和脂肪酸は、Mφを M2 型 Mφ優位に極性シフトさせ、生体内における炎症の緩和に寄与することが報告されている。しかし、その詳細な分子機構は明らかにされていない。本研究では、肥満に伴う生活習慣病の病態基盤である慢性炎症の予防、改善を目的に、Mφあるいは単球から M2 型 Mφへと分化誘導を促進する食事脂質の乳酸菌代謝産物を探索するとともにその詳細な作用機序について検証した。

【方法・結果】

骨髄由来細胞を Mφへと分化させた後、IL-4 存在下、リノール酸(LA)、γ-リノレン酸(GLA)、α-リノレン酸(ALA)、または LA、GLA および ALA 由来の乳酸菌代謝産物をそれぞれ共添加した。その結果、LA、GLA、ALA において、IL-4 単独の添加時に比べて M2 型 Mφへの分化が促進された。加えて、ALA 由来の乳酸菌代謝産物において、ALA 以上に M2 型 Mφへの分化を促進する傾向が認められた。一方、LA 及び GLA 由来の乳酸菌代謝産物では、M2 型 Mφへの分化が LA や GLA と比べて同程度以下であった。続いて、ALA 由来の乳酸菌代謝産物の Mφの分化初期における影響を検討するため、単球を用いて同様に調べた。その結果、ALA 由来の乳酸菌代謝産物のうち、水酸化脂肪酸 13-OH-c9,c15-18:2 とオキソ脂肪酸 13-oxo-c9,c15-18:2 のみが、ALA を上回る M2 型 Mφへの強い分化誘導促進能を有していた。以上の結果から、乳酸菌の代謝によって生じた多価不飽和脂肪酸の構造変化が、M2 型 Mφへの分化促進に影響を及ぼすこと、単球と Mφにおいてその受容機構が異なることが示唆された。現在、M2 型 Mφへの分化の詳細な分子機序を解明するため単球および Mφにおける水酸化脂肪酸 13-OH-c9,c15-18:2 とオキソ脂肪酸 13-oxo-c9,c15-18:2 の受容機構のうち STAT6、PPARγの関与について検討している。

macrophage, gut bacterium, PPARγ

講演番号：2G41p10
講演日時、会場：3 月 27 日 15:49～ G 校舎 41 会場

食事脂質の腸内細菌代謝産物が腸管粘膜免疫系に及ぼす影響

Effects of gut microbial food lipid metabolites on intestinal mucosal immunity.

○大植 隆司[1,2]、安岡 祐美子[1]、後藤 剛[1,2]、北村 苗穂子[3]、朴 時範[4]、岸野 重信[3]、小川 順[2,3]、高橋 信之[1,2]、河田 照雄[1,2] ([1]京大院農・食品生物、[2]京大・生理化学研究ユニット、[3]京大院農・応用生命、[4]京大院農・産業微生物)

○ Ryuji Ohue[1,2], Yumiko Yasuoka[1], Tsuyoshi Goto[1,2], Nahoko Kitamura[3], Si-Bum Park[4], Shigenobu Kishino[3], Jun Ogawa[2,3], Nobuyuki Takahashi[1,2], Teruo Kawada[1,2] ([1]Div. Food Sci. Biotechnol., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]Res. Unit Physiol. Chem., Kyoto Univ., [3]Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [4]Lab. Ind. Microbiol., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)

【背景・目的】

近年、腸内細菌の一種である乳酸菌の食事脂質代謝産物が、様々な生体調節機能を示すことが明らかになってきている。当研究室の先行研究では、乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* AKU 1009a によるα-リノレン酸(ALA)の代謝産物のうち水酸化脂肪酸やオキソ脂肪酸が、単球の抗炎症性 M2 型マクロファージ(Macrophage:Mφ)への分化に寄与することが示唆された。しかし、分化の詳細な分子機序については明らかになっていない。一般に、骨髄に由来し血流にて全身を循環する単球は末梢組織において Mφへと分化する。単球から Mφへの分化制御を考察する上では、末梢組織におけるサイトカイン等の各種環境素因が重要であることが知られている。そこで我々は、食事脂質の乳酸菌代謝産物による腸管環境の制御機構に着目した。免疫細胞と乳酸菌による代謝産物との相互作用の結果、腸管では、Th2 サイトカイン優位な環境が形成されることで、単球の M2 型 Mφへの分化誘導が制御されているのではないかとの作業仮説を着想した。この仮説を検証するために本研究ではまず、ALA 由来の脂肪酸代謝物が、腸管粘膜免疫系に及ぼす影響について調べた。

【方法・結果】

腸管関連リンパ組織の誘導器官である腸間膜リンパ節、対象として全身性のリンパ組織である脾臓からそれぞれ細胞を調製した。各リンパ組織由来の細胞を、PMA 及び Ionomycin の存在下、ALA または ALA 由来の脂肪酸代謝物を添加し、18 時間培養した。培養上清を回収し、ELISA 法にて IL-4 ならびに MCP-1 を測定した結果、腸間膜リンパ節における IL-4 の産生を有意に増加させる ALA 由来の脂肪酸代謝物を見出した。この脂肪酸代謝物は先行研究にて見出したオキソ脂肪酸と一致していた。また、腸間膜リンパ節における MCP-1 の産生は、ALA の添加により有為に増加し、ALA 由来の脂肪酸代謝物では有為な差が観察されなかった。一方、脾臓における IL-4 の産生は、ALA ならびに ALA 由来の脂肪酸代謝物で有為な差が観察されず、MCP-1 の産生も同様の結果が得られた。以上の結果から、ALA の存在により腸管では特徴的に MCP-1 が分泌され単球が腸管に遊走し得ること、乳酸菌による ALA 由来の脂肪酸代謝物が腸管を Th2 サイトカイン優位な環境に制御することが示唆された。この他、パイエル板や小腸粘膜固有層についての影響も検討しており上記を支持する結果を得ている。現在、IL-4 や MCP−1 の産生に寄与する細胞種の同定を進めている。

gut bacterium, intestinal immunity

講演番号：2G41p11
講演日時、会場：3 月 27 日 16:10～ G 校舎 41 会場

Leuconostoc mesenteroides NTM048 が産生する菌体外多糖は炎症性 Th17 反応を抑制する
Extracellular polysaccharide from *Leuconostoc mesenteroides* NTM048 inhibits inflammatory Th17 responses

竹之下 柳一朗[1]、趙 澄澄[1]、久 景子[2]、米島 靖記[2]、鈴木 卓弥[1]、○田辺 創一[1]（[1]広島大院生物圏科学、[2]日東薬品工業株式会社　研究開発本部）
Ryuichiro Takenoshita[1], Chengcheng Zhao[1], Keiko Hisa[2], Yasunori Yonejima[2], Takuya Suzuki[1], ○Soichi Tanabe[1] ([1]Hiroshima Univ., [2]Nitto Pharm. Ind., Ltd.)

【目的】

Leuconostoc mesenteroides NTM048 の産生する菌体外多糖（EPS）[1] は、これまで Th1/Th2 バランス調節や腸管 IgA 産生促進などが示されており、その他にも様々な生理活性機能があると期待される。そこで本実験では、炎症や自己免疫疾患に深く関与する炎症性 Th17 反応に対する EPS の抑制効果を in vitro で検討した。さらに、Th17 関連疾患である乾癬モデルマウスを作製し、EPS の皮膚への塗布による症状抑制効果について検討した。

【方法】

BALB/c マウス（6 週齢、雌）の脾細胞に NTM048 菌体（10^7 cells/mL）または菌体由来 EPS（100 μg/mL）を添加し、IL-6＋TGF-β 刺激による Th17 誘導系で 72 時間培養し、培養上清中の IL-17 産生量を ELISA にて、IL-17$^+$CD4$^+$ 細胞割合をフローサイトメトリーにて定量した。また、脾細胞に EPS（100 μg/mL）を添加し、6 時間培養後の各ヘルパーT 細胞転写因子の mRNA 発現をリアルタイム PCR により定量した。

乾癬モデルマウスは、イミキモド塗布により誘導した。誘導 6 日前から誘導後 4 日目まで計 10 日、毎日 NTM048 あるいは基準株 JCM6124 由来の EPS（各 10 mg/day）を塗布し、症状スコア（紅斑、肥厚度、症状範囲）の推移を観察した。また、飼育終了後、背部皮膚組織を採取し、Th17 関連因子の mRNA 発現量をリアルタイム PCR により解析した。

【結果】

NTM048 菌体および EPS は、脾細胞からの IL-17 産生を抑制した。また、EPS は IL-17$^+$CD4$^+$ 細胞への分化も抑制した。さらに、脾細胞への EPS 添加により、RORγt（Th17）および GATA-3（Th2）の mRNA 発現が抑制され、一方 T-bet（Th1）の発現が亢進した。

乾癬モデルマウスにおいて、NTM048 由来の EPS 塗布は、基準株由来の EPS 塗布群と比較して、乾癬症状スコア悪化を緩和し、さらに、乾癬誘導に伴い皮膚組織で増加する IL-17A の mRNA 発現を抑制した。

以上のことから、NTM048 由来 EPS は、Th1/Th2 バランス調節に加え、Th17 抑制作用も有することが確認され、Th17 関連疾患の予防・治療に有効であることが期待される。

1) Matsuzaki et al., *J. Appl. Microbiol.*, **116**, 980-989 (2013).

exopolysaccharide, th17, psoriasis

講演番号：2G41p12
講演日時、会場：3 月 27 日 16:21～ G 校舎 41 会場

Leuconostoc mesenteroides NTM048 株由来の菌体外多糖の免疫賦活能について
Immunomodulating activity of exopolysaccharides produced by *Leuconostoc mesenteroides* strain NTM048

○松崎 千秋[1]、早川 あすか[1]、松本 健司[1]、加藤 紀彦[1]、山本 憲二[1]、久 景子[2]（[1]石川県大、[2]日東薬品工業（株））
○chiaki matsuzaki[1], asuka hayakawa[1], kenji matsumoto[1], toshihiko katoh[1], kenji yamamoto[1], keiko hisa[2] ([1]Ishikawa Pref. Univ., [2]Nitto Pharm. Ind., LTD.)

[目的]乳酸菌が菌体外に分泌している多糖（exopolysaccharide; EPS）が、乳酸菌を利用した発酵食品に特徴的な食感を与えていることは広く知られている。しかし、EPS がヒトに与える有益な効果については、未だ不明な部分が多い。我々はエンドウマメより、EPS を産生する乳酸菌 *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* NTM048 株を単離同定し、マウスパイエル板細胞を用いて、本菌が産生する EPS には粘膜免疫に重要な免疫グロブリン A（IgA）の産生を促進する効果があることを明らかにしている。またこの菌体を BALB/cA マウスに投与した場合、腸管粘膜の IgA 産生を促進する免疫賦活効果があること、その効果は本菌種の基準株 *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* JCM6124 株より高いことを確認している。そこで本研究では、NTM048 株が産生する EPS も、菌体と同様に、マウス生体において免疫を賦活する効果を有するかを明らかにし、NTM048 株産生 EPS の免疫賦活剤としての可能性を検討した。
[方法・結果]*L. mesenteroides* NTM048 株の産生する EPS を培養上清よりエタノール沈殿によって回収、エタノールにて洗浄後、乾燥し、EPS 粉末を調製した。そこで、EPS 粉末を 0%、0.1%、1%添加した食餌を BALB/cA マウスに 21 日間摂取させ、EPS 粉末投与の効果を検証した。腸管粘膜における IgA 産生誘導を明らかにするため、給餌開始 0、7、14、21 日後に、一日当たりの糞中 IgA 量を測定し比較したところ、21 日後に 0.1%投与マウスにおいて上昇傾向（$P = 0.08$）が、1%投与マウスにおいて有意な上昇（$P < 0.05$）が認められた。また全身免疫系への影響を明らかにするため、投与 21 日後のマウスより脾臓を摘出し、免疫誘導に関与する遺伝子の mRNA 発現量を比較したところ、EPS の投与量依存的に CD3 遺伝子および CD4 遺伝子の発現量が上昇する傾向が認められた。EPS の脾臓細胞に与える効果を検証するため、マウス脾臓細胞（2.5×10^6 cells/ml）を EPS 添加培地(100 μg/ml)で 2 日間培養し、CD4 陽性細胞中の発現サイトカインをフローサイトメトリーで解析した結果、IFN-γ産生細胞の有意な上昇（$P < 0.01$）と IL-4 産生細胞の有意な減少（$P < 0.01$）が認められた。これらの結果より、NTM048 株産生 EPS による腸管粘膜免疫系および全身免疫系への賦活効果が示唆された。また、EPS を過塩素酸による部分加水分解処理して遊離した単糖を HPLC で解析したところ、グルコースとフルクトースのピークが認められた。この結果、本 EPS はグルコースとフルクトースを構成糖とすることが示唆され、乳酸菌由来の安全な免疫賦活剤としての利用が期待できる。

Leuconostoc mesenteroides, IgA, exopolysaccharide

講演番号：2G41p13
講演日時、会場：3 月 27 日 16:32～ G 校舎 41 会場

Leuconostoc mesenteroides NTM048 株由来レバンスクラーゼの遺伝子クローニングおよび発現酵素の諸性質の解析

Cloning of the levansucrase gene from *Leuconostoc mesenteroides* NTM048 and analyses of its enzymatic properties

○坂口 広大[1]、石田 竜一[1]、松崎 千秋[1]、加藤 紀彦[1]、山本 憲二[1]、久 景子[2]([1]石川県大・生資研、[2]日東薬品工業（株))

○KOUTA SAKAGUCHI[1], RYUICHI ISHIDA[1], CHIAKI MATSUZAKI[1], TOSHIHIKO KATOH[1], KENJI YAMAMOTO[1], KEIKO HISA[2] ([1]Res. Inst. Bioresour. Biotechnol., Ishikawa Pref. Univ., [2]Nitto Pharm. Ind., Ltd.)

[目的]

我々はエンドウ豆より単離同定した *Leuconostoc mesenteroides* NTM048 株が多量の菌体外多糖(EPS)を産生し、本 EPS が IgA 産生誘導活性を有していることをマウスによる摂取実験によって確認している。この EPS はグルコースとフルクトースが構成成分であることが明らかになっており、高分子フルクタンであるレバンを生合成するレバンスクラーゼが EPS の産生に何らかの役割を果たしている可能性が推察される。そこで、本酵素の遺伝子クローニングとその発現酵素の諸性質について解析した。

[方法および結果]

Leuconostoc mesenteroides NTM048 株は既にゲノム解析が行われている。そこで、そのゲノム情報に基づいて、推定上のレバンスクラーゼ遺伝子 (約 3.0 kb) のクローニングを行った。すなわち、レバンスクラーゼ遺伝子をクローニングして大腸菌で発現させた約 113 kDa の His-tag 融合タンパク質をニッケルカラムを用いて精製した。精製酵素を用いて、スクロースを基質として反応を行い、反応生成物を TLC および HPAEC-PAD (Dionex CarboPac PA1) によって解析した。TLC によって解析した結果、フルクタンと予想される反応生成物のスポットが得られた。また、レバンスクラーゼの加水分解活性によって、基質のスクロースがグルコースとフルクトースに分解されることが示された。本酵素のフルクタン生成反応における至適温度および至適 pH を解析したところ、15°C、pH6.0 が至適条件であることがわかった。そこで、至適条件下で酵素反応を行い、得られた反応生成物を HPAEC-PAD を用いて分析した結果、フルクトースの供与体であるスクロースの分解産物であるグルコースおよびフルクトースのピークが見られるとともに、レバンと予想される複数のピークが新たに得られた。これらの生成物は、反応時間の経過に伴って生成量が増加することから、スクロースを基質としたレバンスクラーゼの糖転移反応によって合成されたものであることが示唆された。

Leuconostoc mesenteroides, levansucrase, levan

講演番号：2G41p14
講演日時、会場：3 月 27 日 16:43～ G 校舎 41 会場

1073R-1 乳酸菌で発酵したヨーグルトの免疫賦活作用における EPS の役割

Role of exopolysaccharide(EPS) in immunostimulatory effects of yogurt fermented with *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* OLL1073R-1

○牧野 聖也[1]、狩野 宏[1]、浅見 幸夫[1]、伊藤 裕之[1]、竹田 和由[2]、奥村 康[2]([1]（株）明治、[2]順天堂大・医)
○SEIYA MAKINO[1], HIROSHI KANO[1], YUKIO ASAMI[1], HIROYUKI ITOH[1], KAZUYOSHI TAKEDA[2], KO OKUMURA[2] ([1]Meiji Co., Ltd., [2]Juntendo Univ.)

Lactobacillus delbrueckii ssp. *bulgaricus* OLL1073R-1（1073R-1 乳酸菌）で発酵したヨーグルトは健常高齢者の NK 活性を増強し、風邪症候群への罹患リスクを低減することを明らかにしている（Makino *et al. Br. J. Nutr.* 2010）。また、本ヨーグルトはマウスを用いた実験系で抗インフルエンザ活性を発揮し、1073R-1 乳酸菌が産生する菌体外多糖（EPS）が活性に重要な役割を果たしていることが示唆されている（Nagai *et al. Int. Immunopharmacol*. 2011）。本研究は、1073R-1 乳酸菌で発酵したヨーグルトが発揮する免疫賦活作用において EPS が果たす役割を明らかにすることを目的に行った。

1073R-1 乳酸菌と *Streptococcus thermophilus* D 株で発酵したヨーグルト（1073R-1 ヨーグルト）、*L. bulgaricus* A 株と *S. thermophilus* D 株で発酵したヨーグルト、*L. bulgaricus* B 株と *S. thermophilus* C 株で発酵したヨーグルトをマウスに 3 週間経口投与し、脾臓細胞の NK 活性、抗 CD3 抗体刺激による IFN-γ産生量について評価を行った。また、それぞれのヨーグルトから EPS を精製し、*in vitro* における IFN-γ産生誘導活性について比較を行った。1073R-1 乳酸菌が産生する EPS についてはマウスへ経口投与を行い、1073R-1 乳酸菌の菌体と NK 活性増強効果を比較した。さらに、1073R-1 ヨーグルトを Rag-2 ノックアウト（KO）マウス、IFN-γKO マウスに経口投与し、NK 活性増強効果を評価した。

1073R-1 ヨーグルトは 3 種類のヨーグルトの中で唯一 NK 活性増強効果を発揮し、抗 CD3 抗体刺激による脾臓細胞からの IFN-γ産生量を増加させた。また、1073R-1 ヨーグルトから精製した EPS は *in vitro* における脾臓細胞に対する IFN-γ産生誘導活性を発揮し、1073R-1 乳酸菌が産生する EPS はマウスへ経口投与することで 1073R-1 乳酸菌の生菌、加熱処理菌体に比べて高い NK 活性増強効果を示した。KO マウスを用いた検討では、Rag2KO マウスでは 1073R-1 ヨーグルトの NK 活性増強効果は認められたが、IFN-γKO マウスでは NK 活性増強効果がほぼ消失した。

これらの結果から、1073R-1 ヨーグルトの NK 活性増強効果には 1073R-1 乳酸菌が産生する EPS が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。また、Rag2KO マウスや IFN-γKO マウスを用いた検討から、1073R-1 ヨーグルトの NK 活性増強効果には IFN-γの働きが必須であり、EPS は T 細胞や NK 細胞に対する IFN-γの産生誘導を介して NK 活性を上昇させると考えられる。

yogurt, NK, exopolysaccharide

講演番号：2G41p15
講演日時、会場：3 月 27 日 16:54～ G 校舎 41 会場

Lactobacillus GG 株のバイオフィルム形成能がマクロファージに与える影響について

Response from macrophage by ability of *Lactobacillus* GG on biofilm formation

○原田 岳、何 方、宮澤 賢司、依田 一豊、平松 優（タカナシ乳業（株）　商品研究所）
○Gaku Harata, Fang He, Kenji Miyazawa, Kazutoyo Yoda, Masaru Hiramatsu (Takanashi Milk Products Co., Ltd.)

【目的】*Lactobacillus* GG 株は菌表層に繊毛を有し、腸管に対する付着性が強く、単独でバイオフィルムを形成できることが報告されている。これら機能のうちバイオフィルム形成能をノックアウトすることで腸管への付着性が弱まることは知られているが、宿主免疫系に与える影響は明らかではない。そこで、本研究ではクォーラムセンシングに必要な細胞間の接触を構成する AI-2 酵素の luxS をノックアウトした *Lactobacillus* GG（CMPG5412）株を使用し、マクロファージに与える影響を検討した。

【方法】*Lactobacillus* GG 株、CMPG5412 株及び *Lactobacillus gasseri* TMC0356（TMC0356）株を 1×10^7 cfu/ml に調製し、プレートに接種して 7 日間培養した。その後洗浄し、クリスタルバイオレットで染色したサンプルの吸光度を測定し、バイオフィルム形成能を比較した。次に凍結乾燥物を 10 mg/ml に調製し、マクロファージ様細胞（J774.1 細胞）株（5×10^5 cells/ml）と 24 時間共培養後、サイトカイン（IL-12、IL-10、TNF-α、IL-6）を ELISA 法にて測定した。

【結果・考察】バイオフィルム形成能を比較すると、*Lactobacillus* GG 株は強く、CMPG5412 株は TMC0356 株と同程度弱いことを確認した。J774.1 細胞株と共培養後のサイトカイン産生量（IL-12、IL-6、TNF-α）は *Lactobacillus* GG 株と比較して、CMPG5412 株は有意に高かった。これまで *Lactobacillus* GG 株は、マクロファージやパイエル板細胞と共培養（*in vitro*）すると、TMC0356 株と比較してサイトカイン産生量は弱い特徴を有する。これらの結果から *Lactobacillus* GG 株はバイオフィルム形成能が無くなることで細胞対して直接的な応答が強くなり、細胞に働きかける能力が変化する可能性が示唆された。

Lactobacilli, macrophage, biofilm

講演番号：2G41p16
講演日時、会場：3 月 27 日 17:15～ G 校舎 41 会場

鯉ヘルペスウイルスの感染抗原に対する鶏卵抗体(IgY)の調製

Preparation of specific IgY against Koi Herpes Virus

○八田 一[1]、杣本 智軌[2]、佐藤 巧視[3]、森本 金次郎[4] ([1]京都女子大、[2]九大院農、[3]株式会社キョーリン、[4]安田女子大)
○Hajime Hatta[1], Tomonori Somamoto[2], Atsushi Satou[3], Kinjiro Morimoto[4] ([1]Kyoto Women's Univ., [2]Kyushu Univ., [3]Kyorin Co.,Ltd., [4]Yasuda Women's Univ.)

【目的】コイヘルペスウイルス（KHV）に感染した食用鯉や錦鯉の致死率は 80～90％と高く、KHV の検出や感染予防方法の開発が求められている。本研究では抗 KHV 鶏卵抗体(IgY)の調製に必要な KHV 感染抗原遺伝子のクローニングと抗原タンパク質の調製を行った。そして大腸菌に発現させた組換え抗原を産卵鶏に免疫し、得られた IgY 抗体の KHV 感染予防効果を鯉の培養細胞（KF－１）を用いて調べた。
【方法】KHV ゲノム中の感染抗原の候補として、ウイルスの膜タンパク質をコードする 3 種類の遺伝子（ORF 25, 99, 146)）に注目し、それぞれのプライマーを設計した。KHV から抽出した DNA を鋳型とし、PCR 法で目的遺伝子の 2 本鎖 DNA を作成し、その塩基配列を解析した。精製した目的遺伝子を pQE-30UA ベクターに組み込み、大腸菌に形質転換した。IPTG で遺伝子発現を誘導した菌体を 8M 尿素で溶解し、His タグカラムを用いて目的の抗原タンパク質を得た。透析した精製抗原を産卵鶏の翼下筋に隔週で３回、免疫注射し、血清及び採卵した卵黄中の IgY 抗体価を ELISA 法で解析した。また、精製した IgY の感染中和抗体価は鯉のヒレ由来培養細胞（KF－１）を用いた KHV 感染系で評価した。
【結果・考察】塩基配列解析の結果、各プライマーの PCR 増幅産物は報告されている各 ORF の塩基配列とそれぞれ適合度 98％、99％、99％を示しクローニングに成功した。各遺伝子を入れた大腸菌から組換え抗原タンパク質を得たが、いずれも尿素の透析中に不溶化した。不溶化した抗原を産卵鶏に免疫した結果、血清及び卵黄の ELISA 抗体価は初回免疫の２週後から上昇し、追加免疫の２週間後にそれぞれ最高値を示した。
なお、ELISA 抗体価の最大値を示した卵黄から精製した IgY の内、抗 ORF99IgY のみが KF-1 細胞に対する顕著な KHV 中和抗体活性を示した。すなわち、KHV 遺伝子の内、ORF99 がウイルス表面に発現している感染抗原であることが示された。

IgY, egg yolk antibody, Koi Herpes Virus

講演番号：2G41p17
講演日時、会場：3 月 27 日 17:26～ G 校舎 41 会場

ピロール化タンパク質を認識する血清成分の同定
Identification of a serum component recognizing pyrrolated proteins
宮下 宙士、○廣瀬 冴美、日沖 裕介、近澤 未歩、柴田 貴広、内田 浩二 (名大農)
Hiroaki MIYASHITA, ○ Sayumi HIROSE, Yusuke HIOKI, Miho CHIKAZAWA, Takahiro SHIBATA, Koji UCHIDA (Nagoya Univ.)

【背景・目的】
自己免疫疾患の一つである全身性エリテマトーデス(SLE) は、DNA に対して交差性を示す自己抗体の産生が大きな特徴として知られている。当研究室ではこれまでに、SLE 患者およびモデルマウス血清中の自己抗体が DNA のみならず、脂質過酸化由来アルデヒドによって修飾されたタンパク質に対しても交差性を示すことを明らかにしている。自己抗体が DNA と修飾タンパク質の両方を認識することから、修飾タンパク質中において DNA と類似した構造が存在するのではないかと考え、核酸染色試薬を用いた検討を行ったところ、その構造基盤としてγ-ケトアルデヒドによるタンパク質中のリジン残基のピロール化を見出した(Miyashita et al.,Sci.Rep.,2014)。LC-MS/MS を用いた生体内からのピロールリジンの検出定量を行ったところ、血清中にピロール化タンパク質が存在することを確認した。さらに、ピロール化タンパク質をマウスに免疫することにより DNA に対する抗体価が上昇したことから、生体内でピロール化タンパク質が自己抗体産生を引き起こしていることが示唆された。そこで本研究では、ピロール化タンパク質と相互作用する血清分子を探索し、ピロール化タンパク質が生体に及ぼす影響について解明するべく検討を行った。

【方法・結果】
ウシ血清アルブミンを結合させた磁気ビーズと、γ-ケトアルデヒドの最小単位である 1,4-butanedial を 24 時間反応させ、ピロール化タンパク質結合ビーズを作製した。ピロール化タンパク質結合ビーズにヒト血清を加え反応させた後、結合タンパク質の SDS-PAGE による解析を行ったところ、コントロールには見られない特異的なバンドを確認した。確認されたバンドを切り出し、MALDI-TOF-MS を用いてタンパク質同定を行った結果、ピロール化タンパク質と相互作用する血清分子として、apolipoprotein E (apoE) を同定した。そこで、等温滴定型カロリメトリーによる熱量測定、ELISA、western blotting などによる解析を行ったところ、ピロール化タンパク質と apoE の相互作用が確認された。さらに、マクロファージによるピロール化タンパク質の取り込み実験では、apoE のアイソフォームの 1 つである apoE3 がマクロファージへのピロール化タンパク質の取り込みを阻害することが明らかとなった。現在、ピロール化タンパク質と apoE との相互作用に焦点を当てて、apoE の機能性についてさらなる解析を行っている。

apolipoprotein E, pyrrolation

講演番号：2G41p18
講演日時、会場：3 月 27 日 17:37～ G 校舎 41 会場

血清に含まれるピロール化標的タンパク質の同定

Identfication of the target protein of pyrrolation in serum

○日沖 裕介、宮下 宙士、廣瀬 冴美、近澤 未歩、柴田 貴広、内田 浩二 (名大院生命農)
○ Yuusuke HIOKI, Hiroaki MIYASHITA, Sayumi HIROSE, Miho CHIKAZAWA, Takahiro SHIBATA, Koji UCHIDA (Nagoya Univ.)

【背景・目的】 タンパク質のピロール化は、陰性荷電や導電性の導入などの DNA 様構造特性を付与するタンパク質翻訳後修飾であることが明らかとなっている (Miyashita et al.,2014 Sci.Rep)。この研究成果を基に当研究室では、LC-MS/MS を用いたピロールリジンの検出定量を行い、ヒトおよびマウス血清タンパク質中にピロールリジンが存在することを見出した。本研究では、血清中に存在するピロール化標的タンパク質の同定を試みた。

【方法・結果】ピロール化標的タンパク質の探索には、ピロール化タンパク質を特異的に認識することが判明している、アポリポタンパク質 E (apoE) を欠損した apoE KO マウスを用いた。apoE KO マウス血清およびコントロールマウス血清を 4N NaOH を用いて 110 ℃で 18 時間アルカリ加水分解を行った後、固相抽出を行い、安定同位体希釈法を用いた LC-MS/MS によるピロールリジンの検出定量を行ったところ、コントロールマウスに比べ apoE KO マウスにおいて有意に高いピロールリジン量が検出された。そこで、陰イオン交換カラムを用いて血清タンパク質を分画し、LC-MS/MS によるピロールリジンの検出定量およびピロール化タンパク質に対する抗体を用いた ELISA などによって検討を行った。その結果、コントロールマウスと apoE KO マウスにおいて、ピロールリジン含量に差が見られる画分が確認された。現在、血清中におけるピロール化標的タンパク質の同定についてさらなる検討を行っている。

Posttranslational modification, Pyrrolated protein, Apolipoprotein E

講演番号：2G41p19
講演日時、会場：3 月 27 日 17:48～ G 校舎 41 会場

最終糖化産物（AGEs）を認識する血清受容体の探索と機能性解析

Identification and functional analysis of an advanced glycation end products (AGEs)-recognizing serum receptor

○近澤 未歩、柴田 貴広、内田 浩二（名大院生命農・応用分子生命科）
○Miho CHIKAZAWA, Takahiro SHIBATA, Koji UCHIDA (Grad. Sch. of Bioagric. Sci., Nagoya Univ.)

【背景】タンパク質の糖化により生成される最終糖化産物（AGEs）は自然免疫系受容体のリガンドとして作用し、様々なシグナル伝達、免疫応答を引き起こすことが予想される。
【目的】AGEs は生体内においてスカベンジャー受容体や自然抗体などの自然免疫系の分子に認識され、生体から速やかに除去されると考えられている。今回、既知の AGEs 結合分子以外にも、AGEs と相互作用し生体内で機能性を有する分子があることを期待し、その探索と機能解明を目的として検討を行った。
【方法・結果】磁気ビーズにウシ血清アルブミン（BSA）をカップリングした後、デヒドロアスコルビン酸（DHA）とインキュベートすることにより AGEs ビーズを作成した。AGEs ビーズをヒト血清とインキュベートし、結合タンパク質の SDS-PAGE を行った結果、AGEs に特異的なバンドが確認された。このバンドを切り出し、トリプシン消化、MALDI-TOF/TOF-MS 解析、Mascot を用いたデータベース解析を行った結果、補体因子である Complement C1q subunit A が同定された。C1q は病原体と結合することで補体古典経路を活性化し、病原体のオプソニン化と炎症反応の誘導に関与する自然免疫応答因子である。C1q と AGEs の相互作用については等温滴定型カロリメトリーを用いて確認し、C1q ペプチドを用いた競合実験、等温滴定型カロリメトリーにより AGEs の結合部位を明らかにした。また、結合には修飾タンパク質表面の、修飾に伴う負電荷の増大が重要であることが示唆された。さらに、AGEs に C1q が結合することにより補体経路が活性化され、マクロファージによる AGEs 貪食が促進されることが確認された。
　以上の結果より、補体 C1q は電荷を指標にした AGEs の認識を介し、AGEs 除去を促進する受容体であることが明らかになった。

AGEs, innate immunity, complement

講演番号：3A21a02
講演日時、会場：3 月 28 日 09:11～ A 校舎 21 会場

乳酸菌による発酵牛乳上清に認められる乳酸菌増殖促進活性
Growth-promoting activity for lactic acid bacterium found in supernatant of fermented cow milk by another lactic acid bacterium
○前田 勇、土居 寛幸、秋山 直毅 (宇都宮大農)
○Isamu MAEDA, Hiroyuki DOI, Naoki AKIYAMA (Utsunomiya Univ.)

伝統的なヨーグルト製造のスターターである乳酸菌 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*（以下 *L. bulgaricus*）と *Streptococcus thermophilus* には相互的な発酵促進効果が知られている。また、これらとは異なる乳酸菌 *Enterococcus faecalis*（以下 *E. faecalis*）には花粉症軽減やインフルエンザ予防の効果があると報告されている。これらの知見から、付加価値の高いヨーグルトの製造を目的として *L. bulgaricus* と *E. faecalis* の二菌での牛乳の混合発酵を試みた。

その結果、市販乳に両菌株を移植した場合に凝固時間が短縮された。*E. faecalis* 単独発酵で得られた凝固乳の遠心分離上清の添加により、*L. bulgaricus* の単独発酵時に、牛乳の凝固時間が大幅に短縮されることが確認された。このことから、*E. faecalis* による牛乳の発酵により *L. bulgaricus* の発酵を促進する物質が生成したことが推察される。また、食品検査キットにより *E. faecalis* 発酵乳上清中のギ酸、酢酸、および L-乳酸を定量し、*L. bulgaricus* の発酵時に添加した上清に含まれる量と同量のこれらの有機酸を添加して *L. bulgaricus* による牛乳の発酵を行ったところ、発酵上清添加時のような顕著な凝固促進効果は認められなかった。したがって、*E. faecalis* 発酵乳上清には *L. bulgaricus* の発酵促進に関与する、これら有機酸とは異なる物質が含まれていることが考えられる。rRNA を標的とした定量 PCR の結果 *E. faecalis* 発酵乳上清を添加した場合に、上清無添加時や有機酸添加時と比較し *L. bulgaricus* 由来の DNA 量の増加が認められたことから、凝固促進効果は上清添加により増殖が促されたことによることが明らかとなった。

そこで、*E. faecalis* による牛乳発酵後に得られた上清をカラムクロマトグラフィーにより分画し、*L. bulgaricus* 牛乳発酵時の凝固促進活性を指標にして *L. bulgaricus* 増殖促進物質の精製を行った。上清の凍結乾燥処理によっても凝固促進活性は失われることはなかったため、増殖促進物質は揮発性が低いことが考えられる。また、陰イオン交換カラム吸着画分と陽イオン交換カラム非吸着画分にそれぞれ活性が認められた。また、各分画に対して凍結乾燥後にメチルエステル化処理を行い GC-MS による解析を行ったところ同一マススペクトルを有するクロマトピークが凝固促進活性のある分画にのみ認められた。これらのことから、*E. faecalis* が牛乳中で増殖する際に産生するカルボン酸が *L. bulgaricus* の増殖を促進することが示唆された。

今後、本物質を同定することで、増殖促進のメカニズムを解明すると共に二菌をスターターとしたヨーグルト製造の最適化に結び付けていきたいと考える。

yogurt, lactic acid bacteria, *Enterococcus faecalis*

講演番号：3A21a03
講演日時、会場：3 月 28 日 09:22～ A 校舎 21 会場

Lactobacillus gasseri の乳中生育性を向上させる共培養乳酸球菌株の選抜

Screening for coccal lactic acid bacteria stimulating the growth of *Lactobacillus gasseri* in milk

○荒川 健佑[1]、峰雪 仁美[1]、川井 泰[2]、増田 哲也[2]、宮本 拓[1]([1]岡山大院環境生命、[2]日大生資科)
○Kensuke ARAKAWA[1], Hitomi MINEYUKI[1], Yasushi KAWAI[2], Tetsuya MASUDA[2], Taku MIYAMOTO[1] ([1]Okayama Univ., [2]Nihon Univ.)

【背景】*Lactobacillus gasseri* はヒト小腸において優勢の乳酸桿菌であり、様々な生理機能を有したプロバイオティクスとして知られる。しかしながら、*Lb. gasseri* は乳などの食品素材中で生育が緩慢なことが知られ、その利用性が損なわれている。発表者らはこれまでに、*Lb. gasseri* の乳中生育因子がペプチドであることを明らかにし、ペプチド成分の添加もしくはプロテアーゼによる乳タンパク分解によって、これら腸管由来乳酸桿菌を用いた発酵乳の製造が可能であることを示してきた。しかしながら、原料乳への添加物およびそれに準ずる物質の添加は消費者に忌避される傾向にあり、また、発酵乳中で余分なペプチドが富化することは苦味の原因となり、乳本来の風味を損なうことが懸念される。そこで本研究では、*Lb. gasseri* の乳中生育を促進する共培養乳酸球菌の探索を行い、何ら添加物のない腸管由来乳酸桿菌を用いた発酵乳の新たな製造法を確立することを目的とした。
【方法】BCP を添加した液体培地を用いて、*Lb. gasseri* が良好に生育可能な 37℃にて供試乳酸球菌 54 菌株を培養し、24 h 培養で黄変が確認された菌株を選抜した。次いで、一次選抜された菌株を用いて還元脱脂乳中で 37℃にて単独培養ないし *Lb. gasseri* と共培養し、単独培養よりも共培養で培養液 pH の低下が認められた菌株を選抜した。二次選抜菌株は MRS 培地にて 24 h 培養後、MRS 寒天培地に混釈し、25、30、37 および 42℃で培養し、コロニーカウントを行った。37℃培養でコロニーが形成された菌株を三次選抜菌株とし、菌種同定後、還元脱脂乳中で *Lb. gasseri* との共培養を行った。37℃で 72 h の培養を行い、経時的に培養液 pH、滴定酸度および各菌株の生菌数を測定した。
【結果】BCP 添加液体培地での 37℃培養により、供試 54 菌株から 45 菌株を選抜した。次いで、還元脱脂乳を用いた単独培養および共培養により、一次選抜 45 菌株から 5 菌株を選抜した。二次選抜された 5 菌株のうち 3 菌株（*Leuconostoc* 2 菌株、*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 1 菌株）で 25-37℃培養におけるコロニー形成が認められ、42℃培養ではコロニーが形成されなかった。一方、*Lb. gasseri* は 37-42℃でコロニー形成したことから、以降の共培養試験では総菌数を 37℃で、乳酸球菌と桿菌をそれぞれ 25 および 42℃で菌数測定することとした。乳中共培養試験では、いずれにおいても共培養で *Lb. gasseri* の生育性は向上し、培養 48 h 以内にカード形成が認められた。また、*Leuconostoc* 2 菌株では共培養によって球菌の生育性向上も確認された。以上のことから、*Lb. gasseri* 等の乳中生育が緩慢な腸管由来乳酸桿菌を用いた発酵乳製造が、ペプチド成分やプロテアーゼの添加無しに、特定の乳酸球菌との共培養によって実現可能であることが示された。

Lactobacillus gasseri, milk, cocultivation

講演番号：3A21a04
講演日時、会場：3 月 28 日 09:33～ A 校舎 21 会場

耐熱性ザイモモナス菌による L-乳酸の生産とその効率化

Production of L-lactic acid by thermotolerant *Zymomonas mobilis* and improvement of its efficiency

○江本 雄彰[1]、嘉松 初[1]、入江 陽[1]、中島 康之[1]、藤元 奈保子[1]、村田 昌之[1]、高坂 智之[2]、山田 守[1,2] ([1]山口大学大学医学系研究科、[2]山口大農)

○Katsuaki EMOTO[1], Ui KAMATSU[1], Akira IRIE[1], Yasuyuki NAKAJIMA[1], Naoko FUJIMOTO[1], Masayuki MURATA[1], Tomoyuki KOSAKA[2], Mamoru YAMADA[1,2] ([1]Yamaguchi University Graduate School of Medicine., [2]Yamaguchi University.)

[目的] 乳酸は生分解性プラスチックの原料であり、特に L-乳酸のポリマーは高い透明度や強度を持ち汎用性が高い。この乳酸の微生物による生産を高温発酵で行うことで、冷却コストの削減、発酵の迅速化、培養液への常温菌の混入抑制などによる生産コストの削減が期待できる。我々は、比較的代謝経路が単純でゲノムサイズが小さくエタノール生産を行う通性嫌気性グラム陰性菌 *Zymomonas mobilis* において、乳酸を高温発酵で生産させることを目指している。*Z. mobilis* は通常 25~30 ºC が至適温度とされているが、我々が用いる菌株は耐熱性を有する菌株であり、39℃での生育が可能である。以前の研究で、乳酸菌由来の L-乳酸脱水素酵素遺伝子 (L-LDH) を組込んだ L-LDH 発現ベクターを耐熱性 *Z. mobilis* に導入することにより L-乳酸の生産を確認した。しかし、乳酸の生産量は理論収率の約 15%しか生産出来ていなかった。本研究では、乳酸の生産性向上を目指し、*Z. mobilis* において高効率に乳酸を生産する方法の確立を試みた。

[実験・結果] 生産される乳酸による pH の低下が問題と考えられたため、pH 緩衝剤として炭酸カルシウムを培地に添加して培養を行ったところ、乳酸の生産量は理論収率の約 30%まで向上した。しかし、理論収率はまだ低いままであった。そこで、この菌のエタノール生産性を抑制する為にピルビン酸脱炭酸酵素の補酵素であるチアミン二リン酸の合成関連遺伝子を破壊したチアミン要求変異株を取得した。このチアミン要求株を用いてピルビン酸脱炭酸酵素を抑制し、乳酸の生産性を確認したところ、コントロール株と比較して細胞当たり二倍量の乳酸の生産が確認された。また、乳酸発酵において酸ストレスに耐性をもつ菌は生育に有利であると考え、低 pH 耐性株を低 pH 条件で継代培養することによって獲得した。この取得した酸ストレス耐性株による乳酸生産も試みている。

Zymomonas mobilis, L-lactic acid, thermotolerant

講演番号：3A21a05
講演日時、会場：3 月 28 日 09:44～ A 校舎 21 会場

乳酸菌 H78 株由来のタンナーゼ特性
Characteristics of Tannase from Lactic Acid Bacteria H78 Strain
○松田 麻李[1]、金内 誠[1]、戸塚 昭[2]、廣瀬 弥生[1] ([1]宮城大食産、[2]感性科学研究所)
○MARI MATSUDA[1], MAKOTO KANAUCHI[1], AKIRA TOTSUKA[2], YAYOI HIROSE[1] ([1]Miyagi Univ., [2]Res.Inst.of Kansei Sci.)

【目的】
タンナーゼ(tannase, E.C.3.1.1.20)はタンニン酸や没食子酸メチル、没食子酸エチルなどタンニン類のエステル結合の加水分解を触媒する。食品工業的には主に真菌類由来のタンナーゼが用いられており、茶飲料のクリームダウン(白濁防止)への利用が代表的である。またビールや果物ジュース、ワインなど飲料の混濁防止や清澄剤として利用される。この他タンニン汚染した工場の排水や農業廃棄物の処理への利用、さらには抗生剤や油脂類の酸化防止剤である没食子酸プロピルの合成等に幅広く利用されている。これら酵素特性はその由来の微生物により異なることから、多様な活用に対応するため、他の由来の酵素の利用が有効であると考えられる。そこで、本研究では食品利用されている乳酸菌からタンナーゼ高活性株を選抜し、酵素精製及び生化学的特性を明らかとすることとした。
【方法】
食品や穀物等から分離した研究室保有乳酸菌 194 株の供試菌株をタイプ別に分類･選抜し､タンナーゼ活性の定性法により高活性を示す菌株 H78 株を取得した。菌株 H78 株について GYP 培地(1.0% glucose、1.0% yeast extract、0.5% peptone)により 37℃で培養し、各生育段階（フェーズ）における酵素活性の差異を検討した。活性が高いフェーズまで培養後、菌体を遠心分離し、ガラスビーズと乳鉢で菌体破砕を行い、2mM EDTA 及び mercaptoethanol を含む 100mM リン酸緩衝液 (pH8.0)で抽出し、粗酵素液とした。これを 40～70%飽和となるように硫酸アンモニウムで塩析分画を行った。この酵素液を各種クロマトグラフィーに供試し精製を行った。酵素活性はメチル化ロダニンを用い、基質没食子酸メチルの加水分解による没食子酸の遊離を 40℃で経時的に A_{520} でモニターした。1 単位は 40℃で 1 分間あたり 1μM の没食子酸を生成する酵素量とした。また、酵素の至適 pH、至適温度など酵素化学的性質を検討した。さらに、常法に従い H78 株の同定試験を行った。
【結果と考察】
乳酸菌株をタイプ別に分類した 55 株からタンナーゼ活性の高い H78 株を選抜した。H78 株由来の酵素は、至適 pH は 8.0 と高く、pH11.0 のアルカリ性側でも高活性を示した。至適温度は 40℃で、50℃付近でも 49%の高い活性を保っていた。これらの酵素学的特性は、既知の *Lactobacillus plantarum* の報告と類似した。また本株は、定常期である 24～48 時間で高い値を示し、その後活性は大きく減少した。形態学的、生理学的、分子生物学的特性から、H78 は *L. plantarum* と同定された。

lactic acid bacteria, tannase, Lactobacillus plantarum

講演番号：3A21a06
講演日時、会場：3 月 28 日 10:05～ A 校舎 21 会場

LPS 活性消去乳酸菌の分離とその性質

The Isolation and Characteristics of Lactic Acid Bacteria Inactivating LPS(lipopolysaccharide)

○近藤 彩夏[1]、金内 誠[1]、畑中 咲子[1,2] ([1]宮城大食産、[2]宮城県産技センター)
○Ayaka KONDO[1], Makoto KANAUCHI[1], Sakiko HATANAKA[1,2] ([1]Miyagi Univ., [2]Indust. Technol. Instit. Miyagi)

［目的］
和食は自然の食材を生かし、健康的であることから、世界的に注目されている。この和食では、調味料や食材として機能性を持つ発酵食品が欠くことができない。特に漬物やヨーグルト等に含まれるプロバイオティクスとしての乳酸菌等の微生物は腸内環境改善以外にも抗がん作用、抗炎症作用等が報告されている。一方で悪性微生物による疾病の報告もあり、原因物質の１つとしてグラム陰性菌の細胞壁中に存在する LPS（リポ多糖）と呼ばれる炎症誘発物質が挙げられる。LPS は菌の死滅により菌体から遊離し、炎症性サイトカイン等の産生を誘導することで炎症を誘発する。LPS は熱・pH に安定的で、250℃、30 分の殺菌により失活する。腸の炎症疾患の予防には乳酸菌を含む食品の摂取が有効であることが示唆されており、これは LPS 活性除去による抗炎症効果であると考えられているが、詳細な減少メカニズムは未だ不明のままである。そこで本研究では、LPS 活性消去作用を持つ乳酸菌を選抜し、消去に寄与する物質とその作用機作を明らかとすることとした。
［方法］
乳酸菌は、研究室保存乳酸菌 168 株について検討した。16 時間前培養を行った培養液と LPS 溶液を 16 時間反応させ、遠心した上清の LPS 活性を測定した。LPS 活性は、リムルスカラーKY テストワコー（和光純薬工業）を用い測定した。その後、菌体をガラズビーズと共に破砕し、10mM リン酸緩衝液（pH7.2）により抽出した。遠心後得られた沈殿をリゾチームと反応させ、分画を行った。また、スクリーニングの結果得られた有効菌株について、同定試験を行った。
［結果］
スクリーニングの結果、LPS 活性消去作用を持つ 3 株が得られ、特に K23 株においては最も高い LPS 消去活性を示した。また、この株はグラム陽性、カタラーゼ陰性、二連球菌の乳酸菌であった。K23 株による LPS 活性減少は培養時間に比例し、4、15、30℃における培養温度の検討では 15℃において反応 40 時間で 30%消去し、分離株中最大の消去活性能を示した。乳酸菌各分画成分による LPS 減少効果を検討したところ、反応 0 時間における LPS 活性を相対 100%とした場合、培地及び菌体内可溶性画分では減少が見られなかったのに対し、細胞膜画分では 10%、細胞壁画分では 40%の減少を示し、LPS 消去活性を持つ物質は細胞壁画分に存在することが考えられた。

lactic acid bacteria, inactivation, lipopolysaccharide

講演番号：3A21a07
講演日時、会場：3 月 28 日 10:16～ A 校舎 21 会場

乳酸菌の脂肪酸取り込みによる抗ストレス作用について

Antistress Activity of Lactic Acid Bacteria after Taking up Fatty Acids

○長田 彩加、金内 誠、石田 光晴（宮城大食産）
○Ayaka Nagata, Makoto Kanauchi, Mitsuharu Ishida (Miyagi Univ.)

【目的】乳酸菌は古来より味噌や醤油、酒などの発酵食品製造に幅広く利用されている。その食経験から安全性の高い微生物として知られている。また近年、健康志向の高まりにより乳酸菌の整腸作用やプロバイオティクスに関して注目が集まっている。ところで、食品の製造に利用される乳酸菌は、低温や低 pH、高アルコールなどのストレス環境下で生育が可能なものがあり、様々な食品製造現場で利用されている。これまで、乳酸菌は低温下で不飽和脂肪酸の取り込みが促進されることが知られている。また低温下で細胞膜中の脂肪酸の組成が変化することにより低温寛容性を持つことが報告されている。さらに、他の微生物種では、膜の脂肪酸組成の不飽和度が高く、膜の流動性が高まることでアルコール耐性をもつと報告されている。そのため、乳酸菌のストレス耐性に関して細胞膜中の脂肪酸が関与することが示唆されている。

そこで本研究ではストレス条件下において乳酸菌が培地中に添加した各脂肪酸を取り込むことにより抗ストレス性を持つことについて検討し、脂肪酸と抗ストレス作用の関係を明らかにすることとした。

【方法】供試菌株として *Lactobacillus sakei*（NRIC 1071）および研究室保存株 *Lactobacillus sakei* Y-20 を用いた。MRS 培地で、30℃、24 時間、前培養をおこない、各脂肪酸（ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸、リノレン酸、パルミチン酸、パルミトレイン酸、リシノール酸）0.1%を含む YP 培地（0.5%Y 酵母エキス、0.5%ペプトン、0.1%カゼイン)にて、15℃、48 時間放置した。この菌体を、アルコール（0~15%）溶液に添加し、室温で 3 時間放置した。また、同様に pH2.0～6.0 の緩衝液に添加し、同様に放置した。この菌体を、MRS 寒天培地に塗抹し、その生菌数を求めた。また、MRS 培地で、24 時間、30℃前培養をおこない、各脂肪酸 0.1%を含む GYP 培地で、4~45℃、48 時間放置・培養を行った。増殖は濁度を測定した。

【結果】これら 2 つの株は、各脂肪酸 0.1%を含む GYP 培地では、30℃、24 時間で定常期に達した。15℃以下の低温温度条件下では、リシノール酸とオレイン酸において 24 時間以降で増殖速度が速くなった。また *L.sakei* において脂肪酸を添加していない培地において 15%アルコール存在下では生存率が 25%、pH2.0 の培地では生存率は 5%以下であった。一方、リシノール酸またはオレイン酸を加えた培地で培養した場合、15%アルコール存在下では生存率は 90%以上と生存率が高い傾向があった。また、pH2.0 ではオレイン酸を加えた培地において生存率は 30%以上であった。

lactic acid bacteria, fatty acid, antistress

講演番号：3A21a08
講演日時、会場：3 月 28 日 10:27～ A 校舎 21 会場

各種穀物を用いたアルコール飲料の特性

Characteristics of alcoholic beverages made from various grains

○竹下 良一、川野 徳嗣、三枝 敬明、寺本 祐司 (崇城大学)
○Ryouichi TAKESHITA, Tositugu KAWANO, Noriaki SAIGUSA, Yuji TERAMOTO (Sojo Univ.)

（目的）3 種類の有色米、黒米、赤米、緑米とワイルドライスを発酵原料として、蒸煮発酵法と無蒸煮発酵法による醸造酒の品質及び抗酸化能を比較評価した。また、各穀物中の抗酸化物質の分布について検討した。

（方法及び結果）全ての有色玄米とワイルドライスを粒径 2～3 mm に粉砕し、糖化剤としてスミチーム及び、協会 7 号酵母、2 種類の研究室保存酵母、乾燥パン酵母の 4 種類の酵母を用い 25℃で試醸した。全ての有色米発酵酒で、総フェノール性化合物含量は無蒸煮発酵酒の方が高く、色調が鮮やかであった。しかし、最終 pH 値（4.6~5.0）、酸度（2.2~3.6 ml）、およびアルコール濃度(3.4~17.4%, v/v) に関しては、発酵法による影響は認められなかった。また、酵母による違いも認められなかった。

DPPH ラジカル消去能と β－カロテンを用いた脂質過酸化阻止能により評価した抗酸化能では、ワイルドライスの醸造酒が発酵法に関係なく高い抗酸化活性を示した。また、穀粒中の抗酸化物質の分布状況を、精米歩合を変え、DPPH ラジカル消去能と β－カロテン脂質過酸化阻止能の 2 法を用いて測定した。精米歩合を変えた各発酵酒の DPPH ラジカル消去能では、黒米では 460～1500 μM Tolox eq. に変化したのに対し、ワイルドライスでは、1200～1700 μM Tolox eq. に変化した。一方、脂質過酸化阻止能は黒米では 5500～7600 μM BHT eq. に変化し、ワイルドライスでは、1400～7100 μM BHT eq. に変化した。精米歩合が低くなるにつれ、黒米、緑米、ワイルドライスでは DPPH ラジカル消去能の値が下がるのに対し、赤米は変化しなかった。一方、β－カロテン脂質過酸化阻止能では精米歩合が低くなるにつれ、黒米の値が下がるのに対し、赤米、緑米、ワイルドライスの値は上がった。これらのことから、水溶性の抗酸化能と脂溶性の抗酸化能の分布状況は各穀物によって異なる特徴があることが推察された。水溶性の抗酸化物質では各穀物ともに、多くは表皮部分に存在し、脂溶性の抗酸化物質は黒米では表皮部分に存在するが、ワイルドライスや赤米では、穀粒表面よりも穀粒の内部により多く存在することが推察された。

また、ワイルドライスで試醸したアルコール飲料の抗酸化能の経時変化を DPPH ラジカル消去能と β－カロテン脂質過酸化阻止能で測定した。両方ともに 2 日目～3 日目以降から最高値に達することがわかった。ただし、β－カロテン脂質過酸化阻止能が一日遅れてピークに達したことから、脂質過酸化阻止能に関わる成分が穀粒内部に多く存在するという筆者らの推察を支持していると考察した。

Wild rice, alcoholic beverage, fermentation

講演番号：3A21a09
講演日時、会場：3 月 28 日 10:38～ A 校舎 21 会場

各種有色米とワイルドライスを用いたアルコール飲料の機能性

Characteristics of alcoholic beverages made from colored rice and wild rice.

○川野 徳嗣、竹下 良一、三枝 敬明、寺本 祐司（崇城大・生物生命）
○YOSHITSUGU KAWANO, RYOICHI TAKESHITA, NORIAKI SAIGUSA, YUJI TERAMOTO (Sojo Univ.)

【目的】

黒米等の各種有色米とワイルドライスを原料として、蒸煮発酵法と無蒸煮発酵法を用いてアルコール飲料を試醸し、その抗酸化作用と抗酸化物質の分布について比較検討した。

【方法】

アルコール飲料は黒米とワイルドライスを原料として使用した。比較するために、白米もアルコール飲料の原料として用いた。アルコール飲料の組成をアルコール濃度、pH、酸度、総フェノール性化合物量で調べた。抗酸化作用については二通りの方法で調べた。一つは水溶性の抗酸化物質量を調べる DPPH ラジカル消去能であり、もう一つは脂溶性の抗酸化物質量を調べる脂質過酸化阻止能である。

【結果】

無蒸煮アルコール飲料は蒸煮アルコール飲料に比べて色調が鮮やかだった。無蒸煮アルコール飲料の総フェノール性化合物量は蒸煮アルコール飲料より高い傾向を示した。抗酸化作用の結果は蒸煮、無蒸煮発酵法に関わらずワイルドライスを原料に用いたアルコール飲料は高い値を示した。ワイルドライス、黒米の糠部分を多く含む原料でアルコール飲料を試醸し、抗酸化作用、及び総フェノール性化合物量を比較した。総フェノール性化合物量は糠部分を多く含む原料で試醸したアルコール飲料は高い値を示した。DPPH ラジカル消去能は黒米の糠部分を多く含む原料で試醸したアルコール飲料は蒸煮法、無蒸煮法で 1968μM Trolox eq、1704μM Trolox eq と高い値を示した。β−カロテン脂質過酸化阻止能はワイルドライスのアルコール飲料では高くなるのに対して、黒米のアルコール飲料では低下した。これらの結果より、ワイルドライスと黒米とでは水溶性の抗酸化物質と脂溶性の抗酸化物質の含有部位が異なっていることが示唆された。

Alcoholic beverages, Wild rice, Fermentation

講演番号：3A21a10
講演日時、会場：3 月 28 日 10:49～ A 校舎 21 会場

戦前の泡盛黒麹菌株「瑞泉菌」のゲノム解析と泡盛成分
Genomic analysis of pre-war black Aspergillus strains "Zuisen" and flavor analysis of Awamori
○塚原 正俊[1]、渡久地 政汰[1]、鼠尾 まい子[1]、東 春奈[1]、伊波 朋哉[1]、大城 彩音[1]、渡邉 泰祐[2]、外山 博英[2] ([1]バイオジェット、[2]琉大農)
○Masatoshi Tsukahara[1], shota Toguchi[1], Maiko Nezuo[1], Haruna Azuma[1], Tomoya Iha[1], Ayane Oshiro[1], Taisuke Watanabe[2], Hirohide Toyama[2] ([1]BioJet Co.Ltd., [2]Univ.Ryukyus)

【背景・目的】
泡盛は約 600 年の歴史を有する日本最古の蒸留酒である。かつて泡盛酒造所ではそれぞれ独自の醸造微生物が用いられ風味の個性化につながっていたと考えられている。しかし、第２次世界大戦により、人命やノウハウと共に、これら各酒造所保有の独自微生物のほとんどを消失した。その後、先人たちの努力による泡盛復興から現在まで、泡盛醸造微生物である酵母及び黒麹菌は醸造特性が高い限られた株が用いられている。このような中「泡盛酵母」については、近年になって新たな酵母菌株を用いた研究開発および商品化が進められ泡盛風味のバラエティー化につながるいくつかの成果が得られている。一方、「泡盛黒麹菌」についての研究開発の取り組みは少なく、基盤研究から、泡盛醸造特性、泡盛風味への影響など不明な点が多く、このことが新たな黒麹菌株を実用化する際のハードルとなっている。本研究では、戦前の菌株を復興した唯一の黒麹菌株「瑞泉菌」について、全ゲノム情報を取得し他の黒麹菌と比較することで、戦前の黒麹菌株の性状の一端を明らかにすると共に、瑞泉菌を用いた泡盛の成分を評価することで、黒麹菌の泡盛への影響を考察することを目的とした。
【方法・結果】
現在の泡盛醸造では、商業生産に適した特定の黒麹菌株（２菌株を混合して利用）がほぼ全ての酒造所において用いられている。「瑞泉菌」は、戦前に泡盛酒造所より採取され本土にて保存されていたことで戦禍を逃れた黒麹菌株で実際の商品「御酒（うさき）」（瑞泉酒造(株)）に用いられている。今回、この瑞泉菌の全ゲノム情報の取得を試みた。黒麹菌よりゲノム DNA を抽出し、次世代シーケンサ MiSeq を用いて網羅的ゲノム情報を取得した。得られたゲノム情報を用いて既報のデータとの解析および相互解析を行った。近年、泡盛黒麹菌を含む黒麹菌類は再分類がなされた結果、*Aspergillus awamori* が廃され、新たな種名として *A. luchuensis* が認定された。今回、一般の２菌株（ISH1、ISH2）と共に瑞泉菌は *A. luchuensis* に分類されること、瑞泉菌は２菌株のうち ISH2 との相同性がやや高いものの、瑞泉菌は ISH2 とも多くの相違点を有することが明らかとなった。また、瑞泉菌を用いた泡盛について香気成分の網羅的分析を行った結果、一般的に用いられている黒麹菌株と比較して果実様香成分の増加などが確認され、特徴的な風味成分のバランスとなることが明らかとなった。現在、瑞泉菌、および他の泡盛黒麹菌株について、比較ゲノム解析の結果とこれらを用いて醸造した泡盛成分の統合解析を進めている。

Awamori, liquor, NGS

講演番号：3A21a11
講演日時、会場：3 月 28 日 11:10～ A 校舎 21 会場

高品質清酒醸造のための晩生一般米・千秋楽の酒造適性に関する研究

Study on brewing properties of late-maturing cooking rice *Sensyuraku* for high-quality sake brewing

○中村 諒[1]、安澤 義彦[1]、佐藤 謙仁[1]、佐藤 優子[1]、市川 絵梨[1]、田村 博康[1,2]、平田 大[1,2]([1]朝日酒造、[2]広大・院・先端研)

○Ryo NAKAMURA[1], Yoshihiko ANZAWA[1], Kenji SATOH[1], Yuko SATOH[1], Eri ICHIKAWA[1], Hiroyasu TAMURA[1,2], Dai HIRATA[1,2] ([1]Asahi Sake Brewing Co., Ltd., [2]Hiroshima Univ. AdSM)

【目的】日本酒は、麹菌（*Aspergillus oryzae*）、酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）の２種類の微生物を使用した独特な製法により、米（*Oryza sativa* L.）と水の２つの原料から生成される。原料は、最終製品の品質を決定する重要な因子の一つである。そのため、高品質清酒醸造、特に大吟醸酒（精米歩合 50%以下）においては、工程管理上、優れた原料米品種が必要である。

晩生の一般米である千秋楽は、復刻米として復活し、清酒醸造に使用されてきた。しかし、千秋楽の復活に至る過程の公表、また、高度精米を用いた高品質清酒醸造のための酒造適性の評価は不充分な点が多い。そこで、本研究では、千秋楽の選抜過程を紹介し、高品質清酒醸造のための酒造適性を解析した。

【方法・結果】

（１） 千秋楽の一次選抜：千秋楽は、当初、低タンパク質含量を指標に選抜された。さらに、高品質清酒醸造のための酒造適性を評価するために、酒米 2 品種（早生・五百万石と晩生・越淡麗）と一般米 1 品種（早生・ゆきの精）との酒造適性を比較した。粗タンパク質含有量をケルダール法により測定した結果、千秋楽の粗タンパク質含有量は五百万石やゆきの精より低かった。一方、千秋楽の酵素消化性は五百万石やゆきの精より高かった。また、白米のデンプンの老化性を調べるために蒸米冷却後の酵素消化性の減少率を比較すると、千秋楽の減少率は五百万石と雪の精より低く、相対的に老化速度が低いことが判明した。

（２）千秋楽の酒造適性の追跡調査：2012 年度産米を用いて米粒剛度を測定した結果、千秋楽の精白米の米粒剛度は五百万石よりも高かった。近年、ラピッド・ビスコ・アナライザー（RVA）による粘度測定値と酒造適性に関連するデンプン特性との相関が示されている。この RVA の粘度測定値から、千秋楽の優れた醸造特性（高い吸水性及び酵素消化性）が確認された。さらに、実機製麹機による麹の酵素力価を比較した結果、千秋楽の麹は、醸造用米のものと同等であった。

以上より、千秋楽は、掛米としてだけでなく麹米としても醸造用米と同等の、高品質清酒醸造のための優れた特性を持つことが判明した。

【公表論文】

Anzawa *et al.* Late-maturing cooking rice *Sensyuraku* has excellent properties, equivalent to sake rice, for high-quality sake brewing, *Biosci. Biotechnol. Biochem*., **78**, 1954-1962 (2014).

late-maturing rice, polishing property, sake brewing

講演番号：3A21a12
講演日時、会場：3 月 28 日 11:21～ A 校舎 21 会場

酒造好適米を用いた無通風箱培養法による試験製麹法

Test koji-making with suitable rice for sake brewing by non-airflow box culture

○伊藤 一成[1]、五味 勝也[2]、狩山 昌弘[3]、三宅 剛史[1] ([1]岡山県工技セ、[2]東北大院農・生物産業創成、[3]フジワラテクノアート)
○Kazunari ITO[1], Katsuya GOMI[2], Masahiro KARIYAMA[3], Tsuyoshi MIYAKE[1] ([1]Industrial Technology Center of Okayama Prefecture, [2]Tohoku University, [3]Fujiwara Techno-Art Co, Ltd.)

【目的】 清酒製造において麹の品質は、発酵の型や製成酒の酒質に大きな影響を及ぼす。目的にあった品質の麹を製造するためには、様々な条件で試験を行い、その品質を確認していく必要があるが、製造現場とスケールが大きく異なる実験室レベルでの試験では、生じる様々な培養状態の違いから、試験結果を製造現場に反映できないことが多い。我々は以前に小麦ふすまを基質として酵素の高生産を目指した研究において、無通風箱培養法と呼ばれる固体培養技術を確立した。この試験培養法は実験室レベルで試験でき、製造現場にも応用可能な中規模のスケールをもって行う方法であり、基質の均一な培養状態の維持とその培養期間中の制御を可能にする技術である。この技術を応用すれば、様々な条件下で、スケールの大小によらず製造現場と同等の試験製麹が可能だと考えられる。本研究では、この無通風箱培養法が清酒製造現場での麹造りを再現することができ、試験製麹法として妥当か否かについて報告する。
【方法】 精米歩合 60%の雄町 200g を基質とし、蒸し上げ後水分含量 32wt%になるよう調製した。これに清酒用麹菌 *Aspergillus oryzae* RIB128 を植え付け、培養器である無通風箱の中に入れた。培養中の温度経過は、製造現場での麹造りの経過を参考に設定した。すなわち恒温恒湿槽内で 30℃, 95%RH の環境下で 24 時間培養した後、12 時間かけて 40℃まで上昇させ、さらにそのまま 12 時間、計 48 時間培養した。この培養期間中の麹の品温と湿度はデータロガーにより収集した。培養後、状貌の観察と各酵素の力価を測定した。
【結果】 できあがった麹は正常な麹としての状貌をなし、局所的な不均一さは見られなかった。さらに米の表面だけでなく、内部にも菌糸がしっかりと入り込んでいた。また、製造現場で造られた麹の酵素力価と比較した。原料や麹菌、詳細な培養経過などが違うため単純な比較は出来ないものの、無通風箱培養法による麹は同程度の酵素力価とバランスを有していた。以上の結果から、無通風箱培養法は製造現場と遜色ない麹の再現を可能にし、試験製麹法として利用可能であると判断した。

solid-state fermentation, koji-making, enzyme production

講演番号：3A21a13
講演日時、会場：3 月 28 日 11:32～ A 校舎 21 会場

清酒の香気成分生産能を強化した麹菌の作製
Construction of *Aspergillus oryzae* with enhanced leucic acid, Japanese sake aroma, production
○岡部 夏海[1]、山本 竜也[1]、喜多 あいり[1]、安田（吉野） 庄子[2]、志水 元亨[1]、加藤 雅士[1] ([1]名城大農、[2]あいち産科技総セ・食工技セ)
○Natsumi OKABE[1], Tatsuya YAMAMOTO[1], Airi KITA[1], Syouko YASUDA[2], Motoyuki SHIMIZU[1], Masashi KATO[1] ([1]Meijo Univ., [2]Aichi Center of Industry and Science Technology)

【目的】
清酒の代表的な香気成分としてカプロン酸エチルや酢酸イソアミルなどがある。これらは酵母単独で生合成できるため、それらの生産能を高めた酵母の育種は盛んに行われている。一方、香気成分の中で清酒の香気増強に重要なロイシン酸エチルの生成については酵母単独で生合成できないことが明らかになっている。ロイシン酸エチルの生成機構としては麹菌 *Aspergillus oryzae* により、米に含まれるロイシンがロイシン酸へと変換され、さらに酵母のリパーゼの作用によりロイシン酸エチルが生成される事が報告されているが、これまで *A. oryzae* においてロイシンからロイシン酸の生合成に関与する酵素についての知見はなかった。本研究では、*A. oryzae* においてロイシン酸の前駆体と考えられた 4-methyl-2-oxopentanoic acid (MOA) をロイシン酸に変換する酵素である MOA レダクターゼの探索を行い、さらに、見出した酵素をセルフクローニングによって高発現させた麹菌を作製した。MOA レダクターゼを高発現させた吟醸酒用麹菌を用いることで、香味豊かな吟醸酒生産への展開も期待できる。
【方法・結果】
麹菌のゲノム情報から MOA レダクターゼが属すると考えられた 2-ケト酸デヒドロゲナーゼファミリーに属する 5 種の候補遺伝子を選抜した。これらの遺伝子について、大腸菌を宿主として異種発現させ、組換え酵素を精製し、MOA 存在下における NAD(P)H の減少をモニターすることで MOA レダクターゼ活性の有無を調べた。その結果、5 種のうち 1 種は NAD(P)H 存在下で MOA をロイシン酸に還元した。生成した化合物がロイシン酸であることを GC-MS 解析によって確認した。またこの酵素は、MOA の他に 5 種類の 2-ケト酸（ピルビン酸、フェニルピルビン酸、3-メチル-2-オキソペンタン酸、グリオキシル酸、β-ヒドロキシピルビン酸）を基質としたことから、2-ケト酸に対して広い基質特異性を有していた。さらに、見出した MOA レダクターゼを高発現させた株を作製し、LC-MS/MS を用いてロイシン酸の生産量を定量した。100 ml の Czapek-Dox 培地で 2 日間培養した場合、野生株では細胞内・外いずれもロイシン酸を検出できなかったが、作製した MOA レダクターゼ高発現株では細胞内に 13.6 pmol/g wet weight、細胞外に 0.4 pmol のロイシン酸を生産していた。現在、作製したロイシン酸生産能強化麹菌を使用した日本酒の小規模醸造試験を行っている。

Aspergillus oryzae, Leucic acid, MOA reductase

講演番号：3A21a14
講演日時、会場：3 月 28 日 11:43～ A 校舎 21 会場

エタノール発酵糸状菌の二形成制御による好気的酵母化

Morphological change to yeast sell of ethanol-fermenting fungi under the aerobic condition by dimorphic control

○高野 真希[1]、寺山 結香[2]、星野 一宏[1]（[1]富山大院理工・ナノ新機能、[2]富山大工・生命）
○Maki TAKANO[1], Yuka Terayama[2], Kazuhiro Hoshino[1] ([1]Grad. Sch. Sci. Eng., Univ. Toyama, [2]Dept. Eng., Univ. Toyama)

【目的】Ethanol 発酵糸状菌 *Mucor circinelloides* 4572J は単糖から多糖類まで種々の糖質を高効率で Ethanol へ変換できる菌株である。また、本菌株は好気条件下でも Ethanol 発酵が可能であるという特徴を有する。本菌株をリアクターを用いた Ethanol 生産に適用する際、槽内に菌糸塊を形成し局在化するため、培養液と菌糸の分離が容易になるといった反面、基質等の菌体への物質移動阻害による発酵効率の低下や連続培養が不可能であるといった様々な問題が生じる。一方、*Mucor* 属に属する一部菌株は二形性を示すことが知られており、通気環境の変化や菌糸形成抑制物質の添加に応答することで糸状体および酵母体の両形態へ可逆的に変化することが可能である。4572J も二形性を示す菌株であり、好気条件下で糸状体、N_2 および CO_2 を封入した完全嫌気条件下では酵母体を形成することが判明している。この特性を生かし、酵母化させた 4572J を用いた Ethanol 生産は、従来の酵母を用いたエタノール醗酵と同様な操作が達成でき、さらに発酵効率の向上が期待できる。しかし、この嫌気培養条件は厳密な制御が必要であり、好気条件下でも酵母化し Ethanol 生産できることが望ましい。そこで本研究では、酵母化 4572J による好気 Ethanol 発酵を目的とし、培地への各種菌糸形成抑制物質の添加による 4572J の好気的酵母化について検討した。
【方法・結果】糸状菌 *M.circinelloides* 4572J が酵母化する完全嫌気条件は 70% N_2 および 30% CO_2 である。この条件で前培養を行い、形成した酵母体を本培養に用いた。酵母体形成に関与するメカニズムとして、細胞膜構成成分であるエルゴステロールおよび細胞内 cAMP の蓄積が知られており、これらの合成を制御することで酵母体が得られる可能性があった。そこで本培養では酵母体形成に関連する Ergosterol および cAMP の合成に影響があると考えられる物質を培地中に添加し、形態の観察および Ethanol 生成の検討を行った。その結果、0.04 mM のアゾール化合物を添加することにより酵母体が形成することがわかった。このとき、Ergosterol の合成が抑制され前駆体の Lanosterol が蓄積しており、また、細胞膜の脂肪酸組成も変化していた。細胞膜内の脂肪酸やステロールの含量を制御することで酵母体が形成されると考えられる。しかしアゾール化合物の添加は増殖および Ethanol 生成を強く阻害した。一方、cAMP 合成に関与すると考えられる物質のうち、Caffeic acid を 0.1 mM 添加し 100 g/L の Glucose を炭素源として好気条件下で培養した際、良好な酵母化形成が確認でき、培養 72 h で約 30 g/L の Ethanol が生成できた。しかし Caffeic acid が酵母化形成に関与するメカニズムは不明であり、現在、cAMP 生合成関連酵素の挙動などを検討中である。

dimorphism, *Mucor*, yeast-like cell

講演番号：3A21a15
講演日時、会場：3 月 28 日 11:54～ A 校舎 21 会場

製造場および酒造年度の異なる速醸もとを用いた清酒の醸造過程における細菌叢の経時的変化

Microbial flora of sake koji, 'sokujo-moto' and main mashes made in different breweries and brewing years analyzed by the 16S rRNA gene-based pyrosequencing

○佐藤 万里、三枝 静江、細井 知弘（東京都立食技セ）
○Mari SATO, Shizue SAEGUSA, Tomohiro HOSOI (Tokyo Metro. Food Tech. Res. Ctr.)

【目的】

清酒，焼酎，ワインなどの酒類製造時における酵母以外の微生物の存在は，製品の品質に影響を及ぼし得る。近年，次世代シークエンサーを用いた解析により，生もと造りの清酒や泡盛の醸造過程の菌叢の推移が明らかとなってきている。我々はこれまでに，次世代シークエンサーを利用した解析により，速醸もとを用いた清酒醸造過程においても数十種類の細菌が存在し，製造場や醸造過程によって細菌叢が異なることを示唆する結果を得ている（農芸化学会 2014 年度大会にて発表）。本大会では，新たに，昨年度未解析であった一部の醸造過程の試料および同一製造場の異なる酒造年度の試料について解析したので，その結果を昨年度報告の内容と併せて報告する。

【方法】

都内３製造場より提供を受けた麹，酒母（前期，後期），もろみ（初期，中期，末期）の冷凍試料（平成 23 酒造年度は A, B, C 社より，平成 24 酒造年度は A 社より分与，計４製造ロット分）からゲノム DNA を抽出し（QIAamp DNA Stool, ビーズ破砕処理併用），16S rRNA 遺伝子の V7-V9 領域（position 968-1390）の PCR 増幅産物を調製して，Roche GS Junior を用いた Pyrosequencing 法により解析した。得られたリード（各試料につき約 5 万～15 万）について，相同性検索等を解析ツール Quantitative Insights Into Microbial Ecology（QIIME）を用いて行った。

【結果】

都内３製造場それぞれの麹，酒母（速醸もと），もろみについて（上記４製造ロット分），次世代シークエンサーを用いて網羅的に細菌叢を解析したところ，全試料から共通して *Staphylococcus* 属，*Pseudomonas* 属細菌等に由来するリードが検出され，その比率は各ロットにおいて経時的に変化していた。乳酸菌については，製造場により検出された菌種やリードの比率の差が大きく，特に生もと造りの清酒も製造する A 社の両年度（平成 23，24 酒造年度）のもろみ試料からは，*Lactobacillus* 属，*Leuconostoc* 属，*Streptococcus* 属由来のリードが他社と比較して高い割合で検出された。

sake koji and mash microflora, sokujo-moto, 16S rRNA gene-based pyrosequencing

講演番号：3A21p01
講演日時、会場：3 月 28 日 14:00～ A 校舎 21 会場

ササユリからの酒造用酵母の分離とその醸造特性

Isolation and *sake* brewing-characterization of brewer's yeast strain from *Lilium japonicum*

○都築 正男、大橋 正孝、清水 浩美 (奈良県産振セ)
○Masao TSUDUKI, Masataka OHASHI, Hiromi SHIMIZU (NIID)

【目的】清酒の消費量の減少は年々進行し、現在ピーク時の 3 分の 1 程度に落ち込んでいる。若年層の清酒離れが進んでいるものの、地酒など酒質にこだわったものが好まれ売上を伸ばしており、また海外への輸出が急速に増加している。近年、消費者の求める清酒の嗜好は多様化しており、このようなニーズから独自の酵母を新たに探索する試みが各地域でなされている。奈良県においても、独自の酵母を探索し、これまでに奈良県花であるナラノヤエザクラの花弁より低アルコール酒向けの酵母を獲得している。本研究では、清酒用酵母の獲得を目指して、奈良県桜井市三輪地域の植物・土壌・水を単離源として酵母を探索し、醸造協会酵母とほぼ同等のアルコールを生成する酵母を獲得し、この酵母の醸造特性等を調査したので報告する。
【方法】採取した試料を麹汁培地（Brix 10、pH 3.5）に浸漬し、30 ℃で集積培養を行った。集積培養で、培養液の濁り及び発泡したものをさらに、Brix 20 の麹汁培地で高糖濃度耐性のものを選抜した。さらに 10 %エタノールを含む麹汁培地（Brix 10、pH 3.5）・15 ℃で培養し、アルコール耐性の酵母を選抜した。分離した菌株のうち特に生育が早いものを TTC 染色で醸造能を確認し、シスメックス・ビオメリュー社製の同定キット ID32C API および 26S rDNA D1/D2 領域の塩基配列から同定を行った。得られた酵母のうち *Saccahromyces cerevisiae* と同定されたものを用いて、β-アラニンテストや Awa1 遺伝子および長鎖末端反復配列 YLRW delta20 を PCR で増幅し、醸造協会酵母と異なる菌株であることを確認した。また、小仕込試験を行い、醸造特性を調査し、清酒製造に有望な菌株を絞り込み、規模を拡大した試験醸造を行って最も有望な 1 菌株を獲得し、生成した清酒の成分分析を行った。
【結果】奈良県桜井市三輪地区の 8 か所より 113 サンプル採取した。集積培養後、高糖濃度・10 %エタノールで生育・発泡した菌株が 87 サンプルあった。この中から生育が早く TTC 染色でピンク～赤に呈色した 13 サンプルについて同定したところ、6 菌株の *Saccahromyces cerevisiae* を獲得した。これらは 4 株がササユリの花、1 株が土壌、1 株が雑草から得られたものである。また、βアラニンテストで 6 菌株のうち 5 菌株で協会 7 号系統とは異なる生育パターンを示し、Awa1 遺伝子、YLRWdelta20 を PCR した結果、全ての菌株で協会酵母と異なる菌株であることが判った。小仕込試験および総米 700 kg の試験醸造の結果、ササユリ由来の酵母 No.79 から、16.4 %のエタノールを生成し、酸度 2.9、日本酒度-14.6 でリンゴ酸を多く含み、イソブチルアルコール・イソアミルアルコールを多く含有する日本酒が生成した。

Saccharomyces cerevisiae, isolation, *sake* brewing characteristics

講演番号：3A21p02
講演日時、会場：3 月 28 日 14:11～ A 校舎 21 会場

泡盛酵母の生理学的特徴
Physiological characterization of Awamori yeast
○吉田 嵩策、渡邉 泰祐、外山 博英（琉球大農・亜熱生資）
○Shusaku YOSHIDA, Taisuke WATANABE, Hirohide TOYAMA (Dept. of Biosci. Biotech. Fac. of Agr., Univ. of Ryukyus)

【目的】泡盛醸造におけるもろみには黒麹菌の生産するクエン酸が多量に含まれていることから、泡盛醸造にはクエン酸に耐性を有する酵母を使用する必要があるとされてきた。しかし、今日使用されている泡盛酵母が他の酵母に比べてクエン酸に特に高い耐性を持つという学術的報告が無いことから、本研究では最初に泡盛酵母のクエン酸耐性などの生理学的特徴を他の酵母と比較することにした。
【方法】泡盛酵母 101-18 株、清酒酵母 K7 株、実験室酵母 S288C 株を供試菌株とした。クエン酸耐性比較では、YPD 液体培地（1% Yeast extract、2% ポリペプトン、2% Glucose）に 0%から 7%クエン酸を添加し、30℃から 39℃、200 rpm 振盪培養での生育を McFarland 比濁計により測定した。また YPD 液体培地に 0%から 11%の NaCl を添加し、30℃、200 rpm 振盪培養での生育を McFarland 比濁計により測定し、比較した。また YPD 寒天培地に 0%から 10%の NaCl を添加し、OD600 = 1.0 に希釈した対数増殖期の菌液をスポットして 30℃で培養し生育を比較した。
【結果】クエン酸耐性を液体培地の生育で比較したところでは、30℃でクエン酸 8%では全ての菌株で生育が見られなかったが、7%の時 K7 株>S288C 株>101-18 株の順で生育がよかった。33℃でクエン酸 7%では全ての菌株で生育が見られなかったが、6%では 101-18 株が一番早く生育し S288C 株はわずかに生育したものの、K7 株はほとんど生育しなかった。35℃でクエン酸 6%では全ての菌株で生育が見られなかったが、5%では 101-18 株が一番早く生育し、K7 株、S288C 株はわずかに生育した。37℃でクエン酸 5%では全ての菌株で生育が見られなかったが、4%では 101-18 株と K7 株のみ生育し、生育の差は見られなかった。39℃でクエン酸 2%では全ての菌株で生育が見られず、クエン酸非存在下では S288C 株>K7 株の順で生育したが、101-18 株は生育しなかった。液体培地、NaCl 存在下では 5-11%ではすべての濃度で 101-18 株の生育が早かった。寒天培地での生育は NaCl 5%では 101-18 株が一番早く生育したが、10%ではどの菌株も生えることは無かった。
【考察】101-18 株は他の株に比べて 30℃で特に高いクエン酸耐性を示すことは無かったが、33℃及び 35℃では他の株より高い耐性を示した。しかし、その差が観察されたクエン酸濃度は実際の黒麹もろみ中の酸濃度(0.4%程度)よりもずっと高かった。このことは泡盛酵母でなくとも他の酵母でも十分に高いクエン酸耐性があること、また泡盛醸造に使用出来ることを示している。また 101-18 株は 5%NaCl 添加培地で良い生育を示したことから、塩耐性を持つことが示された。泡盛酵母が他の酵母には無い特徴を持っていることが明らかになった。

Saccharomyces cerevisiae, Awamori, salt tolerance

講演番号：3A21p03
講演日時、会場：3 月 28 日 14:22～ A 校舎 21 会場

醸造酵母における接合可能株の効率的スクリーニング法の開発

Development of an efficient screening method for isolation of mating competent cells from brewer's yeast.

○太田 拓[1]、金井 圭子[1]、西村 久美[1]、吉田 聡[2]、善本 裕之[1]、小林 統[1] ([1]キリン・酒類研、[2]キリン・基盤研)
○ Taku OTA[1], Keiko KANAI[1], Hisami NISHIMURA[1], Satoshi YOSHIDA[2], Hiroyuki YOSHIMOTO[1], Osamu KOBAYASHI[1] ([1]Kirin Co. Ltd., Res. Lab. for Brew. Tech., [2]Kirin Co. Ltd., Central Lab. for Key Tech.)

【背景】

酵母の交雑育種は優良形質の集積に有効と考えられるが、技術的な困難さがあり、醸造酵母、特にビール酵母の育種にはほとんど適用されてこなかった。ビール酵母の交雑育種が困難であるのは、接合可能な a 型細胞、α 型細胞の取得効率が著しく低いことに起因する。これまでに我々は、HO エンドヌクレアーゼを利用した醸造酵母への接合能付与法を報告したが(1)、一過的に遺伝子組換えを利用するため、実用化には課題があった。今回我々は、突然変異により醸造酵母の細胞集団中にわずかに出現する接合可能株を、遺伝子組換えを行わずに効率的に検出・単離する方法を開発した。

【方法・結果】

接合可能株は性フェロモンを分泌するという性質に着目し、性フェロモンで増殖が阻害される性フェロモン感受性株（*Δsst2* もしくは *Δbar1*）をテスターとして用いた。まず「スクリーニングに供する醸造酵母」および「低温感受性かつ性フェロモン感受性株（CSPS 株：Cold-Sensitive and mating Pheromone-Sensitive）」の混合液をトップアガーに包埋して寒天培地に植菌し、CSPS 株が生育できない低温下（18℃）で培養した。醸造酵母のコロニーが形成した後、培養温度を 30℃に上昇させ CSPS 株をプレート一面に生育させた。すると、接合可能株のコロニー周囲には性フェロモンが分泌されるため、CSPS 株は生育できずリング状のハロが形成された。このハロを指標として、異質四倍体である下面発酵酵母の胞子集団から a 型、α 型両方の接合可能株を単離することができた。接合可能株の出現頻度は株によって異なり、出現する接合型にも偏りが見られた。さらに同様の方法で、二倍体の上面発酵酵母、清酒酵母等の醸造酵母から、胞子形成を経ずに接合可能株を単離できた。このことより本手法によれば、胞子形成頻度が著しく低い株にも、交雑育種が適用可能であると考えられた。また本手法は、1 枚の培養プレート（直径 15 cm）で、10^4 個のコロニーを同時に評価できた。

以上の結果のとおり、植菌・培養という非常に簡便な操作のみで、接合可能株を効率的に検出するための新たな方法を開発した。単離した接合可能株は遺伝子組換えを利用していないため、それを用いた交雑株は実用に供することができる。本技術は、これまで制限されていた醸造酵母間の交雑育種の有効なツールとなり、様々な醸造酵母の好ましい形質を合わせ持つ酵母株を作出することで、新たな酒類開発や生産効率化に貢献することが期待される。

(1) 小林ら, 2010, 酵母遺伝学フォーラム第 43 回研究報告会（奈良）

crossbreeding, mating, brewer's yeast

講演番号：3A21p04
講演日時、会場：3 月 28 日 14:33～ A 校舎 21 会場

交雑育種による下面発酵酵母菌株の作出と醸造形質の評価

Fermentation performance of bottom-fermenting yeast strains constructed by crossbreeding.

太田 拓[1]、金井 圭子[1]、西村 久美[1]、吉田 聡[2]、善本 裕之[1]、○小林 統[1] ([1]キリン・酒類研、[2]キリン・基盤研)
Taku Ota[1], Keiko KANAI[1], Hisami NISHIMURA[1], Satoshi YOSHIDA[2], Hiroyuki YOSHIMOTO[1], ○Osamu KOBAYASHI[1] ([1]Kirin Co. Ltd., Res. Lab. for Brew. Tech., [2]Kirin Co. Ltd., Central Lab. for Key Tech.)

【背景】

異質四倍体である下面発酵酵母（*Saccharomyces pastorianus*）は、倍数性のため突然変異育種が困難である。また交雑育種に関しても、接合可能な胞子の出現頻度が著しく低いため、適用は困難であった。そのため優良菌株の獲得には、遺伝資源保存機関等から収集した有限個の株よりなる酵母バンクから、目的の形質を持つ株の選抜に頼るのが一般的である。しかしながら主要な下面発酵酵母は、少数の祖先より変異の蓄積によって株が分化したと考えられており、形質の変異幅は狭い。今回我々は、新たに開発された接合可能株を効率的に検出する方法を用い、異なる下面発酵酵母株間の交雑株取得に成功したので、これを報告する。

【方法・結果】

交雑育種法により、ビール未熟臭の原因となるダイアセチルの低生成能と、バナナ様香気をもたらす酢酸イソアミルの高生成能を集積した下面発酵酵母株の作出を試みた。まず始めに、様々な交雑組合せから、目的の形質を持つ株の取得に最適な両親のスクリーニングを実施した。この過程では、効率的にスクリーニングを行なうため、接合型変換に関与する HO エンドヌクレアーゼ遺伝子の発現用プラスミドを利用した。こうして、ダイアセチル低生産性の親株 KY2645 と、酢酸イソアミル高生産性の親株 KY1247 を選抜した。続いて実用化を考慮し、新規に開発した遺伝子組換えを利用しない方法により、接合可能株の単離を実施した。選抜した親株の胞子集団のスクリーニングを実施したところ、KY2645 株からは a 型株を 18 株、KY1247 株からα型株を 12 株、それぞれ単離することができた。これらを異なる組み合わせで接合させ、合計 146 株の交雑株を取得した。交雑株であることは SNPs により確認した。これらの株の中から、ラボスケールの発酵試験により選抜された優良株について、パイロットファーメンターにて醸造特製の評価を行なったところ、親株並みの低ダイアセチルかつ高酢酸イソアミル生成能を持ち、その他の醸造特性も良好な株が 2 株見出された。以上の結果より、異なる株に由来する優良形質を蓄積した下面発酵酵母の取得に、交雑育種法は有効な手段であることが示唆された。本報告は、異なる下面発酵酵母株間の交雑株を、遺伝子組換え技術不使用で取得した初めてのものである。また、交雑育種の過程で明らかになったこれらの醸造形質の遺伝様式についても合わせて報告する。

brewer's yeast, crossbreeding, fermentation performance

講演番号：3A21p05
講演日時、会場：3 月 28 日 14:44～ A 校舎 21 会場

ビール酵母の流加培養法の開発

Development of the fed-batch culture of brewing yeast

○藤原 広樹、高橋 文、川久保 武、吉崎 成洋、吉田 聡、小山内 栄一、櫟 友彦（キリン株式会社）
○Hiroki FUJIWARA, Aya TAKAHASHI, Takeshi KAWAKUBO, Shigehiro YOSHIZAKI, Satoshi YOSHIDA, Eiichi OSANAI, Tomohiko ICHII (Kirin Company, Limited)

ビール酵母の培養は、小規模な試験管から大規模な培養タンクまでスケールアップを繰り返して行なわれ、各培養ステップで麦汁を使用している。この培養工程には多くの時間と手間を要する。またスケールアップに合わせて麦汁を必要とするため、仕込タイミングの制約を受けるという課題がある。そこで、これらの課題を解決すべく技術開発を行なった。
これまでの検討で、亜鉛含量が増加した麦汁を用いた高濃度培養を行なうことにより、ビール品質を担保しながら培養ステップを削減できることが分かっていた。しかし、培養工程の抜本的改善のためには、さらなる高効率培養によって培養ステップを大幅に削減し、また培養に麦汁を必要とする点を解消する必要があった。
そこで、パン酵母の培養に用いられている流加培養法に着目し、流加培養を用いたビール酵母の培養に取り組んだ。パン酵母培養においては、廃糖蜜を流加して糖濃度を低い濃度に保つことで発酵によるエタノール蓄積を避け、高濃度で酵母を培養することが可能である。この、廃糖蜜を用いた流加培養によりビール酵母の培養を行なった結果、従来法の約 10 倍以上の濃度まで酵母を増殖できることが明らかとなった。
さらに、廃糖蜜はハンドリングおよび品質の面で課題があるため、これを液糖等で代替するための検討を行なった。この結果、ビール工場での流加培養法の実施に適した、廃糖蜜を使用しない代替培地を新たに開発した。

brewing yeast, fed-batch culture, fermentation

講演番号：3A21p06
講演日時、会場：3 月 28 日 15:05～ A 校舎 21 会場

ビール醸造用ラガー酵母およびエール酵母の DMSO reductase の比較について

Comparisons of DMSO reductase in Lager Yeast and Ale Yeast

○金内 誠[1]、菅井 竹彦[1]、畑中 咲子[1,2]、Charles Bamforth[3] ([1]宮城大食産、[2]宮城産技センター、[3]UC Davis)
○Makoto KANAUCHI[1], Takehiko SUGAI[1], Sakiko HATANAKA[1,2], Bamforth Charles[3] ([1]Miyagi Univ., [2]Indust.Technol.Instit. Miyagi, [3]UC Davis)

【目的】ビール醸造において、硫化化合物は品質の良し悪しを決定する。特にラガービールにおいて、酵母が発酵中に生成する DMS（dimethyl sulfide）が、80ppb 以上含有すると、茹キャベツ様やトウモロコシ様、青海苔様などの香気を有するため、ビールにとっての不快香を呈し、品質を低下させる。一方で、25ppb 以下では、ラガービールの特徴香として製品特性となる。DMS 生成には、麦芽中の S-methylmethionine が関与し、麦汁のマッシング中に酸化反応を受け、DMSO（Dimethyl sulfoxide）が生成する。さらに DMSO は酵母の発酵中に還元され、DMS となる。酵母による DMSO の還元は DMSO reductase によることは知られているが、酵母間での酵素学的検討はない。そこで、本研究では、DMSO reductase 活性の強い実用ラガーおよびエール酵母を選択し、それぞれから、本酵素を精製し、至適 pH、温度、さらに基質である DMSO と NADPH について反応速度論的検討も行った。
【方法】10%glucose を含む glucose-salt 培地（10 L）にあらかじめ同組成にて培養させたラガー酵母およびエール酵母を接種し、15℃で、３日間培養させた。菌体を遠心分離し、ガラスビーズと乳鉢で菌体破砕し、2mM DTT、2mMEDTA を含む 50mM phosphate buffer（pH 7.0）で抽出し、粗酵素液とした。粗酵素液を 50－80%飽和となるよう硫酸アンモニウム分画を行った。これを透析後、陰イオンクロマトグラフィーおよびゲルろ過クロマトグラフィーにて精製した。活性測定は、チオレドキシンと NADPH を用いる反応系で行った。すなわち、粗酵素液(20μL)は、1 mM NADPH、2mM DMSO、100μM Thioredoxin、10mM EDTA、10uM DTT、10mU Thioredoxin reductase を含む 50mM phosphate Buffer（pH 6.0）200μL に加え、吸光度 340nm を測定し、消費した NADPH を求めた。この時、酵素力価は DMSO-Thioredoxin reductase システムによって DMSO を DMS に要する NADPH 量（mM）と定義した。
【結果および考察】実用酵母の中で、DMSO を DMS に変換する能力が高いラガー酵母とエール酵母を選抜した。それぞれ 100(mg/L)の DMSO 含む培地で培養させると、1.1～1.7 倍活性が上昇した。これら酵母から抽出した粗酵素を塩析後に、各種クロマトグラフィーで精製したところ、ラガー酵母、エール酵母とも 2 つのアイソザイムが存在した。また、ラガー酵母の 2 つの DMSO reductase の分子量は、39,000Da～40,000 程度で、エール酵母の 2 つの酵素は、ともに 42,000 程度であった。既知の報告のものより分子量が大きく、新規なものであることが考えられた。ラガー酵母からの DMSO reductase の至適 pH は、6.5、エール酵母の DMSO reductase I の至適 pH は 6.0、II は 6.5 付近であった。これらの至適温度はいずれも 40℃であった。
ラガー酵母の DMSO reductase I、II の k_m はともに、エール酵母の２つのアイソザイムの k_m より小さく、特にラガー酵母の DMSO reductase II は、反応性に富んでいることが明らかとなった。

brewing yeast, DMSO reductase, dimethyl sulfide

講演番号：3A21p07
講演日時、会場：3 月 28 日 15:16～ A 校舎 21 会場

セルフクローニング法によるジメチルトリスルフィド（DMTS）前駆物質低生産性酵母の育種

Breeding of sake yeast with low productivity of dimethyl trisulfide (DMTS) precursor using self-cloning method

○池田 優理子[1]、森吉 雄太[1,2]、神田 涼子[1]、磯谷 敦子[1,2]、藤井 力[1]（[1]酒総研、[2]広島大院・先端研）
○Yuriko IKEDA[1], Yuta MORIYOSHI[1,2], Ryoko KANDA[1], Atsuko ISOGAI[1,2], Tsutomu FUJII[1]
([1]Natl. Res. Inst. Brewing, [2]AdSM, Hiroshima Univ.)

【背景・目的】ジメチルトリスルフィド（DMTS）は清酒の貯蔵劣化臭である老香の主要成分である。これまでの研究から、DMTS の主要前駆物質の 1,2-dihydroxy-5-(methylsulfinyl)pentan-3-one (DMTS-P1)の生成には、清酒酵母のメチオニン再生経路の *MRI1* および *MDE1* 遺伝子の関与が大きく、これらいずれかの遺伝子を破壊すると清酒の DMTS-P1 濃度および DMTS 生成ポテンシャル（70℃・1 週間の貯蔵で生じる DMTS 生成量）が大きく減少することが明らかとなっている。本研究では、実用可能な DMTS 前駆物質低生産酵母を育種するアプローチの一つとして、セルフクローニング法による清酒酵母の *MRI1* 遺伝子破壊株の作成と破壊株における醸造特性の検討を行った。
【方法】*MRI1* 遺伝子のセルフクローニングによる破壊株（*MRI1*-SC 株）は、清酒酵母きょうかい 901 号（K901）を親株にし、その *MRI1* 配列の途中にストップコドンが生じるように点変異を導入することによって作成した。マーカー除去型ベクターpAUR135 に *MRI1* 配列を挿入した後 PCR により点変異を生じさせ、酢酸リチウム法により K901 を形質転換した。得られた形質転換体は、抗生物質オーレオバシジンでスクリーニングし、ガラクトース培地でベクター配列除去株を選抜した後、PCR とサザンハイブリダイゼーションによるプラスミド配列のチェック、シークエンスによる *MRI1* 遺伝子内の点変異の確認を行った。K901 は 2 倍体であるため、形質転換の手順は 2 回繰り返し、2 つの *MRI1* 遺伝子両方に点変異の生じた株を取得した。また、得られた *MRI1*-SC 株を用いて清酒小仕込み試験を行い、発酵過程、清酒の一般成分、DMTS-P1 濃度、DMTS 生成ポテンシャルの分析を行った。
【結果】K901 における *MRI1*-SC 株は 8 株得られ、小仕込み試験の結果、*MRI1*-SC 株と親株の間で、発酵過程および一般成分については大きな違いは見られなかった。一方、*MRI1*-SC 株では DMTS-P1 の生成はほとんどみられず、DMTS 生成ポテンシャルも親株に比べて著しく低減した。これらのことから、セルフクローニング法を用いることで、醸造特性は親株と変わらないが、DMTS 前駆物質低生産性である酵母を作成することができ、清酒の貯蔵による DMTS の生成を大幅に抑制できることが明らかとなった。

DMTS, self-cloning, sake yeast

講演番号：3A21p08
講演日時、会場：3 月 28 日 15:27～ A 校舎 21 会場

焼酎粕の *S*-アデノシルメチオニンと葉酸の含量調査及び高含有要因の解析

Contents of *S*-adenosyl methionine and folate in Syouchu distillation remnants

○上佐古 大貴[1,2]、森本 朋子[2]、吉田 聡子[2]、福家 成美[2]、向井 伸彦[2]、山田 修[2]、藤井 力[1,2]([1]広島大院・生物圏、[2]酒総研)
○Daiki UESAKO[1,2], Tomoko MORIMOTO[2], Satoko YOSHIDA[2], Narumi FUKE[2], Nobuhiko MUKAI[2], Osamu YAMADA[2], Tsutomu FUJII[1,2] ([1]Hiroshima Univ., [2]NRIB)

【目的】焼酎の製造では、芋、麦などに水と麹・酵母を加えて発酵させた醪を蒸留し、製品である焼酎を得るが、このとき残った固形物を含んだ液体が焼酎粕である。つまり、焼酎粕は麹や酵母による発酵食品とも言える。我々はこれまで、清酒粕には、*S*-アデノシルメチオニン(SAM)や葉酸といった機能性成分が多く含まれることを明らかにしてきた。一方、焼酎粕についてどのような機能性成分がどれだけ含まれているかを幅広く焼酎粕を収集し調査した例は少ない。そこで、原料や製造法の異なる様々な焼酎粕を収集し、SAM と葉酸の含有量を調査するとともに、成分を高含有していた焼酎粕については、その要因を解析した。

【方法・結果】焼酎製造場 23 社より泡盛、芋焼酎、麦焼酎などの代表的な焼酎粕で、蒸留方法や麹・酵母の種類の異なるものを 40 点収集し、SAM・葉酸含量を測定した。収集した焼酎粕は遠心分離機で固液分離し、固形部は凍結乾燥の後、破砕して乾燥粉末とした。乾燥粉末から SAM・葉酸を抽出し SAM はキャピラリー電気泳動、葉酸は HPLC で分析した。液部は希釈しキャピラリー電気泳動と HPLC で SAM・葉酸含量を測定した。

SAM 含量について分析したところ、常圧蒸留した焼酎粕では検出されなかったが、減圧蒸留の焼酎粕からは検出された。最も高い含量のものは酒粕焼酎粕の 101.9 mg/100g-乾燥固形部であり、含水率を清酒粕並の 50%で計算すると、清酒粕の平均含量と同程度、食品上位の SAM 含量である豚レバーの 28 倍の含量だった。酒粕焼酎粕は焼酎酵母ではなく清酒酵母を使用している。現在、清酒酵母を使用した焼酎粕で SAM 含量が高くなるのか検証している。

葉酸含量について分析したところ、芋焼酎粕とそば焼酎粕が他の種類の焼酎粕に比べて多く葉酸を含んでいることが分かった。固形部で最も高含有していたのは芋焼酎粕の 934 μg/100 g-乾燥固形部であり、含水率 50%で計算すると、50 g の摂取で厚生労働省の設定する成人一日あたりの推定平均必要量 200 μg を摂取できる含量だった。液部で最も高含有だったのはそば焼酎粕の 101 μg/100 ml で、飲料では最も高含有である玉露の 67%の含量であり、100 ml の摂取で一日の推定平均必要量の半分を摂取できる含量だった。葉酸は SAM とは違い一般の食物にも含まれる。そこで、現在、原料に含まれる葉酸が焼酎粕の葉酸含量にどのくらいの寄与があるか解析している。

〔本研究は日本酒造組合中央会「単式蒸留焼酎に係る受託調査研究」として行った。〕

S-adenosyl methionine, folate, syouchu distillation remnants

講演番号：3A21p09
講演日時、会場：3 月 28 日 15:38～ A 校舎 21 会場

S-adenosyl-L-methionine を生産する *Saccharomyces cerevisiae* の代謝フラックス解析
^{13}C-metabolic flux analysis in *S*-adenosyl-L-methionine production by *Saccharomyces cerevisiae*
○早川 謙嗣[1,2]、梶畠 秀一[1]、松田 史生[1]、清水 浩[1] ([1]阪大院・情報・バイオ情報、[2]阪大院・工・カネカ基盤技術協働研究所)
○Kenshi HAYAKAWA[1,2], Shuichi KAJIHATA[1], Fumio MATSUDA[1], Hiroshi SHIMIZU[1] ([1]Osaka Unv., [2]KANEKA Fundamental Technology Research Alliance Lab., Osaka Unv.)

【目的】*S*-Adenosyl-L-methionine (SAM) は、機能性食品素材や肝機能障害などの医薬品として利用されている。出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* が工業生産用の宿主であり、特に清酒酵母の SAM 蓄積量は、20 mg g DCW^{-1} に達するが、SAM 高生産に関与する代謝制御機構には不明な点が多い。SAM 生産には、中央代謝経路から供給される前駆体（オキサロ酢酸とリボース-5-リン酸）と、還元力（NADPH）とエネルギー（ATP）分子が必要である。そこで、^{13}C 標識炭素を用いた代謝フラックス解析（^{13}C-MFA）を行い、実験室酵母 S288C 株と SAM 高生産能力を有する清酒酵母協会 6 号株の中央代謝経路の代謝フラックス分布を比較した。
【方法】出芽酵母 S288C 株および協会 6 号株を、各種ビタミン・金属塩濃度を調整した改良 YNB (Yeast nitrogen base) 培地で前培養し、好気条件において同培地で連続培養を行った。培養が定常に達した後に、^{13}C 標識グルコース含有培地に切り替え、50 時間（希釈率：0.1h^{-1}）経過後の菌体を回収した。タンパク質を 6 *N* 塩酸で加水分解後、*N*-(*tert*-butyldimethylsilyl)-*N*-methyl-trifluoroacetamide で誘導体化し、アミノ酸の ^{13}C 標識パターンを GC-MS 分析により決定した。代謝フラックス分布は、専用ソフトウェア OpenMebius (Kajihata et al., 2014)で推定した。
【結果と考察】代謝フラックスとは、細胞内の各代謝反応を流れる化合物量(mol g CDW^{-1} h^{-1})であり、^{13}C 標識炭素源を用いたトレーサー実験と計算機による解析を組み合わせた ^{13}C-MFA 法で測定できる。そこで、^{13}C 標識グルコースを炭素源として S288C 株および協会 6 号株の連続培養を行い、得られた菌体中アミノ酸の ^{13}C 標識パターンを GC-MS で測定した。また培地中成分を定量し、グルコース消費、エタノール生産などの比速度を求めた。これらの実測データをもっともよく説明できる代謝フラックス分布を推定した。その結果、協会 6 号株では、TCA 回路の代謝フラックスレベルが、S288C 株と比較して増加していることが明らかとなった。また、代謝フラックスデータから細胞内の ATP 収支を計算すると、協会 6 号株では、酸化的リン酸化活性が増加して、細胞増殖の必要量より過剰な ATP が生産されていた。これらの結果から、協会 6 号株の SAM 高生産には、TCA 回路フラックスと呼吸活性の増加による ATP 再生能の向上が関与していると推定された。また、SAM 培養生産性を向上させるためには、培養中に高呼吸活性を維持することが重要な因子となると示唆された。

^{13}C-based metabolic flux analysis, Central carbon metabolism, *Saccharomyces cerevisiae*

講演番号：3A21p10
講演日時、会場：3 月 28 日 15:49～ A 校舎 21 会場

出芽酵母遺伝子破壊株における中心代謝酵素発現量の変化
Profiling of central metabolism related enzymes in Saccharomyses cerevisiae
○松田 史生[1]、小倉 泰郎[2]、富田 淳美[1]、平野 一郎[2]、清水 浩[1] ([1]大阪大情報、[2]島津製作所)
○Fumio Matsuda[1], Tairo Ogura[2], Atsumi Tomita[1], Ichiro Hirano[2], Hiroshi Shimizu[1] ([1]Osaka Univ., [2]Shimadzu Co.)

【目的】出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の中心炭素代謝では各酵素の発現量調整を通じて高いグルコース資化能力を実現していると考えられている。そこで酵素発現量調整機構の解明を目指し、酵素遺伝子の破壊株 29 株について定量プロテオーム解析を行い、中心炭素代謝に関与する酵素遺伝子の発現量変化を解析した。
【方法】出芽酵母 S288C 株、および 1 遺伝子破壊株 (BY4742 由来)を非標識または[U-^{13}C]グルコース含む SD 培地(100 mL)で回分培養した。菌体を回収後、抽出したタンパク質のトリプシン消化物を nanoLC-ultra fast mass spectrometry (Prominence nano+LCMS-8040)を用いて分析した (カラム: L-column C18, 0.1*150mm, 移動相:アセトニトリル／水／ギ酸、流量: 400 nl/min、ESI ポジティブイオンモード、検出：MRM)。文献データを元に 205 タンパク質を測定する MRM 条件(3062 ch)を作成した (Picotti et al, Mol. Syst. Biol. (2011))。各ペプチドの非標識体と[U-13C]標識体のピーク面積比から相対タンパク量を求めた。データ解析には Skyline ver 2.5 を用いた。
【結果と考察】出芽酵母で発現している 100 以上の中心炭素代謝酵素を一斉分析可能な定量プロテオミクス法を用いて、1 遺伝子破壊株 29 株の酵素プロファイルの変化を解析した。例えば、*Idh1* 遺伝子の欠損変異株では、Idh1p の含量が検出限界以下になるのに対し、その機能ホモログである Idh2p の発現量が野生株に比べ 2 倍以上増加していた。同様に *Hxk2* 欠損変異株では Hxk1p の発現量が 4 倍程度向上していた。機能相補的な発現調節に加え、*Hxk2* 欠損変異株では Kgd2p, Mdh1p、Ald4p, Ald5p などの発現量が顕著に増加しており、未知の代謝制御機構により大域的な代謝酵素量の変化が起きていることが明らかとなった。さらにピアソン相関を計算し、発現量変動が 29 破壊株間で類似した酵素のネットワークを構築したところ、アミノ酸生合成および解糖系に関わる酵素のクラスターが観察された。これらの結果から、酵母では局所的な酵素発現調節に加え、解糖系のグローバルレギュレーターなどが大域的な代謝酵素発現制御に寄与していると推測された。本研究は NEDO 若手グラントの支援を受けた。

Targeted proteomics, Saccharomyces cerevisiae, Central metabolism

講演番号：3A21p11
講演日時、会場：3 月 28 日 16:10～ A 校舎 21 会場

長期継代培養によるエタノール非生産酵母の増殖改善株の取得

Growth-improvement of ethanol non-producing yeast by the long term experimental evolution

○森田 啓介[1]、富田 淳美[1]、松田 史生[1]、石井 純[2]、近藤 昭彦[3]、清水 浩[1] ([1]阪大院・情報・バイオ情報、[2]神戸大・自科・研究環、[3]神戸大院・工・応化)
○Keisuke MORITA[1], Atsumi TOMITA[1], Fumio Matsuda[1], Jun ISHII[2], Akihiko KONDO[3], Hiroshi SHIMIZU[1] ([1]Dept. Bioinfo. Eng., Grad. Sch. IST, Osaka Univ., [2]Org. Adv. Sci. Technol. Kobe Univ., [3]Dept. Chem. Sci. Eng., Grad. Sch. Eng., Kobe Univ.)

【目的】出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の代謝経路を改変して、様々な有用物質の高生産株を構築するには、エタノールの副生産を抑制する必要がある。これまで作成されたピルビン酸脱炭酸酵素、アルコール脱水素酵素を欠損させたエタノール非生産酵母株は増殖が非常に遅いことが知られており、また利用可能なアミノ酸要求性マーカーが乏しい。そこで本研究では、実験室酵母 YPH499 株よりピルビン酸脱炭酸酵素を欠損した酵母株を新たに作成し、実験室進化で増殖速度を改善した株を取得することを試みた。

【方法】*S. cerevisiae* YPH499 株 (*MATa ura3 lys2 ade2 trp1 his3 leu2*) を用いた。ゲノムからの DNA 断片の削除には URA ブラスター法を用いた。実験室進化では、5 mL の SD 培地＋アミノ酸培地を用い、初期 OD_{660} を 0.1 として、30℃、150rpm で培養を行った。24 時間おきに濁度を測定し、定常に達した菌体を回収して、新しい培地に継代した。取得した増殖改善株をシングルコロニー化した。培溶液中に含まれるアルコール濃度の測定にはガスクロマトグラフィーを用いた。

【結果】複数のアミノ酸要求性を有する実験室酵母 YPH499 株の *MTH1* 遺伝子に変異を導入し、さらに *PDC1, PDC5, PDC6* 遺伝子を欠損させた YSM021 株 (YPH499/*pdc1Δpdc5Δpdc6ΔMTH1-ΔT*) を構築した。この株を初期 OD=0.1 で SD 培地を用いて微好気条件下で培養したところ、培養開始 240 時間後に OD_{660}＝0.9±0.1 で増殖定常に達した。これは親株である YPH499 に比べ (開始から 72 時間で到達 OD_{660}＝2.4±0.1)に比べて著しく低かった。YSM021 株を用いて 145 日間の長期継代培養を行ったところ、継代開始 60 日後から増殖速度の向上が見られた。継代途中（75 日目）および終了時（145 日目）の培養菌体のストックからシングルコロニー化した株を複数取得した。培養試験を行った結果、すべての株がおよそ 120 時間で定常に達し、到達 OD_{660} も 1.8～2.5 まで増加していた。また、培養開始 72, 120 時間後の培地組成をガスクロマトグラフィーで調べたところ、すべての株でエタノール生産は見られなかった。本研究の一部は NEDO 若手グラントの支援を受けた。

Saccharomyces cerevisiae, Ethanol, Experimental evolution

講演番号：3A21p12
講演日時、会場：3 月 28 日 16:21～ A 校舎 21 会場

ワイン酵母におけるアルコールストレス応答の解析

Study of alcohol stress response in wine yeast strains

○山本 航平[1,2]、五島 徹也[1]、渡邉 大輔[1]、下飯 仁[1,2]、赤尾 健[1,2]、福田 央[1] ([1]酒総研、[2]広島大院・先端研・分子生命)
○ Kohei YAMAMOTO[1,2], Tetsuya GOSHIMA[1], Daisuke WATANABE[1], Hitoshi SHIMOI[1,2], Takeshi AKAO[1,2], Hisashi FUKUDA[1] ([1]NRIB, [2]Hiroshima Univ.)

【目的】多くの醸造用酵母は高いアルコール発酵能を有しているが、そのメカニズムは十分に理解されておらず、永年の謎であった。最近、我々はきょうかい 7 号などの優良清酒酵母において、Rim15p などにより構成されるストレス応答系シグナル伝達経路の欠損を見出し、エタノールストレス条件下でもストレス応答による発酵速度の低下が起こらないことが、優良清酒酵母の高アルコール生成の一因であることを明らかにした。ところで、ワイン醸造の場合、最終アルコールは 14%程度とやや低いが、実用ワイン酵母の中には清酒酵母並みの発酵力を有するものが知られている。本研究では、ワイン酵母の高発酵能に注目し、優良清酒酵母のようなストレス応答経路の機能欠失の関与の有無について解析を行うこととした。

【方法・結果】ワイン酵母のストレス耐性について調べるため、現在広く使用されているワイン酵母約 20 菌株について、18%アルコールに対する急性ストレス耐性試験を行った。その結果、菌株によりストレス耐性の程度に差が見られた。そこで、ストレス耐性の低かった株を中心に、*RIM15* 遺伝子の塩基配列を解析したところ、ストレス耐性が特に低かった 2 株（OC2 及び KW1）では、C667T のナンセンス変異により C 末端側を大きく欠失し、ストレス耐性における機能を失っていた。そこで、Rim15p の機能欠失とストレス耐性及び発酵力との関係について検討するため、OC2 に正常型 *RIM15* を導入したところ、18%アルコールへの耐性は大きく向上したが、発酵力の低下はわずかであった。一方、アルコール耐性が高く正常型 *RIM15* を有する EC1118 株の *RIM15* を破壊したところ、アルコール耐性は有意に低下したが、発酵力への影響はほとんど見られなかった。更に、ワインのアルコール濃度のほぼ上限値である 14%では、Rim15p の機能欠失は酵母の生存性に影響しなかった。現在、ワイン酵母の実際のストレス応答について解析するために、ストレス応答遺伝子群の転写誘導に関与するシス因子 STRE 及び HSE のレポーターアッセイを実施中である。今回の発表では、これらの結果を含めて、醸造環境（ストレス）と発酵力の関係について議論したい。

wine yeast, alcoholic stress response, alcoholic fermentation

講演番号：3A21p13
講演日時、会場：3 月 28 日 16:32～ A 校舎 21 会場

ピルビン酸低減清酒酵母の実地醸造試験

Plant tests of low pyruvate-producing sake yeast

○澤田 和敬[1,2]、柘植 圭介[2]、吉村 臣史[2]、鶴田 裕美[2]、稲橋 正明[3]、田口 誠我[4]、福崎 久詩[4]、北垣 浩志[1,4]([1]鹿児島大・連大農、[2]佐賀工技、[3]日本醸造協会、[4]佐賀大農)
○KAZUTAKA SAWADA[1,2], KEISUKE TSUGE[2], TAKASHI YOSHIMURA[2], YUMI TSURUTA[2], MASAAKI INAHASHI[3], SEIGA TAGUCHI[4], HISASHI FUKUSAKI[4], HIROSHI KITAGAKI[1,4] ([1]Kagoshima Univ., [2]Industrial Technology Center of Saga Pref., [3]Brewing Society of Japan, [4]Saga Univ.)

【目的】

近年、低アルコール清酒やスパークリング清酒などの新ジャンルの清酒は消費者の支持を受けており、これらのタイプの清酒を製造・販売する酒造メーカーは増加し、その市場は年々拡大している。

低アルコール清酒は、清酒酵母が発酵旺盛期のアルコール度数 10%前後で上槽するため、ピルビン酸が残存し、α-アセト乳酸を経てジアセチルに変換され、“つわり香”と呼ばれるオフフレーバーが発生しやすいという問題があり、発酵能を低下させることなくピルビン酸を低減する技術の開発が求められていた。

これらの問題を解決するため、我々は親株に協会 7 号を用い、ミトコンドリアへのピルビン酸輸送阻害剤であるα-トランスシアノ桂皮酸エチルへの耐性株を分離し、ジアセチルの生成量が低減させる酵母（以下、K7-TCR 株）を育種した。さらに、同様の手法を用い、熊本系吟醸酵母である F4 株を親株とした耐性株（以下、F4-TCR 株）を育種した。

そこで、本研究では K7-TCR 株及び F4-TCR 株の工場スケールの醸造適性を評価するために行った実地醸造試験について報告する。

【方法】

K7-TCR 株は総米 12kg の中規模スケールで、1 次発酵をタンクでアルコール 12%程度まで発酵させた後、瓶内 2 次発酵を行い、低アルコールスパークリング清酒の試験醸造を実施した。また、F4-TCR 株は純米酒を総米 1t のスケールで実施した。いずれの実地醸造も対照区に親株を用い、佐賀県内の酒造メーカーで実施した。

【結果】

K7 - TCR 株は、親株と同等の発酵能を示し、タンク 1 次発酵及び瓶内 2 次発酵後のいずれの区分においてもピルビン酸，α - アセト乳酸，ジアセチル濃度が低下していた。

同様に、F4-TCR 株も親株と比べ発酵能を低下させることなく、ピルビン酸及びα - アセト乳酸濃度の低減がみられ、製成酒の官能評価も二項検定により $p < 0.05$ で有意にさわやかな酸味を持っていた。

本研究で取得した協会 7 号酵母を親株としたピルビン酸低減酵母は平成 26 年 12 月より“きょうかい酵母　ピルビン酸低生産性酵母 7 号”として全国に頒布されている。

特許第 5413847 号（登録平成 25 年 11 月 22 日）；*日本醸造学会誌*, 106 (5), 323-331 (2011)；*生物工学会誌*、89 (5), 222-227 (2011)；*Biosci. Biotech. Biochem.* 74 (4), 843-847 (2010)

Sake, yeast, pyruvate

講演番号：3A21p14
講演日時、会場：3 月 28 日 16:43～ A 校舎 21 会場

オートファジー欠損清酒酵母の醸造特性解析

Brewing characteristics of autophagy-defective sake yeast

○佐田 尚隆、浅井 拓也、山下 伸雄、明石 貴裕（白鶴酒造）
○Naotaka Sada, Takuya Asai, Nobuo Yamashita, Takahiro Akashi (HAKUTSURU SAKE Brewing Co. Ltd.)

【目的】オートファジーはユビキチン・プロテアソーム分解系と並ぶ細胞内の主要なタンパク質分解系として知られる機構であり、ストレス条件、特に飢餓条件でオートファジーが強く誘導されることなどから、生物にとって生理的意義が極めて大きいと考えられている。一方、清酒醪は窒素源が少なく、かつ高糖濃度・高エタノール濃度といったストレス環境であることが一般的に知られていることから、我々は、清酒醪中で清酒酵母が活動を行う上でオートファジーは重要な機構のひとつであると考えた。そこで、清酒醸造における清酒酵母のオートファジーの意義を明らかにすることを目的として、オートファジー欠損清酒酵母の醸造特性解析を行った。
【方法および結果】きょうかい 701 号酵母（K701）のオートファジー遺伝子 *ATG1* を破壊し、オートファジー欠損清酒酵母 K701*atg1*Δを作製した。K701、および K701*atg1*Δの 2 つの試験区で総米 800 g の小仕込（精米歩合 70%、発酵温度 15℃）を行い、発酵中から製成酒までの各種成分値を比較した。その結果、K701 と K701*atg1*Δの間で発酵性に差は認められず、その他の分析値についても大きな差異はなかった。次に、上記試験よりも栄養源の少ない大吟醸仕込（精米歩合 50%、発酵温度 10℃）で試験醸造を行ったところ、K701*atg1*Δでは K701 に比べて発酵性がやや低下した。一方で、K701*atg1*Δでは酢酸エステル類（酢酸イソブチル、および酢酸イソアミル）が明瞭に増加していた。以上のことから、大吟醸仕込に代表されるような栄養源が枯渇しやすい条件においては、清酒酵母のオートファジーは良好な発酵を行うために重要な役割を担っていることが示されるとともに、オートファジー遺伝子群を新たな育種ターゲットとすることで、酢酸エステル高生産株をはじめとする有用清酒酵母を育種開発できる可能性が示唆された。

sake brewing, autophagy, acetate ester

講演番号：3A21p15
講演日時、会場：3 月 28 日 16:54～ A 校舎 21 会場

dinitrophenol 耐性清酒酵母による小仕込試験
Brewing characteristics by dinitrophenol resistant sake yeast strains.
○中山 俊一[1]、桑子 崇之[1]、高部 佳翼[1]、小杉 慎吾[1]、清 啓自[1]、満生 慎二[2]、門倉 利守[1]、中里 厚実[1] ([1]東農大・応生・醸造、[2]九産大・工・物質生命化学)
○Shunichi NAKAYAMA[1], Takayuki KUWAKO[1], Keisuke TAKABE[1], Shingo KOSUGI[1], Keiji KIYOSHI[1], Shinji MITSUIKI[2], Toshimori KADOKURA[1], Atsumi NAKAZATO[1] ([1]Tokyo Univ. Agric., [2]Kyushu Sangyo Univ.)

【目的】これまでに我々は、きょうかい酵母 K901 を親株として呼吸阻害剤 2,4-dinitrophenol（DNP）耐性株を取得することで、K901 とは異なる有機酸組成を示す株を多数取得した。グルコース 10%を含む YM 培地(YM10 培地)で発酵産物を測定したところ、得られた DNP 耐性株のほとんどはリンゴ酸高生産・酢酸低生産性を示したが、親株である K901 と比較してリンゴ酸生成量が低下した株や乳酸生成量が増加した変異株なども取得されている。本研究では、これら様々な変異株を用いて総米 160 g の小仕込試験を行い、有機酸生成量と香気成分について測定した。
【結果】YM10 培地で高リンゴ酸・酢酸低生産性を示す変異株 7 株と、それ以外の生成パターンを示す 8 つのグループから 10 株を選別し小仕込試験を行った。いずれの株も親株である K901 と同程度のアルコール生成能を示した。YM10 培地で高リンゴ酸・低酢酸生産性を示した変異株は、小仕込試験でも同様に K901 株に比べて高リンゴ酸・低酢酸生成能を維持していた。香気成分については特にカプロン酸エチル生成量が親株の 50%程度に低下していた。一方、それ以外の生成パターンを示す 10 株については、YM10 培地での有機酸組成と異なる結果を示す変異株も存在した。中でも、親株と比較して酢酸生成量が 50%、コハク酸生成が 70%に低下するが、酢酸イソアミルが 2 倍増加する DNPR70 や酢酸生成量が 80%、コハク酸生成が 83%に低下するが、カプロン酸エチルが 1.6 倍、酢酸イソアミルや酢酸イソブチルが 2 倍以上増加する DNPR88 等有機酸組成や香気成分が変化する変異株も存在した。呼吸阻害剤である DNP に耐性能を有し多様な有機酸組成を示すこれら変異株においてもミトコンドリア活性が変化している可能性が示唆される。これまでに有機酸組成とミトコンドリア活性は関連することが明らかになっているが、ミトコンドリア活性と香気成分についても何らかの関連があることが示唆される。

Sake yeast, Brewing characteristics, Fermentation products

講演番号：3A21p16
講演日時、会場：3 月 28 日 17:15～ A 校舎 21 会場

清酒酵母きょうかい 1 号の低生酸性変異株の育種

Breeding of low acid-productive variants from sake yeast Kyokai no. 1

○奥知 広次[1]、村上 智子[2]、五島 徹也[2]、赤尾 健[2]、福田 央[2] ([1]櫻正宗株式会社、[2]酒類総合研究所)
○HIROTSUGU OKUCHI[1], TOMOKO MURAKAMI[2], TETSUYA GOSHIMA[2], TAKESHI AKAO[2], HISASHI FUKUDA[2] ([1]Sakuramasamune Co.,Ltd, [2]National Research Institute of Brewing)

[背景・目的]

今日、清酒醸造に用いられている清酒酵母の菌株のほとんどは、きょうかい 7 号（K7）株に近縁の K7 グループと呼ばれる系統由来のものであり、遺伝的な多様性は大きくない。今後ニーズの多様化に合わせ清酒の酒質の多様化を図る観点からは、酵母の菌株の遺伝的多様性を増やしていくことも必要である。その場合、過去に利用されていた実績のある菌株を基に、自然突然変異を利用して、再度優良株を選抜していくのは一つの有効な方法と考えられる。櫻正宗の蔵から分離され、1906 年から頒布された K1 株は、後に変性により頒布中止となったが、発酵力が高いのが特徴である。ただし、K1 のエステル類の生成量は K7 グループと比較して低く、また、製成酒の酸度が高い傾向にある。そこで、まずは K1 の保存株から、自然突然変異による低生酸性変異株の取得を試みた。

[方法]

K1 を YPD 液体培地で培養後、YPD 寒天培地に塗布し、30℃で 1 日培養したものを WLN 寒天培地にレプリカした。生育してきたコロニーの中で、コロニー周辺の培地の青色から黄色の変化の少ないものを釣菌した。そして釣菌したものを YPD 液体培地に植菌し 30℃で培養し、9・18 時間後の pH を測定した。特に pH の変化が少なったものについて、更に YPD 液体培地で拡大培養し、2 日後に YPD 寒天培地に塗布した。これを 30℃で 1 日培養し WLN 寒天培地にレプリカした。このように WLN 寒天培地の色調変化・pH 変化の両方を指標とし K1 の低酸性候補株を取得し、それらの継代を繰り返すことで、より低生酸性の菌株の取得を試みた。得られた低生酸性候補株について、清酒小仕込みを行い、酸度のほか、各種成分値等を測定し、親株と比較した。

[結果]

WLN 寒天培地で色調変化の少ないコロニーを継代していった結果、20 株の低生酸性候補株を取得できた。それらの候補株について、精米歩合 70%の乾燥麹とα米を使用した総米 100g の仕込み試験を行った（ただし、品温は 15℃一定でもろみ期間は 20 日）。その結果、20 株中 5 株において、製成酒の酸度は対照（K7）と同程度まで低下していたが、アルコール分、日本酒度には K1 の元株ど同等かやや高めであった。有機酸分析の結果、乳酸、酢酸、リンゴ酸濃度の低下が観察されたほか、ピルビン酸も顕著に低かった。また、興味深いことに、元株と比較して、酢酸イソアミル濃度が約２倍に増加し、カプロン酸エチル濃度が 2/3 程度まで減少していた。

sake yeast Kyokai no. 1, low acid-productive variants, breeding

講演番号：3A21p17
講演日時、会場：3 月 28 日 17:26～ A 校舎 21 会場

優良清酒酵母からの新規な尿素非生産性菌株の育種

Isolation of non-urea producing sake-yeasts delivered from the superior sake-brewing yeasts, Kyokai-strains

○五島 徹也[1]、濱田 つかさ[1,2]、村上 智子[1]、福田 央[1]、赤尾 健[1,2] ([1]酒総研、[2]広島大院・先端研・分子生命)
○Tetsuya GOSHIMA[1], Tsukasa HAMADA[1,2], Tomoko MURAKAMI[1], Hisashi FUKUDA[1], Takeshi AKAO[1,2] ([1]NRIB, [2]Hiroshima Univ)

酒類に含まれるカルバミン酸エチルは、食の安全性に関する視点から関心がもたれているところである。一般に、清酒醸造の場合、酵母のアルギニン代謝で生成される尿素と酒類中のエタノールが化学反応することがカルバミン酸エチルの主な発生原因であり、火入れや貯蔵といった工程でのカルバミン酸エチルの生成量の増加が報告されている。つまり、カルバミン酸エチルの低減化には、清酒中の尿素濃度を低く抑えることが重要であることから、これまでにウレアーゼ処理による尿素の分解や低精米歩合の原料米の使用などの方法が報告されている。酵母に起因する尿素生成の低減には、アルギナーゼに異常がある変異株のみが生育する選択分離用培地による尿素非生産性酵母の育種方法が開発されている[(1, 2)]。他方、清酒醸造に使われる酵母は菌株ごとに醸造特性は異なるため、目的の酒質に適した菌株が使用されてきた。既に、醸造現場で使用されている清酒酵母から尿素非生産性菌株の育種が行われているものの、実用化されている菌株は少ないため、その醸造特性や遺伝的な情報に関して十分解明されたとは言い難い。

今回の育種は、醸造産業において製品の品質や安全性の向上の点から重要であり、発酵微生物の同定・識別技術（トレーサビィリティ）にも活用できることから、遺伝子マーカーとしてアルギナーゼ遺伝子*CAR1*に変異を有する尿素非生産性清酒酵母の網羅的単離を目的とした。複数系統の尿素非生産性菌株の単離により様々な酒質へ対応可能となり、さらに、その遺伝型や表現型の多様性から清酒酵母の新たな醸造特性が明らかとなることも期待される。

日本醸造協会から頒布されている清酒酵母菌株を親株として、上記の方法を用いて自然突然変異により新しく尿素非生産性酵母菌株を選抜した。現在、アルギナーゼ活性測定や変異点同定、清酒小仕込み試験などを実施し、遺伝子レベルの変異同定及び醸造特性の優秀な菌株を選抜している。今回は、新たに分離した尿素非生産性酵母菌株の醸造特性について発表する。

1. 北本勝ひこ, 宮崎佳緒子, 山岡洋, 五味勝也, 熊谷知栄子：醸協 **87**, 598-601 (1992)
2. 福田潔, 北本勝ひこ, 五味勝也, 熊谷知栄子：醸協 **88**, 633-638 (1993)

non-urea producing sake-yeast, ethyl carbamate, fermentation

講演番号：3A21p18
講演日時、会場：3 月 28 日 17:37～ A 校舎 21 会場

清酒のフェルラ酸およびフェルラ酸エチルレベルの変動要因について
Factors affecting on the level of ferulic acid and ethyl ferulate in sake
鈴木 伸和、廣嶋 魁、高野 康人、伊藤 俊彦、○橋爪 克己 (秋田県立大学生物資源科学)
Nobukazu Suzuki, Kai Hiroshima, Kouto Takano, Toshihiko Ito, ○Katsumi Hashizume (Akita Prefectural Univ.)

【目的】フェルラ酸エチル（FE）は、活性炭素未処理清酒に閾値を超えて存在し、甘味を伴った温和な苦味・渋味を呈するとともにフェルラ酸（FA）濃度の 1/5 程度清酒中に存在することで FA の苦味･渋味をマスクする好ましい機能を示す。演者らは清酒の FE 生成には麹のフェルロイルエステラーゼが関与することを明らかにし、清酒およびみりん醸造環境下におけるフェルロイルエステラーゼの触媒特性について報告している。しかしながら清酒の品質に影響を及ぼすと考えられる FE の生成並びに FE と FA の比率に影響を及ぼす要因の詳細については未解明であるため検討を行った。
【実験材料および方法】①平成 25 年度秋田県清酒品評会に出品された純米酒の FE および FA 濃度を測定しその関係を検討した。②清酒醸造用白米の蒸米を、フェルロイルエステラーゼ活性を持たない細胞壁構成多糖類分解酵素剤によって消化し、ODS カラムによってフェルラ酸結合成分を分画、調製した標品（白米由来基質）および FA の短鎖アルキルアルコールエステルを基質として酵素反応を行い、米麹酵素による清酒醸造環境下における FE と FA の生成について検討した。
【結果】①黄麹菌フェルロイルエステラーゼによる FE の加水分解反応は FA のエチルエステル化反応と比較して速く、pH が低下すると加水分解反応に対しエステル化反応が進みやすくなり、FA に対する FE の生成比率が上昇することが分かっている [1] が、調べた純米酒試料ではそのような関係は見られなかった。②白米由来基質と FA の短鎖アルキルアルコールエステルを基質として、それらの FA 含有濃度をそろえ清酒醪を想定した反応混液中で米麹抽出酵素による反応を行ったところ、白米由来基質の FA の遊離および FE 生成速度は短鎖アルキルエステル基質のそれらよりも 5 倍以上速かった。FA 遊離量に対するエチルエステル生成量の比率（FE/FA 比）は、白米由来基質とメチルエステル基質間では大きな差は見られなかったが、プロピルエステル基質では FE/FA 比は低くなった。両反応の pH 依存性を調べたところ、FA 遊離反応とエチルエステル生成反応の間に明確な差は見られず、至適 pH は白米由来基質では約 4.0、メチルエステル基質では約 4.5 であった。エチルアルコール濃度の影響を調べたところ、エチルエステル生成はアルコール濃度に依存して上昇し 19.0%では低下したが、加水分解反応はエチルアルコール濃度の上昇とともに低下した。その結果 FE/FA 比はエチルアルコール濃度にほぼ比例して上昇した。

参考文献(1) Hashizume et al. *J. Biosci. Bioeng.* 116, 2, 209-213 (2013)

sake, ferulic acid, ethyl ferulate

講演番号：3A21p20
講演日時、会場：3 月 28 日 17:59～ A 校舎 21 会場

メタボロミクスにより推定された清酒成分と官能評価との相関解析
Relationship between chemical compounds estimated by metabolomics and organoleptic properties of Japanese sake.
○高橋 圭[1]、土屋 文彦[2]、樺島 文恵[2] ([1]酒類総合研究所、[2]LECO ジャパン)
○kei takahashi[1], fumihiko tsuchiya[2], fumie kabashima[2] ([1]NRIB, [2]LECO Japan)

【背景と目的】吟醸酒は、洗練された味わいや吟醸香と呼ばれる果物のリンゴのような爽やかな香りを特徴とする清酒である。この吟醸香の前駆体である中鎖脂肪酸は、好ましくない香りとされ、官能評価では「脂肪酸臭・吟香崩れ・袋香」などと評され品質を損ねると考えられている。吟醸香それ自身も、吟醸酒に苦味を与えると清酒業界では信じられている。吟醸酒にはこの他にもオフフレーバーとされる香味の特徴があり、吟醸酒の品質の分析・管理はこれまで以上に注目されるようになってきているが、清酒の品質やオフフレーバーと清酒成分との関連性については、未だ不明な点が多い。そこで、本研究では、メタボロミクスを用いて、吟醸酒の脂肪酸臭、不調和苦味などを中心にオフフレーバーと清酒成分との関連性を明らかにすることを目的とした。
【方法】メタボローム解析に供する吟醸酒サンプルとして、平成 22 酒造年度(BY)新酒鑑評会出品酒を用い、定量解析に供する吟醸酒サンプルとしては平成 20~22BY の出品酒を用いた。官能評価データは、新酒鑑評会審査時の指摘数を用い、指摘項目等の疑似強度とした。清酒成分は、Oasis HLB 固層抽出で濃縮し、2-プロパノール/メタノールを用いて溶出した。揮発性成分網羅的分析には GCxGC-TOFMS; LECO Pegasus 4D-TOFMS を用い、データ解析には ChromaTOF ver4.50、JMP ver. 10.0.2 を用いた。吟醸酒の主要な揮発性成分の定量には GC-FID; 島津製作所 GC-17A ver.1, GC solution を用いた。
【結果】GCxGC-TOFMS により、吟醸酒の脂肪酸臭指摘と正の相関を示す化合物として中鎖脂肪酸、中鎖脂肪酸代謝化合物、長鎖アルカンなどが明らかとなった(文献 1)。吟醸酒の場合は、中鎖脂肪酸の中でもヘキサン酸が強く脂肪酸臭の認知に寄与していた。ヘキサン酸エチル（カプロン酸エチル）は、不調和苦味と正に相関しないことが分かったほか、官能評価により脂肪酸臭の認知をマスクする効果が見られた。清酒成分のメタボローム解析から、脂肪酸臭や不調和苦味に加えて、それら以外の香味・醸造条件の特徴(香気・味品質、カプロン酸エチル香、老香、生老香など)との関連性についても知見が得られたので、本大会で報告することとしたい。
文献 1　*J. Agric. Food Chem.,* 62, 33, 8478-8485. (2014)

Japanese sake, organoleptic properties, metabolomics

講演番号：3A32a01
講演日時、会場：3 月 28 日 09:00～ A 校舎 32 会場

細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* における *pks26* の機能解析
Fanctional analysis of *pks26* in *Dictyostelium discoideum*
○松本 郁加、齊藤 玉緒（上智大学・理工）
○Ayaka MATSUMOTO, Tamao SAITO (Faculty of Science and Technology, Sophia Univ.)

【目的】細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* は、利他行動を示す『社会性アメーバ』である。利他行動とは自己の損失を顧みずに他者の利益を図る行動であり、アリ、ミツバチを代表とする社会性昆虫の研究から発見された。しかし、このような社会性昆虫では分子生物学的解析ができないため、利他行動に関する研究は現在、数理学的なものに留まる状態である。一方、細胞性粘菌は利他行動を示すと共に、遺伝子操作法が確立しており、社会性昆虫では不可能であった分子生物学的解析が可能である。細胞性粘菌において、2008 年に利他行動関連遺伝子の大規模探索が行われた結果、いくつかの REMI mutant が得られた。その中で、*pks26* の REMI mutant は loser であると報告されている。そこで本研究では、*pks26* 遺伝子について解析を行うことで、利他行動に関連する機構及び物質を解明し、その分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。
【方法】*D. discoideum* を用いて *pks26* 遺伝子破壊株(*pks26*⁻株)を作製し、その表現型の解析を行った。また、野生株と *pks26*⁻株を混合した状態で発生させ継代し、全体に対する *pks26*⁻株の割合の変化を Q-PCR を用いて解析した。さらに、同じ条件での発生を、予定胞子細胞マーカー遺伝子である *cotB*、または予定柄細胞マーカーである *ecmA* のプロモーターによって制御された *LacZ* 遺伝子を導入した野生株を用いても行い、その蛍光及びβガラクトシダーゼ活性を測定することで、細胞型の比率を評価した。
【結果】Homologous recombination を用いて、*D. discoideum* を背景とする *pks26*⁻株を作製した。表現型の解析を行ったところ、野生株と *pks26*⁻株とでは、発生の過程において、その特徴に違いが見られることが分かった。また、野生株と *pks26*⁻株を混合し発生させた結果を、2 パターンのアプローチから解析したところ、*pks26*⁻株が存在すると、発生過程における *D. discoideum* の協調行動に異常が生じることが示唆された。以上より、*pks26* は利他行動に関連した遺伝子であり、その遺伝子破壊株が負うコストとして、*pks26*⁻株では野生株とは異なる表現型が観察されたのだと考えられる。今後は、この表現型の差異を生む原因について解析を進め、*D. discoideum* の利他行動に直接関わる物質の解明に繋げていきたい。

Dictyostelium discoideum, polyketide, altruistic behavior

講演番号：3A32a02
講演日時、会場：3 月 28 日 09:11～ A 校舎 32 会場

細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* における *O-methyltransferase 2* の機能解析
Functional analysis of *O-methlytransferase* in *Dictyostelium discoideum*
○菅 愛実子[1]、深澤 汐香[1]、北 圭人[1]、齊藤 玉緒[2] ([1]上智大院・理工、[2]上智大学・理工)
○Emiko SUGA[1], Kiyoka FUKAZAWA[1], Yoshihito KITA[1], Tamao SAITO[2] ([1]Graduate School of Science and Technology, Sophia Univ., [2]Faculty of Science and Technology, Sophia Univ.)

【目的】細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* が持つ新規のポリケタイド合成酵素 SteelyB は、発生中期から後期にかけて、産物の変換を行っているという仮説が立てられた。SteelyB が発生後期に関与しているとされる塩素化合物 Late Chlorinated Compounds(LCCs)の推定生合成経路から、メチル化に関与しているとされ、遺伝的解析が行われていない、*O-methyltransferase 2*(*omt2*)遺伝子に着目し、機能解析を目指した。
【背景】*D. discoideum* は、Ⅰ型 PKS とⅢ型 PKS が融合した、新規のポリケタイド合成酵素を 2 種類持つ。このうちの 1 つである SteelyB は、発生中期に、柄細胞分化誘導因子の 1 つである Differentiation Inducing Factor-1(DIF-1)の前駆物質を合成する。先行実験により、*stlB* 遺伝子は、DIF-1 が合成されない発生後期でも発現していることが示された。また、*stlB*⁻株に、DIF-1 または、DIF-1 の前駆物質を加えた実験では、発生後期、柄に蓄積することが知られている塩素化合物(LCCs)の合成が確認されなかった。加えて、発生時間ごとに、SteelyB の変化をみた先行実験では、発生後期にはⅢ型 PKS 部分のみが切り離されていることがわかった。以上の先行実験の結果から、*D. discoideum* 発生後期において、SteelyB はⅢ型 PKS 部分のみを切り離すことで、産物を変え、LCCs の合成に関与しているのではないかという仮説がたてられた。このことから、LCC 生合成への関与が予測される遺伝子の機能解析を行った。
【結果】主要な LCC の生合成経路が予測され、LCC の骨格が合成された後、メチル化は Omt2 によって行われていると予測された。LCC は発生後期に柄に蓄積することが知られていることから、*omt2* 遺伝子の発現時期・場所の解析を行った。*omt2* 遺伝子の Real time PCR による時間的発現パターンの結果、発生開始 3 時間後及び 21 時間後以降での発現が確認され、LCC が合成される時間に発現していることが確認された。また、GFP 導入株による空間的発現パターンの解析では、LCC 合成場所である柄での *omt2* 遺伝子の発現が確認された。この結果から、*omt2* 遺伝子の LCC 生合成への関わりが in vivo においても示唆された。更なる機能解析を試み、*omt2*⁻体の作製を行った。しかし、*omt2*⁻体での形態形成の異常から、発生初期の機能が形態形成に異常をきたすと考え、発生初期の機能に関しては、in vivo で、発生後期の機能に関しては、in vitro での解析を行うことにしたので、in vitro における再構成実験についてもあわせて報告したい。

Dictyostelium discoideum, *Polyketide*

講演番号：3A32a03
講演日時、会場：3 月 28 日 09:22～ A 校舎 32 会場

細胞性粘菌由来の分化誘導分子 4-methyl-5-pentylbenzene-1,3-diol(MPBD) の構造活性相関
Structural-Activity relationship study of 4-methyl-5-pentylbenzene-1,3-diol(MPBD), a differentiation inducing factor of the cellular slime mould
○近藤 杏奈[1]、岩崎 なつみ[2]、成田 隆明[1]、小倉 徹大[2]、村田 ちひろ[2]、臼杵 豊展[1]、齊藤 玉緒[1] ([1]上智大学・理工、[2]上智大院・理工)
○ ANNA KONDO[1], NATSUMI IWASAKI[2], TAKAAKI NARITA[1], TETSUHIRO OGURA[2], CHIHIRO MURATA[2], TOYONOBU USUKI[1], TAMAO SAITO[1] ([1]Faculty of Science and Technology, Sophia Univ., [2]Graduate School of Science and Technology, Sophia Univ.)

【目的】細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* において初めて発見されたⅠ型 PKS とⅢ型 PKS が融合した、新規のポリケタイド合成酵素 SteelyA の産物である 4-methyl-5-pentylbenzene-1,3-diol(MPBD) について、その構造と機能の関連を調べることを目的として、MPBD 修飾化合物を用いて、その構造と活性についての関連を検討することを目指した。また、有用物質探索の第一歩として MPBD および MPBD 修飾化合物の抗菌活性などを検討することを目指した。

【背景】細胞性粘菌 *D. discoideum* はそのゲノムの中に４５個ものポリケタイド合成酵素遺伝子を持ち、更にこれまでに報告のない新規ハイブリッド型ポリケタイド合成酵素である Steely 酵素を持つ。
4-methyl-5-pentylbenzene-1,3-diol(MPBD)は細胞粘菌の分化誘導分子として同定され、SteelyA 酵素の産物であることが示された。
MPBD の機能としては細胞性粘菌の発生初期段階では細胞集合を、発生後期においては胞子成熟を制御していることがこれまでの研究によりしめされた。細胞集合と、胞子形成という一見すると全く異なる発生段階を同一の分子がどのように制御しているのかを解析するため、MPBD および MPBD 修飾化合物を用いてその構造と活性の関連を明らかにすることを目指した。また、これまでに知られているポリケタイド生産者とは進化的に異なるグループに属するため新たな天然物資源と考えられる。そこで MPBD および MPBD 修飾化合物の抗菌活性を検討した。

【結果】MPBD の 1 部位をかえた、EtPBD, PrPBD, Me protected MPBD を用いて、*stlA* 遺伝子欠損株の胞子形成の回復を調べた。その結果 MPBD の芳香環の部分の修飾によって胞子回復が失われることが分かった。このことから胞子回復に関しては芳香環部分の構造が重要であることが考えられた。走化性の回復についてはそれぞれの化合物を用いて欠損株の走化性の回復を検討中であるのでこの点についてもあわせて報告したい。また、抗菌活性については MPBD 自体には抗菌活性はみられなかったものの、過学区修飾で抗菌活性を付与することができたので、これについてもあわせて報告したい。

Dictyostelium discoidium, Polyketide

講演番号：3A32a04
講演日時、会場：3 月 28 日 09:33～ A 校舎 32 会場

窒素源が *Fusarium graminearum* のトリコテセン系毒素産生制御におよぼす影響

Effects of nitrogen source on regulation of trichothecene production by *Fusarium graminearum*

○鬼頭 良幸、市川 雛代、前田 一行、中嶋 佑一、金丸 京子、小林 哲夫、木村 真 (名大院生命農)
○ Yoshiyuki KITOU, Hinayo ICHIKAWA, Kazuyuki MAEDA, Yuichi NAKAJIMA, Kyouko KANAMARU, Tetsuo KOBAYASHI, Makoto KIMURA (Graduate Sch. of Bioagric. Sci., Nagoya Univ.)

【目的】 *Fusarium graminearum* はトリコテセン系毒素を産生し、穀類に感染して甚大な被害をもたらす。これまでの種々の報告から、培地中の炭素源、窒素源、C/N 比が毒素産生に影響を与える大きなファクターとして知られている。例えば、炭素源としてグルコースを用いると毒素はほとんど産生しないが、スクロースを用いると毒素産生が強く誘導される。また、窒素源に関しては、アグマチンやプトレシンなどのポリアミンで毒素産生が強く誘導されることがわかっている。窒素欠乏条件で毒素が誘導されることもわかっているが、これには窒素代謝に関わるとされている *AreA* が関与しているためと考えられている。さらに pH も毒素産生の重要なファクターで、pH が低いと毒素が誘導され、高いと *Pac1* の働きにより抑制される。本研究では培地中の窒素源が毒素産生に及ぼす影響を評価するため、pH と窒素（アミン）量を経時的にモニターして pH 変化が同じになるように調整し、毒素量の推移を解析することとした。

【結果と考察】 *F. graminearum* JCM 9873 株を Czapek-Dox の塩（Gardiner et al. 2009）とグルタミン、アグマチン、硝酸塩それぞれを唯一の窒素源とする培地で培養したところ、アグマチンを窒素源とした培地において最も強い毒素誘導が観察され、硝酸塩では毒素産生が全く見られなかった。この際、培地の pH を計測したところ、どの窒素源でも初期 pH は 4.5 付近であり、24 h までは違いは見られなかったが、36 h から徐々に変化が見られた。グルタミンおよびアグマチンを窒素源とした培地ではそれぞれ最終 pH が 3.2 および 2.0 まで減少し、逆に硝酸塩では 6.4 まで増加した。アグマチンにグルタミンを等量加えた培地では加えない培地とほぼ同じ pH を示したが、毒素蓄積のタイミングが遅延したことから、アグマチンによる毒素誘導は窒素欠乏に起因することが示唆された。そこでアグマチン培地で培養した際と同様の pH 減少となるように pH を 2～8 時間ごとにモニターしながらグルタミンや硝酸塩を窒素源に用いた培養液に塩酸を加えて調整し、毒素量の変化を測定しているところである。またこの際、アミン蛍光誘導体化試薬 NBD-F を用いて培地中に残存しているアグマチンおよびグルタミンを定量することで、窒素消費速度の評価を試みている。さらに Δ*AreA* 株が利用できないことが判明している窒素源（ヒスチジン、イソロイシン等）のみを含む培地で野生株を培養し、毒素産生量を測定する予定である。

【謝辞】 本研究は農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業シーズ創出ステージ「ケミカルバイオロジーを基盤とした革新的な農薬等の探索研究」として行われているものである。

Nitrogen deficiency, Trichothecene, *Fusarium graminearum*

講演番号：3A32a05
講演日時、会場：3 月 28 日 09:44～ A 校舎 32 会場

出芽酵母レドックス代謝改変による酸化型グルタチオンの生産
Oxidized Glutathione Production by Improvement of Redox Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*.
○原 清敬、青木 直子、桐山 健太郎、近藤 昭彦（神戸大学）
○Kiyotaka HARA, Naoko AOKI, Kentaro KIRIYAMA, Akihiko KONDO (Kobe Univ.)

【目的】　グルタチオンは、抗酸化作用、解毒作用などの機能を持つトリペプチドである。細胞内では、酸化型グルタチオンは、グルタチオン還元酵素によって還元型グルタチオンに還元され、通常細胞内のグルタチオンは、ほとんどが還元型として存在している。一方で、グルタチオンを出芽酵母により工業生産しようとする場合、酸化型グルタチオンは還元型グルタチオンよりも安定性が高いという利点を有する。そこで、本研究では、出芽酵母を遺伝子組換えにより改変し、酸化型グルタチオンを高効率に生産する出芽酵母の創製を目的としている。
【方法】　ヒスチジン要求性を示す *Saccharomyces cerevisiae* YPH499 株のグルタチオン還元酵素遺伝子 *GLR1* をヒスチジン合成系の *his3* 遺伝子に置換し、ヒスチジン要求性の消失を指標に *GLR1* 破壊株を作製した。また、グルタチオン合成酵素遺伝子(*GSH1*、*GSH2*)および Sulfhydryl oxidase 遺伝子（*ERV1*、*ERV2*）、Thiol oxidase 遺伝子(*ERO1*）の各過剰発現は、出芽酵母にて発現の高いことが知られている解糖系 *PGK1* のプロモーターおよびターミネーターの間に目的遺伝子を挟み込む形でゲノム組み込みを行った。なお、グルタチオン濃度の測定は HPLC を用いて行った。
【結果】　GLR1 の破壊によって、細胞内の還元型グルタチオンが減少し、酸化型グルタチオンが増加したのに加え、ミトコンドリアの Inner membrane space に局在する *ERV1* および ER に局在する *ERO1* の過剰発現株では、酸化型グルタチオン含有量がさらに増加した。また、これらの変異株では、細胞内の酸化・還元バランスが大きく崩れていると考えられるが、細胞の増殖はほとんど変化しなかった。さらに、これらの変異株において、*GSH1* 及び *GSH2* を過剰発現させたところ、グルタチオンの総量が増加することで、酸化型グルタチオン含有量がさらに増加した。一方で、ER に局在する *ERV2* 遺伝子の過剰発現株では、酸化型グルタチオンの含有量に変化は無かった。

Glutathione, Redox, Yeast

講演番号：3A32a06
講演日時、会場：3 月 28 日 10:05～ A 校舎 32 会場

南極細菌由来 *Flavobacterium* 属細菌の不凍タンパク質の検索とその諸性質

Screening of antifreeze protein from Antarctic becteria, *Flavobacterium* and their properties.

○田中 里佳、比嘉 桜、河原 秀久（関西大化学生命工）
○Rika Tanaka, Sakura Higa, Hidehisa Kawahara (Kansai Univ.)

【緒言】地球上の生物圏のうち約 80%は、5℃以下の低温環境下にある。多くの低温生物は低温から身を守るために、体内にグリセロールやトレハロースを蓄積したりするほかに、ある特定の生物は、細胞内外に不凍タンパク質（AFP）を生産する戦略を獲得した。AFP は、氷結晶を制御できるタンパク質であり、氷結晶形態抑制活性、熱ヒステレシス活性(TH)、再結晶化抑制活性(RI)を有している。これまでに我々の研究室では南極細菌 *Flavobacterium xanthum* NBRC14972 が、細胞内に不凍タンパク質を蓄積し、そのタンパク質は分子量約 60,000 で、精製品 1.0 mg/ml で、TH 活性が 3.7℃の活性を示した[1)]。さらに有機酸により活性が上昇することも明らかになっている。その後、南極大陸より分離された *Flavobacterium* 属細菌の多くが報告された。これら新たに登録された *Flavobacterium* 属細菌の AFP の分布についての報告は少ない。そこで、本研究では、NBRC 保存菌株として登録されている *Flavobacterium* 属細菌種 5 種から AFP 活性をスクリーニングした。*F. xanthum* の細胞内型 AFP とは異なる AFP については分離精製し、性質を検討することにした。

【方法】TSB 培地(pH 7.0)を用いて、4℃、200 rpm で 7 日間培養を行った。その後、遠心分離後得られた菌体は超音波破砕機を用いて細胞破砕をした。得られた可溶性画分を用いて AFP の精製を行った。TH 活性および RI 活性は、Meyer 法、シュークロースサンドイッチ法で測定した。

【結果】スクリーニングの結果、使用した菌株は、菌体外に多くの多糖を生産することから、まず、多糖を除去する必要があることがわかった。そこで、硫安分画を用いて多糖の除去を行うとともに、各画分の RI 活性の測定を行った。その結果、*F. xanthum* については、20-40%画分で最も高い RI 活性（1.0 mg/ml、RI=0.5）を示し、40-50%画分で、1.25℃の高い TH 値を示した。また、硫安分画による *F. degerlachei* の TH については、あまり差がなかった。そこで、アセトン分画を用いて分画をした結果、50-75%画分（1.0 mg/ml）は、TH（0.3）、RI（0.2）ともに高い値を示した。これらの結果より、TH 値が高いからといって RI 値が高くなるとは限らないということがわかった。現在、*F. xanthum* および *F. degerlachei* の AFP を精製し、その比較検討を行っている。

参考文献；1）Hidehisa Kawahara *et al*., *Cryo. Letters*, **28**(1), 29-39 (2007).

antifreeze protein, *Flavobacterium*, Screening

講演番号：3A32a07
講演日時、会場：3 月 28 日 10:16～ A 校舎 32 会場

キチン由来ヘテロ 2 糖による海洋細菌のキチナーゼ生産誘導
Heterodisaccharide derived from chitin induces chitinase production in some of marine bacterium
○白石 晴香[1]、平野 貴子[2]、袴田 航[1,2]、西尾 俊幸[1,2] ([1]日本院生資科・生物資源利用、[2]日大生資科・生命科)
○ HARUKA SHIRAISHI[1], TAKAKO HIRANO[2], WATARU HAKAMATA[1,2], TOSHIYUKI NISHIO[1,2] ([1]Graduate School of Bioresource Sciences, Nihon Univ., [2]Dept. Chem. and Life Sci. , Bioresource Sciences. Nihon Univ.)

【目的】
一般に海洋細菌は海底土壌中に蓄積したキチン塊をキチン分解酵素により分解し、資化することが知られている。これらの菌の多くはキチナーゼによりキチンからジ-*N*-アセチルキトビオース[$(GlcNAc)_2$]を菌体外最終産物として生産して体内に取り込み増殖する。近年、一部の Vibrio 属細菌がキチンオリゴ糖脱アセチル化酵素(COD)を分泌し、$(GlcNAc)_2$ から β-D-*N*-アセチルグルコサミニル-(1,4)-D-グルコサミン(GlcNAc-GlcN)を生産することが知られるようになり、このヘテロ 2 糖が COD 生産性 Vibrio 属細菌に対して特異的に酵素生産誘導や遊走性誘起といった生理機能を示すことが分かった [1,2]。これまで COD を生産する菌は Vibrio 属細菌のみで報告されていたが、我々は新たに Shewanella 属細菌が COD の遺伝子を有していることを発見した。これにより、Vibrio 属以外の細菌に対しても、ヘテロ 2 糖が上記の生理機能を示す可能性がある。そこでまず、Shewanella 属細菌由来の COD について調べたところ、キチンオリゴ糖の中でも 2 糖の$(GlcNAc)_2$に最大の活性を示すなど、Vibrio 属細菌と概ね類似した酵素化学的性質を示した [3]。本研究では Shewanella 属細菌でもヘテロ 2 糖によるキチナーゼ生産誘導が見られるか確認した。

【方法と結果】
GlcNAc-GlcN による酵素生産誘導が明らかとなっている *V. parahaemolyticus* と、新たに COD 遺伝子を有することが判明した *Shewanella woodyi* および *S. baltica* を用いて実験を行った。GlcNAc-GlcN や$(GlcNAc)_2$が添加された培地と糖無添加の培地で各菌を培養し、経時的に培養上清を回収した。そこにキチナーゼの基質である *p*NP-$(GlcNAc)_2$を加え反応を行い、*p*NP の遊離を測定することで GlcNAc-GlcN によるキチナーゼの酵素生産誘導の確認を行った。

1) T. Hirano *et al. , Glycobiology*, **19**, 1046-1053 (2009)
2) T. Hirano *et al.* , *Lett. Appl. Microbiol.*, **53**, 161-166 (2011)
3) 白石 晴香ら、日本農芸化学会 2014 年度大会、講演番号 D02

chitinase, chitin oligosaccharide deacetylase, induction of enzyme production

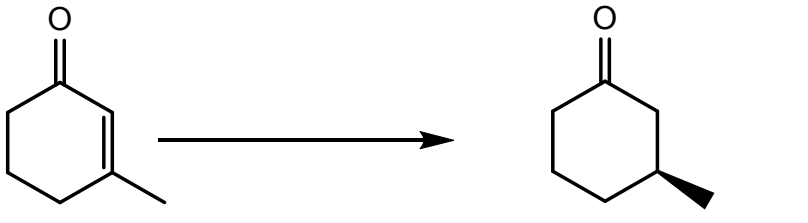
講演番号：3A32a08
講演日時、会場：3 月 28 日 10:27～ A 校舎 32 会場

Yarrowia lipolytica TPU1602 由来旧黄色酵素の精製及び解析
Purification and characterization of old yellow enzyme from *Yarrowia lipolytica* TPU1602
○永森 慎吾[1]、山本 和範[1,2]、伊奈 隆年[1,2]、銅谷 正晴[3]、木原 秀太[3]、浅野 泰久[1,2] ([1]富山県大工・生工研セ、[2]JST, ERATO、[3](株)東邦アーステック)
○Shingo NAGAMORI[1], Kazunori YAMAMOTO[1,2], Takatoshi INA[1,2], Masaharu DOYA[3], Shuta KIHARA[3], Yasuhisa ASANO[1,2] ([1]Toyama Pref. Univ., [2]ERATO, JST, [3]Toho earthtech, Inc)

【目的】酵素反応は温和な条件で進行し、高い立体選択性が期待できるので、光学的に高純度の化合物を効率的に合成する方法として期待されている。本研究では、酵素を用いて医薬品製造などで重要な中間体になる不斉環状ケトンを合成することを目的に、3-メチル-2-シクロヘキセノンを S 選択的に還元する微生物をスクリーニングし、選抜菌から酵素を精製して、諸性質を明らかにした。

【方法および結果】微生物は、5 mM シクロヘキセノンを含む培地で培養した菌体を用いて次の手順でスクリーニングした。30 mM グルコース含有 0.1 M リン酸バッファー (pH 7.0) に菌体と 10 mM 3-メチル-2-シクロヘキセノン（MCH）を加えて 30ºC で 48 時間反応し、上清液の反応生成物を GC-MS で分析して 35 株を一次選抜菌とした。次に生成物をキラルカラムで分析し決定し、MCH を *S* 選択的に還元する優良菌として *Yarrowia lipolytica* TPU 1602 を選抜した。選抜菌の酵素は、イオン交換クロマトグラフィーや疎水性クロマトグラフィーなどを組み合させて精製した。酵素活性は、シクロヘキセノンを基質にして、pH 7.0 における NADPH の減少を 340 nm の吸光度変化を測定して求めた。

本酵素は、シクロヘキセノンを添加すると酵素が誘導的に生成された。そこで、本酵素は、シクロヘキセノン含有培地で 30ºC，48 時間培養した後、菌体を破砕して、上記の各種クロマトグラフィーで、SDS-PAGE で単一バンドになるまで精製した。精製酵素の比活性は、約 14.1 U/mg であった。酵素の分子質量はゲル濾過で 40 kDa，SDS-PAGE で 45 kDa であり、単量体酵素と推定された。アミノ酸配列を検討した結果、N 末端は修飾されており、内部配列は *Yarrowia lipolytica* CLIB122 の Old Yellow Enzyme と高い相同性を示した。本酵素は pH 5~pH 10 で安定であった。その他の酵素化学的諸性質についても報告する。



MCH　　3-methyl-2-cyclohexanone

Screening, Old yellow enzyme, Reductase

講演番号：3A32a09
講演日時、会場：3 月 28 日 10:38～ A 校舎 32 会場

Lactobacillus gasseri ME284 由来の X-prolyl-dipeptidyl aminopeptidase の精製と酵素学的特性
Purification and partial characterization of an X-prolyl-dipeptidyl aminopeptidase from Lactobacillus gasseri ME284

○宮部 亮祐[1]、高橋 祐人[1]、松藤 寛[1]、荻原 淳[1]、伊藤 健太郎[1,2]、川井 泰[1]、増田 哲也[1]、鈴木 公一[1]、小田 宗宏[1]([1]日本大学、[2]株式会社明治・食機能科学研)
○Ryousuke MIYABE[1], Yuuto TAKAHASHI[1], Hiroshi MATSUFUJI[1], Jun OGIHARA[1], Kentarou ITOU[1,2], Yasushi KAWAI[1], Tetsuya MASUDA[1], Kouichi SUZUKI[1], Munehiro ODA[1] ([1]Nihon Univ., [2]Meiji co.,Ltd)

【目的】カゼインは牛乳中の約 8 割を占めるタンパク質である。カゼインタンパク質の一種である β-カゼインには 13 種類の遺伝的変異体が存在し、その中では A1β-カゼインが最も多い。疫学調査の結果からは、A1β-カゼインの消化物に見られる β-Casomorphin-7(Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile、以下、BCM-7)は、1 型糖尿病や乳児の突然死などの原因物質であるとも言われている。BCM-7 は X-prolyl-dipeptidyl aminopeptidase により分解されることが知られており、演者らは、*Lactobacillus gasseri* より酵素を精製し、その特性を調べるとともに、酵素による BCM-7 の分解を試みた。
【実験材料及び方法】*L. gasseri* ME-284 株を MRS 培地にて 24 時間培養後、菌体を回収し、リゾチーム処理を行った。その上清液より、Gly-Pro・pNA の分解活性を指標に酵素を精製（イオン交換、アフィニティー、ゲル濾過等）した。酵素の部分アミノ酸配列は、プロテアーゼ処理により得られた酵素のペプチドにつき MS により調べた。また、酵素による BCM-7 の分解物は HPLC により分画し、各分画についてアミノ酸配列を解析した。
【結果】リゾチーム処理後の遠心上清液（粗酵素液）より、収率 1.4%、比活性 265 倍の精製酵素を得た。還元下 SDS-PAGE にて単一バンド（82kDa）であり、ゲル濾過による分子量は 173kDa（ホモダイマー）と推定された。本酵素をプロテアーゼ処理して得られたペプチドフラグメントのアミノ酸配列を調べたところ、*L. gasseri* ATCC33323 のゲノム解析結果から推定されているアミノ酸配列（794 残基数）とカバー率 31.74%ではあるが一致していた。従って、本酵素は、X-prolyl-dipeptidyl aminopeptidase であると判断された。本酵素の至適温度は 50℃、至適 pH は 7 であり、セリンプロテアーゼの特徴を有していた。BCM-7 の分解様式を調べると、プロリンを含んだペプチドで N 末端側から 2 番目のプロリンの C 端側を加水分解すると考えられ、N 末端アミノ酸の種類により分解活性が異なることも推定された。
【結論】*L. gasseri* ME-243 株から X-prolyl-dipeptidyl aminopeptidase を精製した。本酵素は、*L. gasseri* ATCC33323 が有すると推測されている該酵素の推定アミノ酸配列と一致した（カバー率 31.74%）。BCM-7 の分解様式を調べると、プロリンを含んだペプチドで N 末端側から 2 番目のプロリンの C 端側ペプチド結合が加水分解されることが明らかになり、このような酵素学的特性からも本酵素は X-prolyl-dipeptidyl aminopeptidase であると考えられた。

L.gasseri, X-prolyl-dipeptidyl aminopeptidase, beta-casomorphin

講演番号：3A32a10
講演日時、会場：3 月 28 日 10:49～ A 校舎 32 会場

Phialemonium sp. AIU 274 由来ω-アミノ基酸化酵素を利用したジカルボン酸合成
Production of dicarboxylic acids by an enzyme oxidizing ω-amino group of aminocarboxyric acid, aminoalcohols and amines from *Phialemonium* sp. AIU 274
○大江 光章、山田 美和、北條 渉、山下 哲郎、礒部 公安 (岩手大農)
○Mitsuaki OOE, Miwa YAMADA, Wataru HOJO, Tetsuro YAMASHITA, Kimiyasu ISOBE (Iwate Univ.)

【目的】ジカルボン酸は、アミン類と縮合反応することにより繊維産業分野などで利用可能なポリマーが合成される有用物質である。例えば、炭素数が 6 のアジピン酸は、6,6-ナイロンの原料として有名である。これまでに我々は、*Phialemonium* sp. AIU 274 が中鎖 ω-アミノ化合物を酸化する稀有な酸化酵素を産生することを発見し、酵素の諸性質を明らかとしてきた[1]。本研究では、本酵素の応用のひとつとして、中鎖 ω-アミノカルボン酸のジカルボン酸への変換に利用することを目指した。具体的には、ω-アミノカルボン酸のアミノ基を本酵素によってアルデヒド基に酸化し、得られた反応生成物に、我々が見出している基質特異性の広い *Pseudomonas* sp. AIU 362 由来アルデヒド酸化酵素[2]を反応させ、ジカルボン酸の生成を試みた。
【方法】ω-アミノ化合物酸化酵素は、6-アミノヘキサン酸を窒素源とする培地で 1 日間培養した 12 L 分の菌体を破砕した後、硫安塩析と 3 種のカラムクロマトグラフィーを組み合わせて精製した。アルデヒド酸化酵素は、2-メトキシエタノールを炭素源とする培地で 3 日間培養した 20 L 分の菌体から、硫安塩析と 4 種のカラムクロマトグラフィーを組み合わせて精製した。続いて、6-アミノヘキサン酸に上記 2 種の酸化酵素を 10 mM リン酸カリウム緩衝液中で段階的に反応させた。各反応生成物は LC-MS 分析で同定した。また、アジピン酸の生成量は HPLC で分析した。
【結果・考察】0.2 M 6-アミノヘキサン酸と精製した ω-アミノ化合物酸化酵素を pH 7.0 で 30℃, 24 時間反応させた。その結果、反応液の LC-MS 分析によって、6-オキソヘキサン酸の合成が確認された。得られた反応生成物にアルデヒド酸化酵素を添加し、同じ反応条件で 24 時間反応させた。そして、反応生成物を HPLC によって分取し、LC-MS で分析した結果、アジピン酸が確認された。次に、第一段目の反応について酵素添加量と反応時間を検討した。その結果、0.2 U の ω-アミノ化合物酸化酵素を添加して 12 時間反応した時、6-オキソヘキサン酸生成量がほぼ最大に達した。また、第二段目の反応は、40℃の反応でアジピン酸合成量が最大に達した。これらの結果より、我々が見出した 2 種の酸化酵素を組み合わせて、中鎖 ω-アミノカルボン酸からジカルボン酸を生成できることが示された。

[1] K. Isobe et al., Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 96, 89-95 (2013)
[2] Y. Sasaki et al., Journal of Bioscience and Bioengineering, 106, 297-302 (2008)

Phialemonium sp., dicarboxylic acid, aldehyde oxidase

講演番号：3A32a11
講演日時、会場：3 月 28 日 11:10～ A 校舎 32 会場

Burkholderia sp.由来及び *Variovorax* sp.由来の組換えβ-Phe アミノアシラーゼの性質解析

Characterization of the recombinant beta-phenylalanine aminoacylases derived from *Variovorax* sp. and *Burkholderia* sp.

○加藤 雄己、山崎 穣、竹澤 俊大、橋本 賢一、中松 亘、川崎 寿、夏目 亮（東電大・院・工）
○Yuki Kato, Yutaka Yamasaki, Toshihiro Takezawa, Ken-ichi Hashimoto, Tsuyoshi Nakamatsu, Hisashi Kawasaki, Ryo Natsume (Grad. Sch. Eng., Tokyo Denki Univ.)

【背景および目的】*R* 体のβ-フェニルアラニン(β-Phe) は抗がん剤の一種 paclitaxel の合成に利用される有用な物質である。化学的に全合成された β-Phe はラセミ体であるため、医薬品の合成成分として利用するにはエナンチオマーを分離する必要がある。我々は、アミノ基をアセチル化した β-Phe((*R,S*)-*N*-Ac-β-Phe)の *R* 体のみをエナンチオ特異的に加水分解する(*R)*-β-Phe アミノアシラーゼ (*R*-β-PheAA)に着目し、本酵素活性を利用した β-Phe の光学分割プロセスの開発を念頭においた研究を行っている。これまでの研究で、我々は *R*-β-PheAA 生産菌 *Variovorax* sp. 及び *Burkholderia* sp. を自然界より発見・単離し、両菌株の *R*-β-PheAA 遺伝子をクローニングした。また、His-Tag 融合型酵素（His-*R*-β-PheAA）および Tagfree 型の酵素の組換え発現系を構築し、精製系の構築に取り組んできた。本研究では、*R*-β-PheAA の構造機能相関解析を目的に、*Variovorax* sp. 由来および *Burkholderia* sp. 由来 *R*-β-PheAA を、His-tag 融合型および Tagfree 型で組換え発現させて精製し、酵素の至適反応条件を検討した。His-tag 融合による酵素活性への影響についても評価した。

【方法および結果】His-tag 融合型の両酵素については、Ni アフィニティー、強陰イオン交換、ゲルろ過の 3 種類 3 段階のカラムクロマトグラフィーで精製した。Tagfree 型の *Burkholderia* sp.由来酵素は、疎水性相互作用、強陰イオン交換、ゲルろ過の 3 種類 5 段階のカラムクロマトグラフィーで精製する方法を確立した。Tagfree 型の *Variovorax* sp.由来酵素は、弱陰イオン交換も組み合わせた 4 種類 4 段階のカラムクロマトグラフィーで精製する方法を確立した。得られた組換え酵素を用いた生化学的な実験の結果、*Variovorax* sp. 由来の His-Tag 融合型及び Tagfree 型の *R*-β-PheAA では、50℃、pH 6.7 付近、HEPES-OH Buffer の条件で比活性が最大になった。また His-tag 融合型酵素に比べて Tagfree 型の酵素の方が高い比活性を有することが分かった。*Burkholderia* sp. 由来の His-tag 融合型及び Tagfree 型の *R*-β-PheAA では、55℃、pH 7.0 付近、HEPES-OH Buffer の条件で比活性が最大になった。また、*Variovorax sp.*由来酵素とは逆に、Tagfree 型の酵素に比べて His-tag 融合型酵素の方が高い比活性を有することが分かった。より詳細な分析が必要であるが、*Variovorax* sp. 由来酵素については Tagfree 型酵素を用いて、*Burkholderia* sp. 由来酵素については His-tag 融合型酵素を用いて、今後の研究を行うべきかもしれない。

beta-phenylalanine, aminoacylase, enantioselective resolution

講演番号：3A32a12
講演日時、会場：3 月 28 日 11:21～ A 校舎 32 会場

Arthrobacter sp. KAIT-B-420 が産生するプトレッシンオキシダーゼ遺伝子置換による基質特異性の変化および耐熱化の検討
Change of substrate specificity and thermostability of putrescine oxidase from *Arthrobacter* sp. KAIT-B-420 by point mutation
山村 晃、○川上 勇希（神奈川工科大応用化学・応用バイオ）
Akira YAMAMURA, ○Yuki KAWAKAMI (Kangawa Institute of Technology)

［目的］ポリアミンは，全ての生体細胞の必須成分である脂肪族アミンであり，細胞の成長と増殖に関与している。また，ポリアミンは免疫細胞の識別だけでなく炎症反応の制御にも関与し，これらの役割のために，ポリアミンは生体アミン類の中でも大きく注目されている。プトレッシンは L-オルニチンがオルニチンデカルボキシラーゼによって脱炭酸されて生合成されるポリアミンの前駆体である。また，アレルギー様食中毒の起因物質であるヒスタミンと共存することによって，ヒスタミン単独よりも毒性を高めることも知られている。このことから，食品中のアミン類を測定することは食中毒の予防や食品衛生上の指標として重要である。現在, ポリアミン類の測定は HPLC が主流であるが，いくつかの問題がある。そこで，簡便迅速に測定できる酵素的測定法に着目した。本研究室ではすでに，プトレッシンオキシダーゼ産生能が高い *Arthrobacter* sp. KAIT-B-420 を見出し，クローニングに成功している。本研究では, *Arthrobacter* sp. KAIT-B-420 が産生するプトレッシンオキシダーゼ（PUO）アミノ酸を置換することによって耐熱性の向上と基質特異性を変化させることを目的とする。

［方法および結果］基質特異性を変化させるため，PUO の基質結合部位と考察される 328 番目の Glu を Asp にアミノ酸置換するため変異を導入した。具体的には，pColdII ベクターに PUO 遺伝子を挿入した pColdII-PUO を鋳型として変異 PCR を行い，pColdII-PUO(E328D)を増幅して *E.coli* BL21(DE3)に形質転換した。PUO の基質特異性変異の結果は，プトレッシンに対する反応性を 100 としたとき，カダベリン約 14%，1,6−ジアミノヘキサン 1%以下であった。一方，PUO-E328D は，プトレッシンに対する反応性を 100 としたとき，カダベリン約 62%，1,6-ジアミノヘキサン約 62%とアルキル鎖の長い基質に対する反応性が向上していることが確認できた。また，PUO と PUO-E328D について *K*m 値および *V*max は，変異によってプトレッシンの反応速度が 22.7%に低下し，プトレッシンに対する親和性も低下していることが確認できた。耐熱性の変異も同様に，Cys319 とジスルフィド結合を形成させるために F373C に変異を導入した。補酵素である FAD と共有結合を形成させるために A398C, A398H に変異を導入した。また，F373C と A398C，F373C と A398H の２アミノ酸置換の変異を導入した。PUO の耐熱性変異の結果は，PUO-F373C が既存の PUO よりも熱安定が向上し，耐熱性がある事が確認された。PUO-A398C は加熱による FAD の脱離を防げた。しかしながら，FAD と共有結合しても熱安定は向上しなかった。

putrescine oxidase, thermostability, substrate specificity, point mutation, biosensing

講演番号：3A32a13
講演日時、会場：3 月 28 日 11:32～ A 校舎 32 会場

ハロ酸デハロゲナーゼ(HAD)スーパーファミリーに属する酵素のアミノ酸配列と機能との関連性の調査

Study of the relevance of amino acid sequence to function of the enzymes belonging to haloacid dehalogenase (HAD) superfamily

○殷 梓蘭、武田 奈津美、中村 卓 (長浜バイオ大学)
○Zilan YIN, Natumi TAKEDA, Takasi NAKAMURA (Nagahama Institute of Bio-Science and Technology)

【目的】

ハロ酸デハロゲナーゼスーパーファミリー（HADSF）の代表的な機能既知酵素である*Pseudomonas* sp.YL由来のL-2-ハロ酸デハロゲナーゼ（L-DEX YL）は、ハロ酸類に対して脱ハロゲン化活性を持っている。一方、同じHADSFに属する大部分はホスファターゼであり、ハロ酸デハロゲナーゼと類似の反応メカニズムを用いて様々なリン酸化合物の脱リン酸化反応を触媒する。これらのホスファターゼは特徴的な4つの配列モチーフ（Ⅰ：DXD、Ⅱ：S/T、Ⅲ：K、Ⅳ：GDXXXD）を持っている。L-DEX YLにはモチーフⅡとモチーフⅢが保存されているが、モチーフI (DLY)、モチーフIV (SSNAWD)における下線部の配列が完全に保存されていない。そこで、HADSFに属するデハロゲナーゼとホスファターゼの機能的な関連性を調べるために、L-DEX YLにホスファターゼのモチーフを導入して、得られた変異体のホスファターゼ活性を確認した。

【方法】

部位特異的変異導入実験キットを用いて、L-DEX YL の Y12D、S175G S176D、Y12D S175G S176D 変異遺伝子を作製した。それらを大腸菌 JM109 に形質転換して、N 末端に His-tag のついた目的の L-DEX YL 変異酵素を発現させ、アフィニティクロマトグラフィーにより精製した。その後精製した各変異酵素を用いて、L-2-クロロプロピオン酸に対するデハロゲナーゼ活性を塩化物イオンのチオシアン酸水銀による比色定量法により、またピロリン酸(PPi)に対するホスファターゼ活性をリン酸検出試薬（BIOMOL GREEN, Enzo）により確認した。

【結果】

L-DEX YL 変異酵素 Y12D、S175GS176D、のデハロゲナーゼ活性は野生型と比較して、約 1%以下になった。また、PPi に対して L-DEX YL の野生型が弱いホスファターゼ活性（0.058 μmol/min/mg）を示した。Y12D、S175GS176D 変異体のホスファターゼ活性は野生型よりそれぞれ 2 倍と 6 倍向上した。SSGD 変異体の酵素特性評価を行った結果、60℃で最も高い活性を示した。至適 pH が pH 8.0 であり、アルカリ性ホスファターゼの至適 pH と一致した。また、二価の金属イオンに関して、Mg^{2+}に対して最も要求性があり、Ca^{2+}により阻害された。今回、L-DEX YL のハロ酸デハロゲナーゼからホスファターゼへの機能転換が初めて実現され、活性に関わる大事な残基が推測された。また、Y12D S175G S176D の実験結果については本大会で発表予定である。

haloacid dehalogenase superfamily, phosphatase, motif

講演番号：3A32a14
講演日時、会場：3 月 28 日 11:43～ A 校舎 32 会場

Pseudomonas sp. YL 由来ハロ酸デハロゲナーゼ L-DEX YL における F60Y 変異の D-体基質脱ハロゲン化反応への影響

The effect of F60Y mutation to the dehalogenation reaction of D-isomer substrate in L-2-haloacid dehalogenase from *Pseudomonas* sp. YL

○中村 卓[1]、出来 弘幸[1]、近藤 洋隆[2]、藤本 和宏[3]、田中 成典[3] ([1]長浜バイオ大学バイオサイエンス、[2]神戸大院人間発達、[3]神戸大院システム情報)

○Takashi NAKAMURA[1], Hiroyuki DEKI[1], Hirotaka KONDO[2], Kazuhiro FUJIMOTO[3], Shigenori TANAKA[3] ([1]Nagahama Institute Bioscience and Technology, [2]Kobe Univ. Human Dev. and Environ., [3]Kobe Univ. System Info.)

【背景・目的】

Pseudomonas sp. YL 株由来の L-2-ハロ酸デハロゲナーゼ（L-DEX YL）は、X 線結晶構造解析、部位特異的変異導入実験、量子化学計算の結果などから酵素反応機構解析について詳細な研究が行われ、触媒に重要ないくつかのアミノ酸の役割について推定されている。しかし、基質のエナンチオ選択性の機構についてはまだ研究されていない。我々は昨年の本学会で、L-DEX YL の典型的な基質である L-2-クロロプロピオン酸（L-2-CPA）の鏡像異性体である D-2-CPA と L-DEX YL との酵素－基質複合体構造について、量子化学（QM）/分子力学（MM）計算から L-2-CPA の認識に関係があると思われる残基を推定し、その変異体を作製して D-2-CPA に対する活性を測定した結果について報告した。今回我々は、その続きとして、D-2-CPA から脱離する塩化物イオンと水素結合することが期待される F60Y 変異体について、QM/MM 計算やフラグメント分子軌道法（FMO）計算と変異体作製実験、活性測定より D-2-CPA に対する反応性を解析した。

【方法】

L-DEX YL と D-2-CPA との複合体は、L-DEX YL と L-2-CPA との複合体から L-2-CPA の塩素の位置を固定して残りの官能基の位置を入れ換えることで作成した。QM/MM 計算は基質周辺 5 Å の 12 残基を QM 領域、酵素全体を MM 領域として Gaussian09 により QM/MM 計算(PM3/Amber)を行った。FMO 計算については、QM/MM 計算で構造最適化された酵素―基質複合体の構造を MP2/6-31G* レベルで計算して、各基質と L-DEX YL との相互作用エネルギーを算出し、結果を比較した。F60Y 変異体遺伝子の作製、活性測定法については昨年の方法に従った（日本農芸化学会 2014 年度大会講演番号 3A10a09)。また、活性測定については、チオシアン酸水銀による塩化物イオンの比色定量も行った。

【結果】

FMO 計算より L-DEX YL の 60 番目の置換されたチロシンが野生型のフェニルアラニンよりも D-2-CPA と相互作用する結果が得られたので、F60Y 変異体の D-2-CPA に対する活性向上が期待された。実際に pH 指示薬で活性を測定してみると野生型では活性が見られなかったのに対し、F60Y 変異体は 22 U/mg の活性を示した。これらのことより、脱離するハロゲン原子と相互作用する残基の数を増やすとデハロゲナーゼの脱ハロゲン化反応が促進される可能性が示唆された。

L-2-haloacid dehalogenase from Pseudomonas sp. YL, F60Y mutant, reactivity to D-isomer substrate

講演番号：3A32a15
講演日時、会場：3 月 28 日 11:54～ A 校舎 32 会場

イネ・クマモリシン様遺伝子 AK109048 の酵母での発現
Expression of a kumamolisin-like gene, AK109048 from *Oryza sativa* in *Kluyveromyces lactis*
○嶌岡 考則[1]、古川 和裕[2]、中山 亨[2]、尾山 廣[1] ([1]摂南大学理工、[2]東北大学工)
○takanori shimaoka[1], kazuhiro furukawa[2], atsushi nakayama[2], hiroshi oyama[1] ([1]Setsunan Univ, [2]Tohoku Univ)

【目的】クマモリシンはサチライシン様の基本骨格と Ser-Glu-Asp の catalytic triad を触媒残基に持ち、至適反応条件が pH3.0、70℃の耐熱性セリンカルボキシルプロテアーゼ(SCP)である。SCP はプロ配列を持つ前駆体タンパク質として生合成された後、自己触媒的に成熟体へと変換され、酵素活性を発現する。SCP は細菌、原生動物、真菌、動物界に広く分布しているが、興味深いことに植物界からは見つかっていない。本研究では、SCP の分子進化や生理学的役割を解明するために、データベース検索より得られたイネのクマモリシン様遺伝子の酵母での発現を試みた。
【方法】イネ・クマモリシン様遺伝子(1851 塩基対、AK109048)の下流に His-tag 配列を融合した遺伝子を PCR で増幅し、酵母発現ベクターpKLAC1 の α-MF ドメインの下流部に挿入した。α-MF ドメインにはシグナルペプチドと α-MF ドメインを除去する Kex2 プロテアーゼ(Kex2P)認識配列がある。pKLAC1 のガラクトース誘導プロモーター、LAC4 を含む AK109048 の遺伝子断片を *Kluyveromyces lactis* GG799 株の染色体 DNA に相同組換えで導入した。組換え酵母は YPGal 培地（Yeast Extract 1%、 Peptone 2%、Galactose 4%）、30℃で振盪培養し、抗 His-tag 抗体によるウエスタンブロッティングで AK109048 の発現を確認した。
【結果・考察】AK109048 の C 末端側に His-tag 配列を融合させた遺伝子を酵母発現ベクターの pKLAC1 に挿入するための適当な制限酵素部位がなかった。そこで、Klenow 酵素でベクター及び PCR 産物を三段階の操作で連結し、Kex2P 認識配列の前に D-A-S-P-G が付加されたプラスミドが構築された。このプラスミドを組換えた酵母を(1)培地の初発 pH を 5.0～9.5、(2)カルシウムを培地に添加の条件で培養(30℃、48 時間)したが、培養上清には融合タンパク質のシグナルが検出されなかった。また、条件(1)の菌体をアルカリ溶解したものを分析した結果、120kDa 付近にシグナルが検出され、Kex2P で切断されていない可能性が示唆された。次に、D-A-S-P-G 配列の付加が Kex2P の切断に影響するかを調べるため、inverse PCR で挿入部位の遺伝子を欠失したプラスミドを作成し、GG799 株に導入した。この組換え酵母を 30℃、48 時間培養したところ、菌体内にのみ融合タンパク質のシグナルが検出された。現在、AK109048 の分泌条件の検討と菌体内に生産された 120kDa タンパク質の解析を行っている。

kumamolisin, serine-carboxyl peptidases, *Kluyveromyces lactis*

講演番号：3A32p01
講演日時、会場：3 月 28 日 14:00～ A 校舎 32 会場

Geobacillus kaustophilus HTA426 高変異性株を利用した耐熱化変異酵素遺伝子の創出法
A review of thermoadaptation-directed enzyme evolution using an error-prone thermophile derived from *Geobacillus kaustophilus* HTA426

○鈴木 宏和[1,2]、小林 淳平[1,2]、古川 恵[1]、八木 寿梓[2]、大城 隆[2] ([1]九州大農、[2]鳥取大工)
○ Hirokazu SUZUKI[1,2], Jyumpei KOBAYASHI[1,2], Megumi FURUKAWA[1], HISASHI YAGI[2], Takashi OHSHIRO[2] ([1]Faculty of Agric., Kyushu Univ., [2]Faculty of Eng., Tottori Univ.)

【目的】酵素触媒の耐熱性向上は，高い保存性や長い触媒寿命につながることから，その産業的利用機会を拡大させる。我々は，好熱菌 *Geobacillus kaustophilus* HTA426 の高変異性株を作製し，その細胞内自発的変異を利用した耐熱化指向性の酵素遺伝子進化法を研究している。本大会では，これまでに得られた当該手法に関連する知見を総括し，その長所や短所ならびに今後の展望について考察する。
【実験】*G. kaustophilus* 高変異性株に対象遺伝子を導入し、高温条件下での継代培養を繰り返しながら，対象遺伝子に変異を導入した。この際，対象遺伝子発現産物の活性に依存した生育阻害ストレスを与え，発現産物が耐熱化した変異遺伝子をもつ細胞を選択した。得られた細胞が有する遺伝子を解析し，その発現産物の特性を評価した。
【結果】これまでに本手法によって，枯草菌由来オロチジン一リン酸脱炭酸酵素，黄色ブドウ球菌由来クロラムフェニコール アセチル基転移酵素（クロラムフェニコール耐性の原因），および放線菌由来 RNA メチル基転移酵素（チオストレプトン耐性の原因）の耐熱化変異遺伝子が得られた。またクロラムフェニコール耐性遺伝子の研究過程では，変異型 pUC レプリコンが得られた。さらに T7 RNA ポリメラーゼ遺伝子の研究過程では，HTA426 株に潜在する機能的トランポゾンが同定できた。
【考察】本手法は，耐熱化酵素の遺伝子創出さらには好熱菌研究の遺伝学的ツールの開拓に一定の成果を挙げているが，その一方で改良すべき点も見出された。まず 1 点目は，変異種が少ないことである。得られる変異遺伝子の変異は，C・G→T・A 変異と G・C→A・T 変異が多い。これは高温で頻繁に起こる DNA 塩基の脱アミノ化反応が原因と考えられる。この問題に対しては，変異原処理を併用することが有効であろう。実際に，上述した変異型 pUC レプリコンは過酸化水素処理を併用することで得られた。また本手法で得られた変異点を，飽和変異法により追求することも有用かもしれない。2 点目は，対象酵素の耐熱化変異以外の因子によって細胞が選択圧に適応したことである。例えばクロラムフェニコール耐性遺伝子の進化では，進化過程においてクロラムフェニコール耐性の株が出現したが，それが有するプラスミドを再導入すると，同条件でクロラムフェニコール耐性を示さなかった。3 点目の課題は，スクリーニング法の不備である。抗生物質耐性や栄養要求性マーカーなど，遺伝子発現産物の活性が細胞表現型で検出できるもの以外において，耐熱化酵素遺伝子を選別するためには，新たなスクリーニング戦略が重要となる。本研究は生研センターイノベーション創出事業および農食研究推進事業の支援を受けて行った。

Geobacillus kaustophilus, error-prone thermophile, thermoadaptation

講演番号：3A32p02
講演日時、会場：3 月 28 日 14:11～ A 校舎 32 会場

Geobacillus kaustophilus HTA426 で機能するチオストレプトン耐性マーカーの創出

Generation of thiostrepton resistance markers for genetic transformation of *Geobacillus kaustophilus* HTA426

○和田 圭介[1]、小林 淳平[1,2]、古川 恵[1]、土居 克実[1]、八木 寿梓[2]、大城 隆[2]、鈴木 宏和[1,2] ([1]九州大農、[2]鳥取大工)
○Keisuke WADA[1], Jyumpei KOBAYASHI[1,2], Megumi FURUKAWA[1], Katsumi DOI[1], Hisashi YAGI[2], Takashi OHSHIRO[2], Hirokazu SUZUKI[1,2] ([1]Faculty of Agric., Kyushu Univ., [2]Faculty of Eng., Tottori Univ.)

【目的】*Geobacillus* 属細菌で使用される薬剤耐性選択マーカーはカナマイシンおよびクロラムフェニコール耐性マーカーに限られ，これは *Geobacillus* 属細菌の柔軟な遺伝的改変を制限する要因となっている。我々は，*G. kaustophilus* HTA426 高変異性株の自発的変異を利用した耐熱化指向性の酵素遺伝子進化を研究しており，その一環として放線菌由来チオストレプトン耐性遺伝子（*tsr*）の進化を行った。本大会では，得られた変異遺伝子の特性と，その選択マーカーとしての有用性を報告する。
【実験】*E. coli-Geobacillus* シャトルプラスミド pGKE75 に *tsr* 遺伝子を連結し，得られたプラスミド pGKE75-*tsr* で *G. kaustophilus* 高変異性株を形質転換した。形質転換体をチオストレプトン含有培地上 45°C–60°C で継代培養したところ，60°C でチオストレプトン耐性を示す株が得られ，それらは H258Y 置換体をコードする変異遺伝子（tsr^{H258Y}）を有していた。さらに当該変異遺伝子を詳細に解析した。
【結果と考察】pGKE75-*tsr* を有する *G. kaustophilus* 細胞は 55°C でチオストレプトン耐性を示さなかったのに対し，pGKE75-tsr^{H258Y} を有する細胞はチオストレプトン耐性を示した（プラスミド保有細胞のチオストレプトン耐性率，68%）。野生型および H258Y 置換体タンパク質を調製し，それらの変性温度を調べたところ，H258Y 置換体は野生型よりも 4.2°C 高い半数変性温度を示した。さらに H258 アミノ酸残基を対象とした飽和変異を導入し，それら飽和変異遺伝子が付与するチオストレプトン耐性を調べたところ，pGKE75-tsr^{H258W} は pGKE75-tsr^{H258Y} と同様に 55°C でチオストレプトン耐性を示したが，pGKE75-tsr^{H258F} は耐性を示さなかった。組換えタンパク質の半数変性温度についても，H258W と H258Y 置換体は同程度であったが，H258F 置換体は野生型と同様であった。本結果は，258 位の嵩高いアミノ酸側鎖が *tsr* 発現産物の耐熱化に重要であることを示唆する。*tsr* 発現産物は塩橋形成に依存したホモ二量体を形成するが，H258 残基は当該塩橋形成に関与する。よって，H258Y および H258W 置換は，ホモ二量体の塩橋形成を最適化し，その構造を熱安定化させたのかもしれない。また pGKE75-tsr^{H258W} と pGKE75-tsr^{H258Y} は，チオストレプトンを選択薬剤として *G. kaustophilus* を形質転換できた。*G. kaustophilus* に対するチオストレプトンの半数阻害濃度は低く（約 50 ng/ml），選択薬剤として実用的であった。*tsr* 遺伝子は *Streptomyces* 属放線菌の形質転換において広く，ただし限定的に利用されてきたが，以上の結果は tsr^{H258W} および tsr^{H258Y} 遺伝子が *Geobacillus* 属細菌形質転換のための選択マーカーとして有用であることを示している。本研究は生研センターイノベーション創出事業および農食研究推進事業の支援を受けて行った。

Geobacillus kaustophilus, thiostrepton, error-prone thermophile

講演番号：3A32p03
講演日時、会場：3 月 28 日 14:22～ A 校舎 32 会場

Geobacillus kaustophilus HTA426 高変異性株で派生した高温機能型クロラムフェニコール耐性プラスミドの解析
nalysis of a thermoadaptive chloramphenicol resistance plasmid generated in an error-prone strain of *Geobacillus kaustophilus* HTA426

○小林 淳平[1,2]、田靡 実咲[2]、土井 奨平[2]、古川 恵[1]、八木 寿梓[2]、大城 隆[2]、鈴木 宏和[1,2]([1]九州大農、[2]鳥取大工)
○Jyumpei KOBAYASHI[1,2], Misaki TANABIKI[2], Shohei DOI[2], Megumi FURUKAWA[1], Hisashi YAGI[2], Takashi OHSHIRO[2], Hirokazu SUZUKI[1,2] ([1]Faculty of Agric., Kyushu Univ., [2]Faculty of Eng., Tottori Univ.)

【目的】我々は，*Geobacillus kaustophilus* HTA426 高変異性株の自発的変異を利用した耐熱化指向性の酵素遺伝子進化法を研究している。以前の研究では，クロラムフェニコール（Cm）アセチル基転移酵素（CAT）の耐熱化変異体（A138T 置換体）を，本手法によって見出した。また A138T 置換体の更なる耐熱性向上を目的とし，その遺伝子（cat^{A138T}）の耐熱化指向性進化を行ったところ，cat^{A138T} 遺伝子に変異がないにも関わらず，より高温条件下で Cm 耐性を付与する変異型プラスミドが得られた。本研究では，当該変異型プラスミドを詳細に解析した。
【実験と結果】変異型プラスミドの全塩基配列を解析したところ，大腸菌における複製に必要な pUC レプリコン領域内に 2 ヶ所の変異点が見出された。変異型プラスミドは，*G. kaustophilus* に高温条件下（65°C）でも効率よく Cm 耐性を付与したが（プラスミド保有細胞の Cm 耐性率，88%），その親プラスミドは付与しなかった。変異型プラスミドの変異点 2 ヶ所は，いずれも高温 Cm 耐性に重要で，どちらか一方の変異点だけでは高温耐性効率が低下した。変異型プラスミドもしくは親プラスミドを保有する *G. kaustophilus* を液体培養した場合は，それら細胞内における CAT 活性，プラスミドコピー数，およびアセチル CoA 濃度に大きな差異は見られなかった。しかし平板培養した場合は，変異型プラスミドを保有する *G. kaustophilus* 細胞中の CAT 活性は，親プラスミドを保有する細胞中のものより顕著に高く（変異型プラスミド，0.37 U/mg protein；親プラスミド，0.11 U/mg protein），一方で変異型プラスミドの *G. kaustophilus* 細胞内プラスミドコピー数は，親プラスミドのものよりも，低い傾向が見られた（染色体あたりのコピー数：変異型プラスミド，17；親プラスミド，33）。
【考察】メカニズムは明らかではないが，pUC レプリコン領域内の変異が *G. kaustophilus* 細胞内におけるプラスミド複製に影響を与え，変異型プラスミドの *G. kaustophilus* 内コピー数を減少させたと考えられる。その結果，プラスミド維持に要するエネルギーが減少し，高温条件下における CAT タンパク質産生量の向上ひいては Cm 耐性率の向上に繋がったと推測される。平板培養した場合の細胞内アセチル CoA 濃度については，今後測定する予定である。なお，変異型プラスミドは cat^{A138T} 遺伝子を選択マーカーとして *G. kaustophilus* を形質転換できた。また興味深いことに，当該変異型 pUC レプリコンを有する pUC18 派生プラスミドは, pUC18 よりも低温領域でコピー数が高い傾向が見られた。これら成果物は，大腸菌や *G. kaustophilus* の新たな遺伝学的ツールとして利用できるかもしれない。
本研究は生研センターイノベーション創出事業および農食研究推進事業の支援を受けて行った。

Geobacillus kaustophilus, chloramphenicol, error-prone thermophile

講演番号：3A32p04
講演日時、会場：3 月 28 日 14:33～ A 校舎 32 会場

合成生物学的手法によるエチレン生成シアノバクテリアの改良-Ethylenome 過剰発現によるエチレンの高生産-

Improved enzyme complex expression for higher bio-ethylene production by a cyanobacterium

○石川 克也[1]、神藤 定生[2]、細田 晃文[1]、田村 廣人[1] ([1]名城大農、[2]名城大理工)
○Katsuya ISHIKAWA[1], Sadanari JINDOU[2], Akifumi HOSODA[1], Hiroto TAMURA[1] ([1]Meijo Univ. Faculty of Agriculture, [2]Meijo Univ.)

【目的と背景】

エチレンは合成樹脂やプラスチック製品を製造する初発物質として極めて重要な工業用原料ガスである。しかし、その製造は石油を原料としたナフサの熱分解法を用いたエネルギー消費型プロセスである。脱石油依存社会を可能にする新規なエチレン製造法を確立するため、我々は二酸化炭素から光合成的にバイオエチレンを生産するシアノバクテリアを構築した。すなわち、植物由来のエチレン生合成に関わる 1-アミノシクロプロパン-l-カルボン酸(ACC)合成酵素(ACS)および ACC 酸化酵素(ACO)を、セルロソームエンジニアリングで複合体化させ、合成生物学の手法によりシアノバクテリアへ導入した。その結果、目的タンパク質の発現量に依存して、バイオエチレン生産量が増加し、本細菌はバイオエチレンを 3.4 nl/ml/O.D.$_{730}$/h の効率で生産した(Jindou *et al.*, ACS Synth. Biol., 2014)。さらなるエチレン生産効率の向上を目的として、本研究では、①ACS-Ctdoc および ACO-Acdoc のコドン頻度をシアノバクテリアに最適化、②光誘導性プロモーター/ターミネーターによる目的タンパク質の発現誘導を行ったので、その成果を報告する。

【方法および結果】

① *Synechococcus elongatus* PCC 7942 (R2-PC)株に対応したコドン頻度となるよう、2 種のキメラ触媒サブユニット(*ACS-Ctdoc* および *ACO-Acdoc*)がコードされた配列を最適化し、その遺伝子を合成した。2 つに分けて合成した各遺伝子断片は、ドッキング PCR 法によりそれぞれを連結させ、得られた *optACS-Ctdoc* および *optACO-Ctdoc* 遺伝子断片を同様に連結させた。これを用いて pUC303-SOC の該当領域を、In-fusion 反応により置換させ、pUC303-optSOC を構築した。

②既存の IPTG 誘導性 *trc* プロモーターから *S. elongatus* PCC 7942 由来の光誘導性 *psbA1* プロモーター/ターミネーターへ置換した pUC303-psbSOC を構築した。

以上、得られた 2 種のプラスミドで *S. elongatus* PCC 7942 (R2-PC)株を形質転換させ、得られた各組換え体が生産するエチレンをガスクロマトグラフィーで定量したので、その詳細を報告する。

Ethylene, Cyanobacteria, Synthetic biology

講演番号：3A32p05
講演日時、会場：3 月 28 日 14:44～ A 校舎 32 会場

合成生物学的手法によるエチレン生成シアノバクテリアの改良-Ethylenome の反応系最適化によるエチレンの高生産

Improved enzyme composition for higher bio-ethylene production by a cyanobacterium

○神藤 定生[1]、増井 寛[2]、細田 晃文[2]、田村 廣人[2] ([1]名城大理工、[2]名城大農)
○Sadanari JINDOU[1], Hiroshi MASUI[2], Akifumi HOSODA[2], Hiroto TAMURA[2] ([1]Meijo Univ., [2]Meijo Univ. Faculty of Agriculture)

【目的】

脱石油依存社会を可能にする新規なエチレン製造法を確立するため、我々は二酸化炭素から光合成的にエチレンを生産するシアノバクテリアを構築した。すなわち、植物由来のエチレン生合成に関わる 1-アミノシクロプロパン-1-カルボン酸(ACC)合成酵素(ACS)および ACC 酸化酵素(ACO)を、セルロソームエンジニアリングで複合体化させ、Ethylenome とした。合成生物学の手法により Ethylenome をシアノバクテリアへ導入した結果、本細菌はバイオエチレンを 3.4 nl/ml/O.D.$_{730}$/h の効率で生産した。また、Ethylenome の形成により 3.7 倍高いバイオエチレン合成活性を得た(Jindou *et al., ACS Synth. Biol.*, 2014)。

さらなるバイオエチレン生産効率の向上を目的として、本研究では、Ethylenome の反応系最適化を行った。具体的には、①宿主から供給される基質 S-アデノシルメチオニン(SAM)供給量を増やすため、SAM 合成酵素(SAMS)を、②メチルチオアデノシン(MTA)による ACS の活性阻害を回避させるため、MTA ヌクレオシダーゼ(MTAN)を、それぞれ構築したので、その成果を報告する。

【方法および結果】

① 理研 BRC より提供された *Arabidopsis thaliana* 由来 cDNA クローン(pda00477, pda20265)から MTAN 遺伝子を、*Clostridium josui* ゲノム DNA から Cel8A 由来ドックリン遺伝子を、それぞれ PCR 法で増幅させ、これらを融合させたキメラサブユニット AtMTAN-Cjdoc を構築した。

② *Streptomyces avermitilis* ゲノム DNA(JGD12254)から SAMS 遺伝子を、*Clostridium thermocellum* ゲノム DNA から CipA 由来タイプ II ドックリン遺伝子を、それぞれ PCR 法で増幅させ、これらを融合させたキメラサブユニット SaSAMS-CtdocII を構築した。

③ ①、②で得たキメラサブユニットを保持する 2 種のキメラ骨格タンパク質、既存の Cip2 へ *C. josui* CipA 由来コヘシン２を１つ追加した Cip3C、および、これに *C. thermocellum* SdbA 由来コヘシンを１つ追加した Cip4、をそれぞれ構築した。

以上、①～③で構成される、AtMTAN-Cjdoc および SaSAMS-CtdocII を含んだ Ethylenome による、シアノバクテリアのバイオエチレン生産効率をガスクロマトグラフィーで定量したので、その詳細を報告する。

Ethylene, Cyanobacteria, Synthetic biology

講演番号：3A32p06
講演日時、会場：3 月 28 日 15:05～ A 校舎 32 会場

メタノール資化性酵母 Ogataea minuta でのタンパク質発現における各種ペプトンの効果

Comparison of various peptone for protein expression by methylotrophic yeast Ogataea minuta

伊藤 理恵[1]、鈴木 健之[2]、津田 将志[2]、市川 公久[2]、野中 浩一[2]、横尾 岳彦[1]、○千葉 靖典[1]([1]産総研・糖鎖創薬、[2]第一三共・バイオ医薬研)
Rie Itou[1], Takeshi Suzuki[2], Masashi Tsuda[2], Kimihisa Ichikawa[2], Koichi Nonaka[2], Takehiko Yoko-o[1], ○Yasunori Chiba[1] ([1]GTRC, AIST, [2]Daiichi Sankyo Co., Ltd.)

【目的】メタノール資化性酵母 *Ogataea minuta* は、強力なメタノール誘導性プロモータを有しており、そのプロモータを利用したタンパク質発現の宿主として期待されている。*O. minuta* でのタンパク質発現においては、その培地成分や培養条件によってタンパク質の発現量が影響を受ける場合がある。またプロテアーゼによるタンパク質分解なども起こるケースも見受けられるため、これまで宿主の改良や培養条件の検討を行ってきた。今回、我々は由来の異なる複数のペプトンを用いて培養を行うことにより、*O. minuta* でのタンパク質発現に影響が見られるかどうかを検討したので報告する。
【方法と結果】動物由来のペプトンに対し、植物や酵母由来のペプトン計 11 種を比較した。発現タンパク質としては、Cypridina Luciferase (cLuc)、human beta-*N*-acetylhexosaminidase alpha subunit (HexS)、およびイムノグロブリン (IgG) を検討した。各タンパク質をコードする遺伝子をアルコールオキシダーゼ遺伝子のプロモータに接続し、*O. minuta* のゲノム上に導入、形質転換体を得た。得られた形質転換体は動物由来のペプトンを含む培地で前培養後、集菌し、メタノールを含む誘導培地で再懸濁した。その際に由来の異なるペプトンを利用し、比較検討を行なった。cLuc の発現においては、動物由来ペプトンに比較し、えんどう豆由来ペプトンと大腸菌発現に適したペプトンを含む培地で 2 倍の活性が確認され、この活性増加は発現量と相関していた。一方、HexS の発現においては、小麦やえんどう豆由来のペプトンを用いた場合に培地中の HexS 活性の増加が確認された。また酵母由来のペプトンは両発現タンパク質で分解産物が低下する傾向が確認された。以上の結果を踏まえ、酵母由来、小麦由来、えんどう豆由来、及び動物由来のペプトンを用いて IgG の発現を検討した。その結果 4 種のペプトンで発現量には大差が見られなかったものの、動物由来ペプトンで見られた IgG の限定分解が起こっていないことが確認された。以上の結果から、*O. minuta* でのタンパク質発現においては、その発現タンパク質に合わせたペプトンを選択することが有効であるが、今回発現に利用した 3 種のタンパク質においては、えんどう豆由来及び酵母由来ペプトンが有効であることが示唆された。

yeast, peptone, Ogataea minuta

講演番号：3A32p07
講演日時、会場：3 月 28 日 15:16～ A 校舎 32 会場

メタノール資化性酵母を用いたトロンボモジュリン各領域の生産と解析
Production and analysis of various regions of thrombomodulin by the methylotrophic yeast
○中村 啓悟[1]、由里本 博也[1]、池添 隆之[2]、西岡 千恵[2]、本田 剛一[3]、阪井 康能[1]([1]京大院農・応用生命、[2]高知大医・血液・呼吸器内科、[3]旭化成ファーマ株式会社)
○Keigo NAKAMURA[1], Hiroya YURIMOTO[1], Takayuki IKEZOE[2], Chie NISHIOKA[2], Goichi HONDA[3], Yasuyoshi SAKAI[1] ([1]Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]Dept. Hematology and Respiratory Medicine, Kochi Univ., [3]Asahi Kasei Pharma Corp.)

【目的】トロンボモジュリン（TM）は血管内皮細胞表面に存在する糖タンパク質であり、トロンビンとの結合、さらにはトロンビン- TM 複合体によるプロテイン C の活性化を通じて血液抗凝固活性を発揮する。これまでの研究で、TM は 5 つのドメインから構成されており、レクチン様ドメイン（TMD1）には抗炎症作用が、6 個の EGF 様構造（TME1～TME6）の繰り返しから成る EGF 様ドメイン（TMD2）には血液抗凝固作用がある。また、TME45 には、炎症性サイトカインやカルシニューリン阻害剤による細胞障害から血管内皮細胞を保護する新規な作用を持つことが明らかにされている。さらなる TM の詳細な機能解析には、TM の種々の領域を簡便かつ安価に生産させることが重要である。そこで本研究では、メタノール資化性酵母を用いて TM の種々の領域を生産させ、各領域の生理活性を検討した。

【方法・結果】タンパク質生産宿主にはメタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* のプロテアーゼ二重欠損株 SMD1163 株（*pep4*Δ *prb1*Δ）を選択した。TM の各領域 TME5、TME45、TME456、TMD1、TMD2 遺伝子にはα-ファクター分泌シグナルと His タグを付加した。まず、タンパク質を高生産させるため、各領域遺伝子発現カセットが宿主染色体に複数挿入されたマルチコピー挿入株の取得を試みた。その結果、TME5、TMD1 では 7 コピー挿入株が、TME45、TME456、TMD2 では 3 コピー挿入株の取得に成功した。次に TME45 および TME5 のマルチコピー挿入株を用いてタンパク質生産を行った。1 L の グリセロール培地で 48 時間前培養した菌体を 200 mL の 1.5%メタノール培地に移して 48 時間メタノール誘導を行った。この培養上清を Ni カラムに供し、目的タンパク質を精製した。その結果、タンパク質生産量は TME45 では 39.6 mg/L、TME5 では 14.5 mg/L であった。また、生産された TME45 および TME5 には N-結合型糖鎖付加が認められた。取得した TME45 および TME5 について生理活性を検討したところ、*P. pastoris* 型糖鎖付加されたタンパク質においても、細胞増殖刺激シグナル ERK（extracellular signal-related kinase）の活性化ならびに臍帯静脈血管内皮細胞（HUVEC）の保護作用など、COS 細胞で発現させたタンパク質と同等の生理活性をもつことが認められ、さらに血管内皮細胞保護作用を発揮する最小単位が TME5 であることがわかった。

thrombomodulin, methylotrophic yeast, protein production

講演番号：3A32p08
講演日時、会場：3 月 28 日 15:27～ A 校舎 32 会場

シロアリ共生原生生物由来バイオマス分解酵素の異種生産と解析

Heterologous expression and analysis of woody biomass-decomposing enzyme from symbiotic protists of termites

○小泉 博比古[1]、塚越 光[1]、小田切 正人[2]、守屋 繁春[3,4]、北本 勝ひこ[1]、有岡 学[1]（[1]東大院・農生科、[2]理研 BMEP、[3]横浜市立大、[4]理研抗生物質研）
○Hirohiko KOIZUMI[1], Hikaru TSUKASGOSHI[1], Masato OTAGIRI[2], Shigeharu MORIYA[3,4], Katsuhiko KITAMOTO[1], Manabu ARIOKA[1] ([1]Univ. Tokyo, [2]RIKEN BMEP, [3]Yokohama City Univ., [4]RIKEN Antibiotics lab)

【背景】近年、石油や石炭などの化石燃料の枯渇や地球温暖化などの問題から、バイオエタノールに対する関心が高まっている。木質バイオマスを原料としたバイオエタノール生産は、食料との競合を生じないため注目されているが、木質成分は強固な構造から成るためその分解は容易ではない。シロアリは高効率な木材分解能を持つことが分かっており、その木材分解システムの応用が期待されている。その分解能を支えているのがシロアリ腸内に共生している微生物群である。近年のメタトランスクリプトーム解析によって、シロアリ腸内で多種類の木質バイオマス分解酵素が働いていることが明らかにされた。木質成分は、セルロース・ヘミセルロース・リグニンから成り、バイオエタノールの生産に重要であるセルロースの分解にはヘミセルロースの分解も重要と考えられている。本研究では、ヘミセルロースの主要成分の 1 つであるマンナンを分解する、シロアリ腸内原生生物由来マンナナーゼに関して、メタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* を用いてその生産及び機能解析を行った。

【方法・結果】ヤマトシロアリ *Reticulitermes speratus* の後腸に共生する原生生物群からクローニングされた 3 種類のマンナナーゼ（RsMan26A, RsMan26B, RsMan26E)それぞれがインサートとして入ったプラスミドをエレクトロポレーションにより *P. pastoris* に導入し、形質転換株を得た。ベクターには *P. pastoris* 用ベクターpBGP1 を改変したベクターを用いた。このベクターはグリセルアルデヒド 3-リン酸デヒドロゲナーゼ（GAPDH）のプロモーターである *GAP* プロモーターを使用しており、酵母の生育と同時にタンパク質の生産が行われる。また、目的タンパク質の分泌に関わるキャリアとしては *Saccharomyces cerevisiae* 由来の prepro α-factor 及び *P. pastoris* 由来の分泌タンパク質を用いた。形質転換体は、YPD 培地（Zeocin を添加）で 30℃で 4 日間振とう培養し、培養上清を回収した。得られた酵素（RsMan26A, RsMan26B, RsMan26E）を用いて活性測定を行った結果、ガラクトマンナンである Locust bean gum（LBG）に対する活性が認められた。マンナンは、β-1, 4 結合したマンノースまたはグルコースからなる主鎖に、ガラクトースまたは *O*-アセチル基側鎖の結合した多糖である。その組成により、マンノースのみから成る直鎖マンナン、グルコマンナン、ガラクトマンナン、ガラクトグルコマンナンなどの種類がある。今後 LBG 以外の基質に対する活性と比較し、その基質特異性に関して考察する予定である。

glycoside hydrolase, mannanase, secretion carrier

講演番号：3A32p09
講演日時、会場：3 月 28 日 15:38～ A 校舎 32 会場

酵母の超多コピープラスミドと改良 His タグによるタンパク質高生産精製システムの開発

Development of protein production and purification system using yeast super-multicopy plasmids and an improved His-tag

○喜納 一貴、鈴木 絢子、中村 美紀子、星田 尚司、赤田 倫治（山口大学）
○Kazuki KINA, Ayako SUZUKI, Mikiko NAKAMURA, Hisashi HOSHIDA, Rinji AKADA (Yamaguchi Univ.)

有用タンパク質の高生産とその高度な精製法が求められている。酵母菌での組換えタンパク質生産も実用化されているが，タンパク質高生産のために 2 μm origin を持つ多コピーYEp プラスミドが有用である。コピー数をさらに高める方法として、今までに YEp プラスミド上の選択マーカーのプロモータ領域が削除された *leu2d* 変異を用い, 低い *LEU2* 発現を相補するために超多コピーとなった場合のみ生育できるという方法が知られている。しかし，*leu2d* 変異が最も効率的かどうかはわかっていない。そこで，プラスミド上の *LEU2* と *HIS3* マーカー遺伝子のプロモータと ORF を段階的に削除し，選択マーカー機能を低下させた場合での発現量を比較した。プラスミドは *yEmRFP* がコードされている YEpGAP-Cherry を利用し，*LEU2* または *HIS3* マーカーを挿入した。*yEmRFP* の赤色蛍光タンパク質は，発現量を赤色として肉眼で観察することができる。そこで，培地上での赤色の程度でコピー数を予測することが可能となる。*LEU2* および *HIS3* のプロモータ削除によって、選択培地上で発現量を調整することに成功し，段階的に発現量を上昇させることができた。但し，増殖も影響を受けることがわかった。次に，タンパク質を精製するために，ニッケルビーズに結合する 6 つのヒスチジン（6His）を改良した。より長いポリヒスチジンがニッケルビーズとの親和性を向上させるのではないかと考え、ヒスチヂンの数を増やした。上記の *yEmRFP* に 6His または 12His のポリヒスチジンを N 末と C 末につけ，精製過程を比較した。イミダゾールによるニッケルビーズからの His-RFP の溶出を調べたところ 12His-RFP は 6His-RFP よりも高いイミダゾール濃度で溶出された。これらの結果は、6His よりも 12His の方がニッケルビーズとより強く結合するということを示していると考えられる。以上の結果を組合せることにより，有用タンパク質を酵母で高発現させ，高度に精製するプロセスを作ることができた。

Saccharomyces cerevisiae, 2-micron plasmid, Affinity purification

講演番号：3A32p10
講演日時、会場：3 月 28 日 15:49～ A 校舎 32 会場

分裂酵母のゲノム情報を活用した染色体組込み型異種タンパク質生産系の構築

Development of multicopy gene integration technology of fission yeast

藤木 真優[1]、アリムジャン イディリス[2]、○竹川 薫[1] ([1]九大院・農、[2]旭硝子)
Mayu Fujiki[1], Idiris Alimjan[2], ○Kaoru Takegawa[1] ([1]Kyushu Univ., [2]Asahi Glass)

【目的】モデル真核微生物である分裂酵母は転写翻訳機能等において高等生物と似た特徴を持ち、高等動物由来の異種タンパク質発現用宿主として注目されている。これまで高発現プロモーターに目的遺伝子を連結したプラスミドを用いた異種タンパク質生産法が用いられているが、栄養培地で継代培養を行うとプラスミドの脱落により発現量の低下が起こる。そこでプロモーター及び発現遺伝子の ORF を複数個タンデムに連結した遺伝子断片を、分裂酵母ゲノム上の 1 ヶ所に組み込んだ異種タンパク質発現系が開発されている。しかし、この単座組込みの発現系では継代培養を行っていくにつれタンデムに連結した遺伝子の脱落が起こり、異種タンパク質の発現量が低下するという欠点があった。そこで本研究では分裂酵母ゲノム上に存在するトランスポゾン様配列を利用した新しい異種遺伝子組込み方法について検討を行なった。

【方法および結果】分裂酵母のレトロトランスポゾン *Tf2* はゲノム上に 13 個(第 1 染色体に 8 個; 第 2 に 3 個; 第 3 に 2 個)のコピー配列が存在しており、これらの約 4kb の塩基配列は互いに約 99.7%の高い相同性を持つ。この *Tf2* を標的とした相同組換えでは 13 個の Tf2 座への安定したマルチコピー遺伝子の組込みが可能であることが期待される。そこで今回、目的遺伝子を含む断片の形質転換効率、および異種タンパク質生産能を解析し、条件検討を行うことで、より高効率で安定した異種タンパク生産系の構築を目指した。

Tf2 の相同配列を両端に持ち,*ura4* マーカーとモデルタンパク質として GFP を導入した遺伝子断片を作製し、分裂酵母株への形質転換を行った。獲得した形質転換体について、PCR により目的の断片が組込まれた *Tf2* 座の位置と数を解析した。その結果、13 ヶ所の *Tf2* 座の中で組込みが起こりやすい位置と起こりにくい位置が存在することがわかった。この結果は通常分裂酵母野生株では *Tf2* 座は Tf ボディーというタンパク質複合体で覆われていることが原因と考えられた。そこで Tf ボディー形成に必須なタンパク質である *abp1* 遺伝子破壊株を用い、さらに使用するマーカーとそのプロモーター配列の検討を重ねた結果、13 ヶ所の *Tf2* 座中の 1-8 ヶ所に遺伝子断片が組込まれたコロニーを獲得することができた。複数の *Tf2* 座に異種遺伝子断片が組込まれた株はタンパク質発現量が組み込まれた数に比例して向上したことに加え、栄養培地で継代培養を行なっても安定に発現が持続しており、本法が分裂酵母の異種タンパク生産に有効であることが示された。

Fission yeast, Gene expression, Heterologus protein production

講演番号：3A32p11
講演日時、会場：3 月 28 日 16:10～ A 校舎 32 会場

Aspergillus niger 由来芳香族ポリエステル分解酵素の発見と解析

Discovery and analysis of aromatic polyester-degrading enzyme from *Aspergillus niger*

○老沼 研一[1]、金子 達雄[2]、高谷 直樹[1] ([1]筑波大生命環境、[2]北陸先端大マテリアル)
○Ken-Ichi OINUMA[1], Tatsuo Kaneko[2], Naoki Takaya[1] ([1]Univ. Tsukuba, [2]JAPAN Adv. Inst. Sci. Tech.)

【目的】これまでに様々な微生物由来ポリマー分解酵素が発見されているが、例えば poly(ethylene terephthalate)のような主鎖に高度に芳香環を含むポリエステルの分解酵素は発見されていない。poly(4HCA-*co*-DHCA) (4CDP)は、4-hydroxycinnamic acid (4HCA)と 3,4-dihydroxycinnamic acid (DHCA)を構成単位として持つ新規な芳香族主鎖型ポリエステルである。本ポリマーは土壌中で比較的ゆっくりと生分解されることが示されているが、その分子機構は明らかとなっていない。我々は本ポリマーの分解酵素を自然界から探索し、この分解菌である *Myrothecium* sp. T09 を単離することに成功した。また、各種の市販酵素による 4CDP 分解を検討した結果、*Aspergillus niger* 由来の polygalacturonase 試薬中にこの加水分解酵素が含まれることを発見した。本講演では、特に後者に含まれる酵素の特定と各種解析の結果について報告する。

【方法と結果】*A. niger* 由来 polygalacturonase 試薬から 4CDP の分解活性を指標に酵素精製を試みた結果、硫安分画と 4 種のカラムクロマトグラフィーで、比活性で 42 倍にまで精製された。精製画分は SDS-PAGE でスメアな染色を示したが、Glycopeptidase F で処理し糖鎖を除去したところ、4 種のタンパク質のバンドが得られた。MALDI-TOF MS 解析の結果、マイナーな 3 つはα-glucosidase およびβ-mannosidase であり、主要な 1 種のタンパク質は GDSL Lipase/acylhydrolase ファミリーに属する機能未知タンパク質であることが示された。本ファミリーには、広い基質特異性と多機能性を有する芳香族エステラーゼが含まれている。これらのことから、本ファミリーに属する当該遺伝子産物が目的の酵素であると推察した。*A. niger* ATCC 1015 株を様々な条件で培養し、4CDP 分解活性および本遺伝子の転写レベルを検討したところ、培養液への 4CDP の添加により、酵素活性と遺伝子の発現が同調して誘導されることが判明した。

aromatic polyester, aromatic esterase, *Aspergillus niger*

講演番号：3A32p12
講演日時、会場：3 月 28 日 16:21～ A 校舎 32 会場

in vitro における麹菌由来プラスミン様活性物質の探索

Screening for plasmin-like active substances from *Aspergillus oryzae*

○中村 唱乃、菅 美奈子、山下 裕輔、丸 勇史、吉國 義明、金 武祚（（株）ファーマフーズ)
○ Utano NAKAMURA, Minako SUGA, Yusuke YAMASHITA, Isafumi MARU, Yoshiaki YOSHIKUNI, Mujo KIM (Pharma Foods International Co., Ltd.)

【目的】プラスミンは血中に存在し、血液凝固因子であるフィブリノーゲンやフィブリン中のリシンまたはアルギニン残基の C 末端結合を限定加水分解する酵素である。血管内で血栓が形成されると即時的にプラスミンが作用し、血栓を溶解する。この作用により血管内の恒常性を維持しており、虚血や梗塞を防いでいる。一方、麹菌 *Aspergillus oryzae* は全ゲノム解析が終了し、126 種類ものタンパク質分解酵素遺伝子が存在することが知られている。しかし、プラスミン様活性を持つ酵素はこれまでほとんど同定されていない。そこで我々は、*A. oryzae* がプラスミン様活性物質を生産することを明らかにするため検討を行った。その結果、小麦ふすまを培地とした *A. oryzae* 培養物の水抽出物（麹菌抽出物）に *in vitro* でのプラスミン様活性を見出したので、当該活性物質の精製および同定を行った。

【方法】麹菌抽出物をゲル濾過（Sephacryl S-200）および陰イオン交換（TOYOPEARL DEAE）等の各クロマトグラフィーによって、プラスミン様活性を指標に精製を行った。得られた精製画分を SDS-PAGE で分離後、MALDI-TOF MS にて同定した。

【結果・考察】麹菌抽出物を Sephacryl S-200 を用いて分画したところ、プラスミン様活性のピークは 2 つに分かれた（Fr.1；30～43 kDa, Fr.2；13～30 kDa）。比活性が高かった Fr.2 を TOYOPERAL DEAE を用いて分画したところ、最も比活性が高い画分には SDS-PAGE にて 30、20 および 17 kDa のメジャーバンドで示されるタンパク質が含まれていた。さらに MS 分析の結果、30 kDa は麹菌由来 Alkaline protease (ALP-30K) 、20 kDa は ALP のプロセッシング生成物 (ALP-20K) 、17 kDa は小麦ふすま由来のα-amylase/subtilisin inhibitor (WASI) であることが分かった。このことから、麹菌由来として ALP-30K および ALP-20K が *in vitro* におけるプラスミン様活性を有することが示唆された。さらに、Sephacryl S-200 の分画物において ALP-20K を多く含む画分の比活性が最も高かったことから、ALP-20K が ALP-30K よりも高いプラスミン様活性を示すことが推定された。

今後は 3 つのタンパク質の性質を明らかにするため、さらに分画を進めるとともに、個々の組換えタンパクを作製し、活性部位の解析を行う予定である。

Aspergillus oryzae, plasmin, Alkaline phosphatase

講演番号：3A32p13
講演日時、会場：3 月 28 日 16:32～ A 校舎 32 会場

黄麹菌 *Aspergillus oryzae* 酸性プロテアーゼ欠損株の菌体外プロテアーゼの解析

Analysis of extracellular proteases in *Aspergillus oryzae* acidic proteases deletion strains

○上野 絢子、前田 浩、山形 洋平、竹内 道雄（東京農工大院・応生化）
○Ayako UENO, Hiroshi MAEDA, Youhei YAMAGATA, Michio TAKEUCHI (Tokyo Univ. of Agriculture and Technology)

【目的】黄麹菌 *A. oryzae* RIB40 のゲノム解析の結果、酸性条件下で作用しペプスタチンに阻害されるエンド型プロテアーゼであるアスパルティックプロテアーゼ（APase）をコードすると推定される遺伝子が 11 個存在することが明らかとなった。この 11 の APase は液胞局在、膜局在、菌体外分泌型の 3 種に分類されることが示唆されており、*pepO* 遺伝子は 5 つある菌体外分泌型のうちのひとつである。以前の報告より、APase 遺伝子すべてで mRNA の存在が確認され、転写されていることが示唆された。その一方で菌体外においてタンパク質として検出されたのは PepO のみであった。以上の結果を基に、本研究では *pepO* 遺伝子欠損株（Δ*pepO* ）を作製し、その欠損が他の菌体外の酸性で作用するプロテアーゼに及ぼす影響について調べることを目的とした。
【方法・結果】ダイズタンパク質を窒素源とした培地でΔ*pepO* 株を培養し、その培養上清について、酸性条件下で作用するエンド型プロテアーゼの活性測定を行った。pH 3.0 においてカゼインを基質とした活性測定を行うと、Δ*pepO* 株では野生株 RIB 40 の約 3～4 割程度の活性が認められた。この活性は EDTA、PMSF、ベンザミジン、ペプスタチンによる阻害を受けず、antipain により強く阻害を受けることが明らかとなった。*A. oryzae* は、antipain に阻害され、酸性で作用するエンド型プロテアーゼとして AorsinA を生産することが知られている。Δ*pepO* 株の培養上清には、AorsinA の基質 Z-Arg-Arg-MCA に対して、AMC を遊離する活性が認められた。以上のことからΔ*pepO* 株の培養上清のカゼイン分解活性は、大部分が AorsinA に由来することが明らかになった。すなわち、酸性条件下で作用し、カゼインをエンド型に分解する菌体外プロテアーゼは主に PepO と AorsinA であることが示唆された。Δ*pepO*Δ*aorA* 二重欠損株を作製し、培養上清について pH 3.0 におけるカゼイン分解活性を測定した。その結果、Δ*pepO*Δ*aorA* の二重欠損株でもその培養上清にはカゼイン分解活性がまだ残っていた。さらに、RIB40 に比べ、Δ*pepO*Δ*aorA* の二重欠損株では CPase、AorsinB の活性の上昇が見られた。現在は、各遺伝子欠損株について酸性条件下で作用すると考えられるプロテアーゼ遺伝子の転写について検討中である。

なお、本研究の一部は、生研センター基盤研究推進事業の一環として行われたものである。

Aspergillus oryzae, acidic proteases, extracellular proteases

講演番号：3A32p14
講演日時、会場：3 月 28 日 16:43～ A 校舎 32 会場

麹菌の液体培養における酵素高生産機構の解析
Analysis of the high production mechanism of enzymes for submerged culture of *koji* mold
○田中 光[1]、佐野 元昭[2]、砂川 忠広[1]、小路 博志[1]、大箸 信一[2]、相澤 正幸[1] ([1]アサヒビール・酒技研、[2]金沢工大・ゲノム研)
○ Hikaru TANAKA[1], Motoaki SANO[2], Tadahiro SUNAGAWA[1], Hiroshi SHOJI[1], Shinichi OHASHI[2], Masayuki AIZAWA[1] ([1]Asahi breweries, LTD., [2]Kanazawa Inst. Technol.)

【目的】　麹菌の液体培養は、固体培養と比較して多種類の酵素を同時に高生産することが困難であったため、大規模な酒類製造には用いられてこなかった。我々はデンプン質が穀皮に覆われた状態の大麦（玄大麦）を用いた新規な液体培養法を開発し、液体培養でも複数の酵素を高生産させることに成功した。一方、その酵素同時高生産機構についてはまだ十分には解明されていない。酵素生産の制御メカニズムとして多種の微生物においてカーボンカタボライト抑制（CCR）が知られている。我々は玄大麦の使用による各種酵素の高生産が CCR に関連していると考え、検証を行った。
【方法と結果】　*Aspergillus oyrzae* を用いて、玄大麦とそれをミルにて粉砕したもの（粉砕大麦）を基質として液体培養を行い、培養上清の各種酵素活性を経時的に測定した。その結果、グルコアミラーゼ（GA）、α-アミラーゼ（AA）とも培養前半では粉砕大麦のほうが高かったが、培養後半では玄大麦のほうが高くなった。次に、上記と同じ培養条件で各種遺伝子の発現量をリアルタイム PCR で確認した。*glaA* 及び *glaB* の発現は玄大麦のほうが優位に高く、培養後半での GA 高生産に関連していると考えられた。*creA* の発現は玄大麦のほうが優位に低かった。この結果より、玄大麦を使用することで *creA* の発現が抑制され、CCR が部分的に解除されたため、各種酵素の生産量が向上した可能性が示唆された。
さらに我々は *creA* 遺伝子破壊株を作製し、コントロール株（*pyrG*+）との比較を行った。その結果、コントロール株に比べて *creA* 破壊株のほうが麦の違いに関係なく培養終了時の GA、AA がともに高くなった。*creA* 破壊株では粉砕大麦のほうが玄大麦よりも GA、AA とも早く上昇したが、培養終了時にはほぼ同じ値を示した。これらの結果より、CreA が GA や AA の生産量、生産速度の両方に影響を与えることが示唆された。現在、*creA* 破壊株の各種遺伝子の発現解析を中心に詳細な解析をすすめている。

Aspergillus oryzae, submerged culture, *creA*

講演番号：3A32p15
講演日時、会場：3 月 28 日 16:54～ A 校舎 32 会場

醸造用麹菌における熱誘導を利用した酵素の高生産に関する研究

Heat inducible enzyme production by Aspergillus oryzae

○横山 翔一[1]、吉野 光成[2]、前橋 健二[1]、柏木 豊[1] ([1]東農大院・農・醸造、[2]東農大・応生科・醸造)
○Shoichi YOKOYAMA[1], Mitsunari YOSHINO[2], Kenji MAEHASHI[1], Yutaka KASHIWAGI[1] ([1]Grad. School Agric. Tokyo Univ. Agric., Dept. Ferment. Sci. Tech., [2]Tokyo Univ. Agric., Dept. Ferment. Sci.)

【目的】麹菌は醸造微生物であると共に，酵素等のタンパク質生産に用いられる工業用微生物としても活用され，近年では遺伝子工学的手法によるタンパク質高生産技術が開発されている。遺伝子発現プロモーターとしては種々の高発現遺伝子が知られているが，その中で熱誘導が可能な熱ショックタンパク質プロモーター(Phsp)の利用が考えられる。一方，酵素アスパルチルアミノペプチダーゼ(DAP)は，ペプチドからアスパラギン酸，グルタミン酸を遊離する活性を有する。これらのアミノ酸はうま味を呈し，食品の呈味向上などに役立つことが考えられる。本研究では，熱誘導による麹菌のタンパク質生産のための基礎的な知見を得るために，HSP プロモーターを用いた組換えペプチダーゼの生産条件を検討した。

【方法及び結果】麹菌ゲノムデータベース(DOGAN,NITE)の配列情報より，アスパルチルアミノペプチダーゼ遺伝子 *dapA*(AO090005001447)及び熱ショックタンパク質遺伝子 *hsp30*(AO090701000554)のプロモーター領域(Phsp30)を PCR クローニングした。フュージョン PCR によって融合遺伝子 *Phsp30-dapA* を作製し，プラスミド pPTR I （タカラバイオ）に連結した。次に，プロトプラスト-PEG 法により組換えプラスミドを当研究室にて分離した実用麹菌株に形質転換した。ピリチアミン耐性によって形質転換株をスクリーニングし，*Phsp30-dapA* 導入株 10 株が得られた。この内，DAP 活性が最も高い株(No.3 株)を選択し，DAP の熱誘導条件などを検討した。No.3 株ゲノム DNA 中の *dapA* 遺伝子のコピー数を調べるためサザン解析を行ったところ，野性株では 1 コピーであるのに対し No.3 株は 3 コピー検出されたことから，新たに 2 コピー導入されたことが分かった。次に，No.3 株を YPS(0.5% Yeast extract, 1% Polypeptone, 1% Soluble Starch)液体培地により 25 ℃，24 hr 培養後，温度を 37 ℃に昇温したところ，菌体内 DAP 活性は昇温後 2 hr において約 4 倍に上昇した。酵素活性は Asp-pNA を基質として遊離する pNA を A405 nm を測定することで定量した。酵素 1Unit は 1 分間に 1 μmol の pNA を遊離する酵素量とした。遺伝子発現を Real-Time-RTPCR 解析した結果，同培養条件における *dapA* 遺伝子の発現量は昇温後 1 hr において約 6 倍に上昇した。また，培養初期からの高温培養によって DAP 生産がより高まることが分かった。培養温度 25 ℃及び 37 ℃，24 hr 培養後の DAP 活性はそれぞれ約 10 mU/mg，約 70 mU/mg に達した。野生株の 37 ℃培養と比較すると約 200 倍の酵素生産が得られた。

本研究の一部は一般社団法人中央味噌研究所の研究助成によって支援されたものである。

Koji mold, Enzyme production, Heat shock response

講演番号：3A32p16
講演日時、会場：3 月 28 日 17:15～ A 校舎 32 会場

麹菌における *prtR* 欠損は異種酵素生産量をさせる

PrtR deletion in *Aspergillus oryzae* increases production of heterologous protein

○新川 智、今井 友裕、福浦 麻衣子、光澤 茂信（本田技術研究所）
○Satoru SHINKAWA, Tomohiro IMAI, Maiko FUKUURA, Shigenobu MITSUZAWA (Honda R&D Co., Ltd)

【目的】
バイオリファイナリーの実現には、セルロース系バイオマスの糖化に用いる酵素コストの低減が大きな課題である。その対策として我々は高活性糖化酵素と高性能酵素生産菌の開発に取り組んできた。我々はすでに *Talaromyces cellulolyticus* H1 株由来の糖化酵素をベースに高活性酵素ミックスを所有しており(1)、酵素ミックスを高生産できる菌株の開発が課題であった。そこで我々は、酵素生産能力の高い麹菌を元に、遺伝子改変による酵素生産能力の高い株の開発を検討してきた。麹菌を用いた酵素生産菌開発において問題になるのが、プロテアーゼによる酵素の分解であり、異種酵素生産においては特に顕著である。本研究では、プロテアーゼ関連遺伝子を欠損し、異種酵素生産量を向上させることを目的に検討を行った。
【方法】
菌体内プロテアーゼ遺伝子 2 種（*pepE*、*tppA*）、菌体外プロテアーゼ遺伝子 2 種（*cpI*、*pepA*）、転写因子 1 種（*prtR*）について、独自構築した酵素生産菌 *A. oryzae* HO2 株をベースに、欠損を行った。さらに、5-フルオロオロチン酸を用いたリサイクリング手法によりマーカー遺伝子（*pyrG*）を脱落させた後、*T. cellulolyticus* 由来のセルラーゼ遺伝子 *cbh1* を導入し、各欠損株について CBH1 生産菌を構築した。これらの株を、Polypeptone- Dextrin 培地にて 6 日間培養し、上清中の CBH1 濃度を測定した。
【結果】
元株および各遺伝子欠損株について CBH1 生産量の比較を行った結果、元株では 19.5 mg/L だったのに対して、*pepE*、*tppA* を欠損させた株では、それぞれ 18.9、19.0 mg/L と生産量の低下が見られた。一方で、*cpI*、*pepA*、*prtR* を欠損させた株では、それぞれ 21.3、19.8、21.7 mg/L と生産量の向上がみられた。特に *prtR* の欠損については、*A. fumigatus* において、菌糸成長に悪影響が出ることが報告されており(2)、生産量の低下が予想されたが、生産量向上に対して非常に効果的であることが分かった。現在、*prtR* 欠損が効果的であった要因を解析するため、*prtR* 欠損株の mRNA 発現解析を行っており、本大会において報告予定である。
参考文献（1）特許 国際公開番号　WO 2013/103127
（2）Sharon *et al., Infect Immun* **77**:4051–4060 (2009)

Aspergillus oryzae, Protease, Cellulase

講演番号：3A32p17
講演日時、会場：3 月 28 日 17:26～ A 校舎 32 会場

突然変異誘発処理を行わずに育種した麹菌 *Aspergillus oryzae* の宿主
Construction of non-mutagenized host strains in *Aspergillus oryzae*

○朽方 康裕、利根川 唯、森谷 翔太、中島 春紫 (明治大農・農化)
○Yasuhiro KUCHIKATA, Yui TONEGAWA, Shota MORIYA, Harushi NAKAJIMA (Meiji Univ.)

【背景と目的】麹菌 *Aspergillus oryzae* は高いタンパク質分泌能を有する日本の代表的な醸造微生物であり、さまざまな酵素タンパク質の生産宿主に用いられている。しかし、現在国内で遺伝子工学研究に幅広く用いられている多くの *A. oryzae* の宿主は紫外線照射等による突然変異誘発操作を繰り返して育種されているため、非意図的な変異の蓄積が懸念される。実際に、標準的な野生株 RIB40 株と比較して分生子形成能が 1/3~1/4 程度に低下していることが観察されている。今後の基礎的な *A. oryzae* の分子機構の解明および有用タンパク質生産宿主への応用を見据えると、野生型 RIB40 株に対して突然変異誘発処理を行わずに育種した宿主の取得が望まれる。

野生型 RIB40 株は非相同組換えの頻度が高い(80～90%)ため、導入遺伝子の染色体上への組み込み座位の制御が難しい。そこで、非相同組み換えに関与する *ligD* 遺伝子およびウラシルの生合成に関与する *pyrG* 遺伝子を破壊して新しい宿主の構築を試みた。さらに、外来タンパク質生産の障害となりうる *amyR*(アミラーゼ系転写因子)、*tppA*(トリペプチジルペプチダーゼ)、*pepE*(酸性プロテアーゼ)の破壊株も作製した。

【結果】酒類総研より譲渡された *A. oryzae* RIB40 株について、ピリチアミン耐性遺伝子 *ptrA* の挿入により *ligD* 遺伝子が分断された株を選抜した。次に、相同組換えにより *pyrG* 遺伝子と *ligD* 遺伝子の欠失株(HiMe10 株)を取得した。HiMe10 株は野生型 RIB40 株と同等(2.14×10^7 個/cm^2)の分生子形成能を有しており、従来型の宿主よりも短時間で分生子が形成されることを観察した。また、HiMe10 株に *A. oryzae* のハイドロフォービン HypA/RolA を *enoA* プロモーター制御下で高発現させる P*enoA-hypA* 遺伝子を導入したところ、従来型宿主の NS4RX 株と比較して HypA の生産性が培養上清あたり 1.3～2.0 倍に向上することが認められた。

HiME10 株について外来タンパク質生産能を向上させる目的で、両端に相同領域 300 bp を配置した選択マーカーAnpyrG-MR をリサイクリングマーカーとして繰り返し用いることにより、*amyR*、*pepE*、*tppA* 遺伝子を欠失した HiMe20 株を作製し、α-アミラーゼ活性（Δ*amyR*)、酸性プロテアーゼ活性（Δ*pepE*)、Ala-Ala-Phe-*p*NA を基質として用いたトリペプチジルペプチダーゼ活性（Δ*tppA*)がほとんどゼロになっていることを確認した。現在、HiMe20 株に *Trichoderma reesei* 由来セルラーゼ遺伝子等の導入により外来タンパク質の生産性について検討を行っている。

Aspergillus oryzae, protein production, host strain

講演番号：3A32p18
講演日時、会場：3 月 28 日 17:37～ A 校舎 32 会場

水性二相分配法（ATPS）による麹菌由来 Hydrophobin HypA の分離・濃縮システムの構築

Separation and condensation system of Hydrophobin HypA from *Aspergillus oryzae* using aqueous two-phase system (ATPS).

○中野 宏軌、朽方 康裕、堂前 圭佑、加瀬 明日香、中島 春紫（明治大農・農化）
○ Hiroki NAKANO, Yasuhiro KUCHIKATA, Keisuke DOMAE, Asuka KASE, Harushi NAKAJIMA (Meiji Univ.)

【背景・目的】

Hydrophobin は、糸状菌や担子菌の細胞表層に局在する両親媒性低分子量タンパク質であり、基材表面に吸着して疎水性/親水性を逆転させるなどユニークな性質を持つことから、さまざまな分野への応用が期待されている。しかし、hydrophobin はきわめて吸着・重合しやすい上に再解離が困難なため、硫安沈殿などの沈殿濃縮操作が不可能であり、さらに多くのイオン交換カラムに吸着したまま溶出されないため、回収・精製が非常に困難である。

水性二相分配法（ATPS）とは、二相に分離する水系を利用した基質の分離濃縮法であり、非イオン性界面活性剤を少量加えた溶液が、特定の条件下で相分離する現象を利用する。

筆者らは、麹菌 *Aspergillus oryzae* から hydrophobin をコードする遺伝子(*hypA-D*)を単離し、各々の遺伝子について局在性および発現時期の解析を行ない、固体培養時には HypA/RolA が最も多く発現することを観察している。

本研究では、水性二相分配法(ATPS)を利用した HypA 単量体の分離・濃縮システムの構築、および HypA の物性解析を目的としている。

【方法・結果】

麹菌 *A. oryzae* を宿主とし、液体培養条件下で HypA を高発現する株を作製して培養し、培養上清を回収した。培養上清に 1 M NaCl を加え、非イオン性界面活性剤 Triton X-114 を 3%(v/v)添加して混和し、25℃に保って静置したところ、水相と Triton X-114 相が分離して単量体の HypA が Triton X-114 相に濃縮されることを見いだした。Triton X-114 相を分液し、イソブタノールを添加して Triton X-114 を除去することにより、HypA の濃縮水溶液を得ることができた。さらに、陰イオン交換クロマトグラフィー（CELLUFINE Q-500 m ;JNC Corporation）を行うことにより、簡便な HypA の分離・濃縮システムを構築した。

精製した HypA を用いてテフロン板の表面に被覆し、滴下した水滴の接触角測定を行ったところ、HypA によるテフロン板表面の親水性度の変化が観察された。

hydrophobin, *Aspergillus oryzae*, aqueous two-phase system (ATPS)

講演番号：3A32p19
講演日時、会場：3 月 28 日 17:48～ A 校舎 32 会場

麹菌の Hydrophobin を用いた機能性ペプチドの細胞表層への固定化と提示

Immobilization and display to the cell surface by functional hydrophobin from *Aspergillus oryzae*

○中間 聖、大橋 信太郎、中島 春紫（明治大農・農化）
○Satoshi NAKAMA, Shintaro OHASHI, Harushi NAKAJIMA (Meiji Univ.)

【背景】

Hydrophobin は糸状菌や担子菌の気中構造表層に局在する両親媒性の低分子量タンパク質である。単量体で細胞外に分泌された後、細胞表層で疎水性面を外側に向けて自己集合することにより強固な単層を形成し、菌体に撥水性を付与する。

筆者らは、醤油・味噌・清酒などの生産に用いられる麹菌 *Asprgillus oryzae* から hydrophobin をコードする遺伝子を 4 つ（*hypA-D*）を単離している。これまでの研究により HypA は分生子の表層に局在し、HypB は菌糸の表層に局在することを確認するとともに、その局在性がプロモーターに依存することを明らかにしている。

Hydrophobin の応用利用をめざした基礎研究の一環として、*hypB* 遺伝子に *egfp* 遺伝子を融合して *hypB* プロモーター制御下で発現させることにより、菌糸表層に HypB-eGFP 融合タンパク質を固定化して提示できることを観察している。本研究では、hydrophobin と融合して機能性ペプチドを発現させることにより、*A. oryzae* の表層に機能性ペプチドを固定化提示するシステムを構築することを目的としている。

【方法・結果】

hypB プロモーター制御下で *hypA* 遺伝子および *hypB* 遺伝子に重金属吸着能を持つ His8 配列（HHHHHHHH）を融合して発現する麹菌株を作製し、菌体に提示された His8 配列による重金属の回収能について検討した。まずポリエステル綿と共に菌株を培養し、綿を担体として菌体を固定化した。固定化された菌体を 2 ppm Ni^{2+}溶液中で 1 時間振とうし、次に吸着した Ni^{2+}を EDTA 緩衝液で処理することにより解離した。回収された Ni^{2+}を誘導結合プラズマ発光分光分析法により定量した。その結果、対照株では乾燥菌体重量 1 mg 当たり Ni^{2+} 1.66 nmol 回収されたのに対して、His8 提示株では Ni^{2+} 3.20 nmol 回収され、Ni^{2+}吸着量の増加が認められた。

以上より、細胞表層に機能性ペプチドを固定化するアンカーとしての hydrophobin の有用性が示唆された。

Hydrophobin, *Aspergillus oryzae*, cell surface display

講演番号：3A32p20
講演日時、会場：3 月 28 日 17:59～ A 校舎 32 会場

親水性ドメインを持つ麹菌のハイドロフォービン HypD の機能解析

Characterization of a hydrophobin HypD from *Aspergillus oryzae*

○石倉 幹大、藤井 祐希、土屋 貴寛、稲葉 拓哉、中島 春紫（明治大学・農・農化）
○Kandai ISHIKURA, Yuki FUJII, Takahiro TSUCHIYA, Takuya INABA, Harushi NAKAJIMA (Meiji Univ.)

【背景・目的】

ハイドロフォービンは糸状菌や担子菌が生産する低分子量タンパク質で特徴的な配置の 8 つの Cys 残基を有し、気中菌糸・分生子・子実体等の細胞表層に単層を形成して菌体に撥水性を付与する。

これまでに麹菌 *Aspergillus oryzae* から 3 つのハイドロフォービン遺伝子（*hypA, B, C*）を単離し、各々の発現特性とコードされる HypA, B, C タンパク質の局在性を確認している。本研究では麹菌の 4 つ目のハイドロフォービン遺伝子 *hypD* の構造およびコードされる HypD タンパク質の構造と機能について解析を行った。

【結果・考察】

ゲノムデータベース検索によりハイドロフォービンをコードすると予想された麹菌の機能未知遺伝子について mRNA を単離して塩基配列を決定したところ、8 番目の Cys 残基の後に 63 個の荷電性アミノ酸を含む 93 アミノ酸の超親水性ドメインを持つ全長 207 アミノ酸の新規ハイドロフォービン遺伝子が見いだされ、*hypD* と命名した。通常の培養条件では *hypD* 遺伝子の転写量は非常に低く、水分が不足した環境で転写量の増加が認められた。また、*hypD* 遺伝子が分生子内で発現していることを観察した。

構成的に発現する *enoA* プロモーターの制御下で N 末端側に FLAG タグを挿入した FLAG-HypD を発現する麹菌株を構築した。ウエスタンブロット解析により HypD タンパク質の全長に相当する 25 kDa のバンドの他に 20 kDa のバンドが確認された。この 20 kDa のバンドは HypD タンパク質の C 末端領域中に存在する Lys-Arg 配列が KexB プロテアーゼにより切断されたものであることを確認した。現在、*hypD* 遺伝子の破壊株の作製および HypD タンパク質の大量生産・精製を進めており、機能に関する情報を集積している。

Aspergillus oryzae, hydrophobin, hydrophilic domain

講演番号：3A34a01
講演日時、会場：3 月 28 日 09:00～ A 校舎 34 会場

テルペン系炭化水素 p-menthane の微生物水酸化による有用香料原料の生産
Production of worthy flavour materials by microbial hydroxylation of terpene hydrocarbon, p-menthane
○川瀬 貴斗、玉村 朋大、石田 康行、金政 真、和田 俊夫、塚本 義則 (中部大学応用生物)
○Takato KAWASE, Tomohiro TAMAMURA, Yasuyuki ISHIDA, Shin KANAMASA, Toshio WADA, Yoshinori TSUKAMOTO (Chubu Univ.)

【目的】
モノテルペン炭化水素 *p*-menthane の微生物水酸化による l-menthol を初めとする芳香を有する有用香料原料の生産。
【方法】*p*-menthane を唯一の炭素源とする完全合成培地を用いた好気的培養法により、広く土壌を分離源として芳香を生成する能力を有する微生物のスクリーニングを行った。分離された微生物については、16S rRNA の遺伝子配列の Blast 検索による相同性に基づいて同定を行った。代謝産物については、ガスクロマトグラフ/マススペクトロメトリーを用いて同定を行った。当該微生物のモノテルペンアルコール類に対する基質特異性については、10 種類のモノテルペンアルコールを基質とし、最適生産条件については、炭素源、窒素源、基質濃度、pH、培養温度など各種パラメーターについて検討を行った。
【結果】
(1)425 土壌試料の中から清涼感のあるフレーバーを生成する能力を有する微生物を 1 株分離することができた。当該微生物は 16S rRNA の遺伝子配列の Blast 検索による相同性解析により *Pseudomonas nitroreducens* と同定された。(2)当該清涼感を有するフレーバー成分については、ガスクロマトグラフ/マススペクトロメトリー分析により *trans*-*p*-menthane-1-ol と同定され、trans 型 *p*-menthane の 1 位が立体選択的に水酸化されることが分かったが、主目的であった l-menthaol の生成は認められなかった。しかし、当該微生物は主生成物の *trans*-*p*-menthane-1-ol に加えて、 *p*-menthane の 7、8 及び 9 位がそれぞれ水酸化された化合物も微量生成することが分かった。(3) 10 種類のモノテルペンアルコール類に対する当該微生物の基質特異性について検討した結果、citronellol 及び tetrahydroperillyl alcohol の 2 種類が資化されて、citronellol の代謝産物として citronellol の末端水酸基が酸化された citronellic acid が検出された。(4)主生成物の *trans*-*p*-menthane-1-ol の最適生産条件については、炭素源としては、ラクトースの添加が有効であることが分かった。一方、窒素源については、0.4%のポリペプトンの添加が有効であることが分かった。pH の影響については、pH8.0 が最適であった。無機イオンの影響については、Mg^{2+}が必須であり、Mn^{2+}や Fe^{3+}は必須ではないことが分かった。培養温度については、30℃よりも 35℃の方が優れていた。

p-menthane, hydroxylation, Pseudomonas

講演番号：3A34a02
講演日時、会場：3 月 28 日 09:11～ A 校舎 34 会場

大腸菌を用いた定常期におけるメバロン酸生産

Mevalonate production during stationary phase by *Escherichia coli*

○増田 亜美[1]、戸谷 吉博[1]、徳山 健斗[1]、坂野 聡美[2]、吉川 勝徳[1]、清水 浩[1]（[1]阪大院情報、[2]神大院工）
○ Ami MASUDA[1], Yoshihiro TOYA[1], Kento TOKUYAMA[1], Satomi BANNO[2], Katsunori YOSHIKAWA[1], Hiroshi SHIMIZU[1] ([1]Osaka Univ., [2]Kobe Univ.)

【目的】メバロン酸は植物や酵母などの微生物が作る天然化合物であり、医薬品や農薬、化粧品の原料などに用いられるテルペノイド類の前駆体であることから、近年注目を集めている。そこで我々は、多くの知見が得られており、遺伝子操作のしやすい微生物である大腸菌を利用した効率的なメバロン酸の生産を目指している。微生物による物質生産には、細胞の増殖と目的物質生産が同時に起こる増殖連動型と、増殖が停止したのちに物質生産が行われる増殖非連動型がある。増殖非連動型の物質生産では、基質を細胞合成に使用しないため、より多くの基質を目的物質に変換することが期待できる。我々は、細胞増殖を伴わない定常期における大腸菌のメバロン酸生産性を評価した。
【方法・結果】大腸菌は本来メバロン酸の生合成経路を持たないため、乳酸球菌 *Enterococcus faecalis* のメバロン酸生合成遺伝子 *mvaE* と *mvaS* を導入した大腸菌変異株 MG1655(DE3) / pCOLADuet-*mvaE*-*mvaS* を用いて、グルコースを単一炭素源とした合成培地におけるメバロン酸の生産性を評価した。定常期における生産性を評価するため、細胞合成に必須である窒素源の濃度を制限した培地を用いることで、培養液中にグルコースを残したまま細胞増殖を停止させた。培養液中に含まれるグルコースとメバロン酸を定量したところ、増殖期におけるメバロン酸の炭素収率は 0.27±0.02 C-mol / C-mol、比生産速度は 1.94±0.25 mmol / gDW / h であるのに対し、定常期におけるメバロン酸の炭素収率は 0.43±0.03 C-mol / C-mol、比生産速度は 0.60±0.01mmol / gDW / h であることを明らかにした。本培養実験における定常期でのメバロン酸の収率は、理論収率の 64%である。この結果から、定常期においては増殖期に比べて生産速度は遅いものの、より高い収率でメバロン酸の生産が行えたことが示された。

Mevalonate, *Escherichia coli*, Stationary phase

講演番号：3A34a03
講演日時、会場：3 月 28 日 09:22～ A 校舎 34 会場

微生物生産にむけたビサボレン合成酵素の機能改良

Directed evolution of cellular activity of bisabolene synthase.

○藤井 爽、古林 真衣子、李 伶、岩嵜 美希、河合（野間） 繁子、齋藤 恭一、梅野 太輔（千葉大院・工・共生応化）
○ Akira FUJII, Maiko FURUBAYASHI, Ling LI, miki IWASAKI, Shigeko KAWAI-NOMA, Kyoichi SAITO, Daisuke UMENO (Dept. Appl. Chem. Biotech., Chiba Univ.)

【目的】*A. grandis* 由来のビサボレン合成酵素(AgBIS)は、(1)ビサボレンのバイオディーゼル原料としての秀逸性、(2) 知られるビサボレン合成酵素の中で最大の大腸菌活性を持つことから注目されている。にもかかわらず、AgBIS の酵素活性はテルペン酵素の中でも低く、バイオ燃料生産など高効率生産のコンテキストにおいては、その飛躍的な活性の改良が不可欠である。本研究では進化工学手法を用いた AgBIS の機能向上を試みた。

【方法と結果】AgBIS の活性中心ドメインにランダムな変異を導入し、遺伝子ライブラリを作製した。これらを大腸菌細胞内に導入し、その基質消費活性を評価した。具体的には、大腸菌の中でカロテイノイド色素合成経路を共存させ、その色素蓄積量の少なさ（コロニー色のうすさ）を基質消費能としてスコア化するかたちで、高機能変異体をスクリーニングした。野生型の BIS より優位に基質消費スコアの高かった 7 つの BIS 変異体から 7 つの優性変異が同定された。これらをさまざまな組み合わせで掛け合わせて、さらに基質消費活性の高い変異体を 8 つ得た。得られた BIS 変異体は、細胞内での可溶性が向上していた。また、*in vitro* 解析をおこなったところ、得られた BIS 変異体は、熱安定性が向上していることが示唆された。これらの変異体を用いたビサボレンの大腸菌生産を行ったところ、37℃における生産量は有意に向上した。

terpene, directed evolution, biofuel

講演番号：3A34a04
講演日時、会場：3 月 28 日 09:33～ A 校舎 34 会場

モノテルペン合成酵素の活性進化と微生物生産への応用

Bio-production of Monoterpenes using Laboratory-evolved Enzymes

○岩嵜 美希、古林 真衣子、王 時飛、河合（野間）繁子、斎藤 恭一、梅野 太輔（千葉大院・工・共生応化）
○Miki IWASAKI, Maiko FURUBAYASHI, Shifei WANG, Shigeko KAWAI-NOMA, Kyoichi SAITO, Daisuke UMENO (Dept. Appl. Chem. Biotech., Chiba Univ.)

【目的】モノテルペンは、イソプレノイド経路によって作られる C_{10} 炭化水素の一群であり、香料や抗菌剤として高い需要がある。近年、増殖の速い微生物細胞に植物由来のモノテルペン合成酵素の遺伝子を導入して、効率生産させる試みが盛んにおこなわれている。しかしモノテルペン合成酵素は、テルペン合成酵素の常として、その熱安定性も反応活性も低い。さらに微生物の蓄積量の低いゲラニル二リン酸を原料とするため、効率的な微生物生産が困難であった。本研究は、テルペン合成酵素の基質消費活性をスクリーニングする手法を用いて、ピネン合成酵素の細胞内活性の向上を試みた。

【方法と結果】モノテルペン合成酵素のモデルとして、*Pinus taeda* 由来のピネン合成酵素(PtPS)を選んだ。PtPS の C 末端側の触媒ドメイン全域にランダム変異を導入して、PtPS 変異体の遺伝子ライブラリを作製した。PtPS 変異体の細胞内活性をハイスループットに評価するため、その基質の消費機能によって評価する系を確立した。具体的には、モノテルペンの基質であるゲラニル二リン酸からカロテノイド色素までの経路とともに大腸菌株に導入し、これに上で作製した PtPS 変異体の遺伝子ライブラリを追加導入した。形成させたコロニー（約 1000 個）の中から最もカロテノイド色素の蓄積が少ないコロニーを選抜した。得られた PtPS 変異体の遺伝子で GPP の供給能を強化した大腸菌株を形質転換し、そのピネン生産量を調べたところ、野生型 PtPS で形質転換した株の 2 倍程度のピネン生産量を示した。このとき、フラスコ培養で、培地あたり 100 mg/L を超えるピネン生産を達成した。

monoterpene, directed evolution, high-throughput screening

講演番号：3A34a05
講演日時、会場：3 月 28 日 09:44～ A 校舎 34 会場

ゲノム連続組み換え手法を用いたイソプレノイド生産量の高い大腸菌株の作出

Creation of isoprenoid hyper-producing *Escherichia coli* based on parallel operation of chromosome engineering

○齋藤 聡司、冨永 将大、李 伶、岩嵜 美希、河合（野間）繁子、斎藤 恭一、梅野 太輔（千葉大院・工・共生応化）
○Soshi SAITO, Masahiro TOMINAGA, Ling LI, Miki IWASAKI, Shigeko KAWAI (NOMA), Kyoichi SAITO, Daisuke UMENO (Dept. Appl. Chem. Biotech., Chiba Univ.)

【背景】有価テルペンやカロテノイドの効率的な生産を目指して、多くの大腸菌株が試作されてきた。競合経路の欠損，前駆体経路の過剰発現，バイパス経路の導入から不明なものなど，数多くの遺伝子操作がカロテノイド・テルペン生産効率を高めることが報告されている。しかし，これらの「効果」は，異なる株や遺伝的バックグラウンドの上で評価されたものであり，その評価方法（培養時間や培地の種類，そして測定するイソプレノイド化合物の種類）も不統一であった。本報告では、イソプレノイド増産に資するとされるさまざまな遺伝欠損・挿入操作をひとつの大腸菌内でさまざまな組み合わせで試行し，さらに高い効率でイソプレノイド生産を作出するための知見の集積を目指した。

【実験】テルペン生産に資すると報告された数多くの遺伝子変異のコンビナトリアルな試行を行うために，我々が最近開発した微生物ゲノムの連続編集手法を用いた。この方法は RED システムの変法であり、カナマイシンによるポジティブ選択とヌクレオシドキナーゼ活性を用いるネガティブ選択を，すべて液操作のみで，コロニー選抜操作を挟むことなく連続的に実施できる。この手法を用いて，イソプレノイド生産を高めると報告のある代表的な遺伝子操作を組織的に MG1655 株に導入し，種々の高生産株を同時に作り出すことに成功した。本発表では，作出した大腸菌株のカロテノイド・テルペン合成量への影響を比較した結果を報告するとともに，これら遺伝子操作の加算性の程度についても議論する。

genome engineering, metabolic engineering, isoprenoid

講演番号：3A34a06
講演日時、会場：3 月 28 日 10:05～ A 校舎 34 会場

フラビン依存性酸化酵素を利用したレスベラトロールの位置選択的酸化によるピセアタンノールの合成

Regioselective synthesis of piceatannol from resveratrol by flavin-dependent monooxygenase

○古屋 俊樹[1]、齋 政彦[2]、木野 邦器[1] ([1]早大理工・応化、[2]森永製菓)
○Toshiki Furuya[1], Masahiko Sai[2], Kuniki Kino[1] ([1]Dept. Appl. Chem., Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ., [2]Morinaga & CO., Ltd.)

【目的】レスベラトロールの 3’位が水酸化された構造を有するピセアタンノールは、近年、レスベラトロールより優れた生理活性を示すことが明らかにされつつあり、アンチエイジング素材として食品や化粧品への応用に関心が寄せられている。例えば、コラーゲン産生の促進やメラニン合成の抑制においてピセアタンノールの方が効果的であり、さらに体内吸収率（ラット）はレスベラトロールの約 2 倍であることが明らかにされている。ピセアタンノールは現在、パッションフルーツ種子からの抽出法等により生産されているが、予想される今後の需要増加に備えて新たな生産法を開発することは、その安定供給に向けて重要である。本研究では、レスベラトロールを原料に生体触媒を利用して、その位置選択的酸化によるピセアタンノール合成について検討した。

【方法・結果】当該活性を求めて検討を重ねたところ、*Pseudomonas aeruginosa* 由来の二成分型フラビン依存性酸化酵素 HpaBC がレスベラトロールを位置選択的に酸化し、ピセアタンノールに変換可能なことを見いだした（図 1)。そこで、*hpaBC* 遺伝子を発現させた大腸菌細胞を触媒として、ピセアタンノール合成について検討した。その結果、反応液に界面活性剤 Tween 80 を 1% v/v 添加することにより合成量は大幅に増加し、12 時間で 23 mM（5.2 g/L）のピセアタンノール合成を達成した。また興味深いことに、レスベラトロールが消費された後に、ピセアタンノールがさらに変換されることも見いだした。本変換産物の構造を NMR により解析した結果、ピセアタンノールがさらに水酸化された化合物であることが同定された（図 1)。

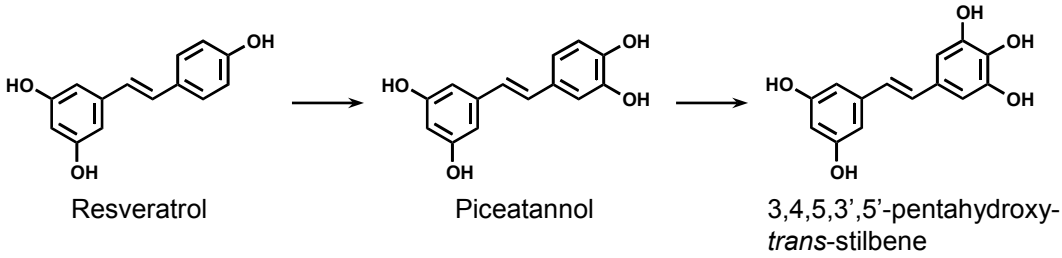


図 1　HpaBC のレスベラトロールおよびピセアタンノールに対する酸化活性

monooxygenase, piceatannol, resveratrol

講演番号：3A34a07
講演日時、会場：3 月 28 日 10:16～ A 校舎 34 会場

ヒドロキシリジン合成に有用な位置・立体選択的水酸化酵素の開発

Development of novel regio- and stereo-selective hydroxylases for the synthesis of hydroxylysine

○原 良太郎[1]、山縣 海[2]、三宅 良磨[3,4]、川端 潤[3,4]、木野 邦器[1,2]([1]早大・理工研、[2]早大理工・応化、[3]三菱化学科学技術研究センター、[4]エーピーアイコーポレーション)
○Ryotaro HARA[1], Kai YAMAGATA[2], Ryoma MIYAKE[3,4], Hiroshi KAWABATA[3,4], Kuniki KINO[1,2] ([1]RISE, Waseda Univ., [2]Dept. Appl. Chem., Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ., [3]Mitsubishi Chemical Group Science and Technology Research Center, [4]API Corporation)

【目的】ヒドロキシリジンは工業的に有用な化合物であるが、効率的な製造法がない。また、医薬品の合成原料としては高い純度が求められるため、その合成においてはヒドロキシ基の位置および立体選択性を厳密に制御することが重要となる。ここで、安価に供給可能なリジンに対して位置・立体選択的にヒドロキシ基を直接導入する酵素が見出されれば、医薬品合成原料としての利用展開が現実のものとなる。本研究では、リジンを直接水酸化可能な酵素を探索し、当該酵素を利用した位置および立体選択的なリジン水酸化プロセスの開発を行った。

【方法・結果】リジン水酸化酵素探索に向けて、基質の構造が類似するアルギニン水酸化酵素およびクラバミン酸合成酵素に着目した。これらの酵素は、塩基性アミノ酸を基質とするにも関わらず、アミノ酸配列における相同性は低かった。我々は、類似の機能未知タンパク質を新たに探索、拡張することにより、従来とは基質特異性の異なる酵素が取得できると期待してゲノム情報を利用した酵素探索を実施した。活性発現に必要なモチーフ 2-His-1-carboxylate facial triad を有し、アルギニン水酸化酵素およびクラバミン酸合成酵素に相同性を示すタンパク質を選択し､系統樹解析から 33 種類をクローニングの候補とした。これらの遺伝子を微生物ゲノムから PCR、または人工遺伝子合成によって取得し、pET-21a(+)ベクターに連結し、発現プラスミドを構築した。当該プラスミドを大腸菌において発現させ、その休止菌体を用いてアミノ酸水酸化反応を実施した。当該反応は 2-オキソグルタル酸依存的に進行すると予想されたため、2-オキソグルタル酸の減少と生成物の増加を HPLC によって検出した。その結果、6 種類のタンパク質においてリジン水酸化活性が確認され、生成物は 2 グループに分けられた。精製酵素を用いた反応においても同様の反応が進行することを確認した。各グループの生成物を精製し、誘導体化して NMR によって構造解析を行ったところ、(3*S*)-3-ヒドロキシ-L-リジン［(2*S*,3*S*)-3-ヒドロキシリジン］、(4*R*)-4-ヒドロキシ-L-リジン［(2*S*,4*R*)-4-ヒドロキシリジン］であることが判明した。

hydroxylysine, lysine hydroxylase, 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase

講演番号：3A34a08
講演日時、会場：3 月 28 日 10:27～ A 校舎 34 会場

オルニチンシクロデアミナーゼを利用した有用ヒドロキシイミノ酸合成プロセスの開発

Development of synthesis of hydroxyimino acids using ornithine cyclodeaminase

○北辻 早希[1]、山縣 海[1]、原 良太郎[2]、木野 邦器[1,2] ([1]早大理工・応化、[2]早大・理工研)
○Saki KITATSUJI[1], Kai YAMAGATA[1], Ryotaro HARA[2], Kuniki KINO[1,2] ([1]Dept. Appl. Chem.,Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ., [2]RISE, Waseda Univ.)

【目的】環状ヒドロキシイミノ酸であるヒドロキシピペコリン酸 (HPA) やヒドロキシプロリン (Hyp) は医薬品原料として工業的に有用である。いずれも我々のこれまでの研究で L-ピペコリン酸や L-プロリンの水酸化により合成可能となっているが、L-プロリン *cis*-4-水酸化酵素による L-ピペコリン酸の水酸化反応では *cis*-3-HPA と *cis*-5-HPA を同時生成するため、高選択的かつ HPA の多様な異性体に対する合成法の開発が課題となっている。そこで、光学活性なヒドロキシリジン (HYL) およびヒドロキシオルニチンを酵素合成した後、環化により目的の HPA や Hyp を合成するプロセスを検討した。

【方法】根粒菌 *Agrobacterium* sp.などの微生物はアルギニン代謝経路において、L-アルギニンをアルギナーゼにより L-オルニチンへ変換し、さらにオルニチンシクロデアミナーゼで環化して L-プロリンを生成する。我々は根粒菌 *Mesorhizobium loti* MAFF303099 由来の両酵素がそれぞれ(2*S*,3*S*)-3-ヒドロキシアルギニン、(2*S*,3*S*)-3-ヒドロキシオルニチンを基質として認識可能なことを見出し、(2*S*,3*S*)-3-ヒドロキシアルギニンから *trans*-3-Hyp の合成が可能であることを報告した[1)]。そこで、L-オルニチンと L-リジンの構造類似性から、オルニチンシクロデアミナーゼは各種 HYL も基質として認識し、対応する HPA が合成可能であると推測した。本研究では、入手可能な HYL を基質としてオルニチンシクロデアミナーゼを用いた精製酵素反応を実施し、HPLC および MS によって生成物を確認した。

【結果】当研究室で見出した L-リジン 3*S*-水酸化酵素および 4*R*-水酸化酵素を用いて L-リジンから (2*S*,3*S*)-3-HYL および(2*S*,4*R*)-4-HYL を合成した[2)]。これらの化合物に対しオルニチンシクロデアミナーゼを用いた環化反応を行い、*trans*-3-HPA および *cis*-4-HPA が合成可能であるか検討した。その結果、*cis*-4-HPA と予想される化合物は HPLC で検出できたが、*trans*-3-HPA に相当する化合物ピークは得られなかった。また、市販の DL-5-HYL を基質としたときは *cis*-5-HPA と *trans*-5-HPA を同時生成したが、(2*S*,5*R*)-5-HYL を基質としたときは *trans*-5-HPA の生成のみが確認された。以上の結果から、*M. loti* MAFF303099 由来のオルニチンシクロデアミナーゼは比較的広範な基質特異性を有し、*trans*-3-Hyp のみならず *cis*-4-HPA、*cis*-5-HPA、*trans*-5-HPA の合成にも利用可能であることが明らかになった。

1) 山縣ら、日本農芸化学会 2014 年度大会講演要旨集、2A10a16
2) 原ら、日本生物工学会 2014 年度大会講演要旨集、1P-104

ornithine cyclodeaminase, hydroxyproline, hydroxypipecolic acid

講演番号：3A34a09
講演日時、会場：3 月 28 日 10:38～ A 校舎 34 会場

エクトイン水酸化酵素の特性解析とヒドロキシプロリン類縁化合物合成への応用

Characterization of ectoine hydroxylase and its application to the synthesis of hydroxyproline derivatives

原 良太郎[1]、○西川 健幸[2]、纐纈 健人[3]、木野 邦器[1,2] ([1]早大・理工研、[2]早大理工・応化、[3]協和発酵バイオ)
Ryotaro HARA[1], ○Takeyuki NISHIKAWA[2], Kento KOKETSU[3], Kuniki KINO[1,2] ([1]RISE, Waseda Univ., [2]Dept. Appl. Chem., Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ., [3]KYOWA HAKKO BIO)

【目的】ヒドロキシプロリン（Hyp）は医薬品や化粧品の合成原料として工業的に有用な化合物である。Hyp には位置および立体異性体が存在し、このうち *trans*-4-Hyp、*cis*-3-Hyp、*cis*-4-Hyp は L-プロリンから選択的に合成可能な酵素が既に知られており、実用生産に利用されている。最近、L-プロリンを直接水酸化し、*trans*-3-Hyp を合成する酵素が報告されたが [1)]、活性が極めて低く、*trans*-3-Hyp よりも *trans*-4-Hyp を約 8 倍多く生成する問題があり、*trans*-3-Hyp を選択的に合成する酵素は未だ発見されていない。一方、我々は、プロリンと構造が類似するエクトインの水酸化酵素（EctD）に着目し、EctD およびそのホモログタンパク質におけるプロリン水酸化活性を評価し、L-プロリンから *trans*-3-Hyp を位置および立体選択的に合成することに成功している [2)]。本研究では、新規水酸化酵素を用いた *trans*-3-Hyp 生産プロセスの開発に向けて、当該酵素の特性解析を実施し、菌体反応系による *trans*-3-Hyp の生産を検討した。

【方法・結果】プロリン水酸化活性を有することが明らかになった好塩菌 *Halomonas elongata* 由来 EctD の遺伝子情報をもとに数種類のホモログ酵素を見出したが、その中で最も高いプロリン・エクトイン水酸化活性を示した *S. cattleya* 由来 EctD の特性解析を行った。反応は 2-オキソグルタル酸（2-OG）依存的に進行し、Mn^{2+}、Co^{2+}、Zn^{2+}、Cu^{2+}、Ni^{2+}などの二価の金属イオンおよび EDTA により酵素活性が阻害され、Fe^{2+}と配位すると予想されるアミノ酸残基（H150、D152、H251）に部位特異的変異を導入することで活性が消失した。また、当該酵素の基質特異性を検討したところ、L-プロリン、エクトインの他に、3,4-デヒドロ-L-プロリンなどに対しても水酸化活性を示し、Hyp 類縁化合物の合成も可能であった。次に、菌体反応系での *trans*-3-Hyp 生産を検討した。基質となるプロリンの分解を遮断するため、プロリンデヒドロゲナーゼ遺伝子欠損株（*putA*$^-$）を宿主として利用した。*S. cattleya* 由来 EctD を高発現させた組換え大腸菌を用いた反応系で、L-プロリンと 2-OG を添加して *trans*-3-Hyp の生産を行ったところ、L-プロリンの消費に応じて *trans*-3-Hyp への変換が確認された。また、2-OG 無添加においてもグルコースの添加によって *trans*-3-Hyp が生産され、2-OG は大腸菌のグルコース代謝系で供給されることが示された。

1) Houwaart, S. et al., *Chembiochem*. **15**, 2365-2369 (2014).
2) 原ら、日本生物工学会 2014 年度大会講演要旨集、1P-103

trans-3-hydroxyproline, ectoine hydroxylase, 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase

講演番号：3A34a10
講演日時、会場：3 月 28 日 10:49～ A 校舎 34 会場

立体構造解析に基づく L-アミノ酸リガーゼの改変と塩味増強効果を有する Met-Gly の選択的合成法の開発

Alteration of the substrate specificity of L-amino acid ligase and selective synthesis of Met-Gly as a salt taste enhancer

○木野 はるか[1,2]、木野 邦器[1]（[1]早大理工・応化、[2]長谷川香料（株））
○Haruka KINO[1,2], Kuniki KINO[1]（[1]Dept. Appl. Chem., Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ., [2]T. Hasegawa Co., LTD.）

【目的】ジペプチドはそれを構成するアミノ酸単体には認められない機能を有することが多い。我々はこれまでに、無保護のアミノ酸を直接連結して任意のジペプチド合成を可能とする L-アミノ酸リガーゼ（Lal）の探索と新たな機能発掘に向けたジペプチドライブラリーの構築を行ってきた。実際に、当該ジペプチドライブラリーを利用して塩味増強効果を有するジペプチドの探索を行い、Met-Gly にその効果があることを見出している[1)]。さらに、N 末端基質として Met を強く認識する *Bacillus licheniformis* 由来の Lal：BL00235[2)]を用いると、Met-Gly を効率的に合成できることも報告している[1)]。本発表では、Met-Gly のさらなる選択的合成を目的に、部位特異的変異導入による酵素の機能改変を検討した。

【方法および結果】BL00235 は Met と Gly を基質としたとき、Met-Gly が主生成物となるが、同時に Met-Met も生成する。Met-Gly の選択的合成を目的に、既に明らかにしている BL00235 の結晶構造情報[3)]を踏まえて当該酵素の基質特異性の改変を検討した。*B. subtilis* 由来 Lal：YwfE の結晶構造（PDB:3VMM）との比較解析を行い、85 位の Pro 残基が C 末端アミノ酸基質との親和性に関与していると推測した。そこで、85 位の Pro 残基を側鎖の嵩高いアミノ酸に置換することで、C 末端アミノ酸基質認識周辺のスペースが空間的に狭くなり、その結果、側鎖の大きな Met は認識されず、側鎖の小さい Gly のみが選択的に C 末端基質として認識されると考えた。実際に、部位特異的変異導入によって 85 位の Pro 残基を嵩高い側鎖を有する芳香族アミノ酸である Phe に置換したところ、その変異酵素 P85F を用いた反応では、Met と Gly を基質とした場合、野生型では 1.3 mM 生成した Met-Met の生成は認められず、Met-Gly が選択的に合成されることを見出した。さらに Met のみを基質とした場合、野生型では 15.8 mM の Met-Met が生成したが、変異酵素 P85F では生成しなかった。これらの結果は、Lal の構造情報から推測した特定のアミノ酸残基の一置換変異によって、C 末端アミノ酸の基質認識が予想したように変化したことを示すものである。立体構造情報に基づいて改変した Lal による目的ジペプチドの選択的合成の成功は初めての報告となる。

1) 木野ら, 日本生物工学会 2014 年度大会講演要旨集 p34, 1P-067.
2) Kino, K. *et al.*, *J. Biosci. Bioeng.*, **106**, 313-315 (2008).
3) Suzuki, M. *et al.*, *Acta Cryst.*, **D68**, 1535-1540 (2012).

L-amino acid ligase, salt taste enhancer, dipeptide

講演番号：3A34a11
講演日時、会場：3 月 28 日 11:10～ A 校舎 34 会場

改良型 DpkA とグルコース脱水素酵素による *N*-メチル-L-フェニルアラニンの合成

Synthesis of *N*-methyl-L-phenylalanine by engineered DpkA and glucose dehydrogenase

○岡田 凌[1]、松井 祐士[1]、山川 匠[1]、村松 久司[1]、山本 浩明[2]、永田 信治[1] ([1]高知大農、[2]株式会社ダイセル)
○ Ryo OKADA[1], Yuji MATSUI[1], Takumi YAMAKAWA[1], Hisashi MURAMATSU[1], Hiroaki YAMAMOTO[2], Shinji NAGATA[1] ([1]Kochi Univ., [2]Daicel Corp.)

【目的】光学活性 *N*-メチルアミノ酸は様々な医薬品の合成原料として有用である。*Pseudomonas putida* NBRC100650 を由来とする *pp3591* 遺伝子産物（DpkA）は NADPH を補酵素として 2-オキソ酸とメチルアミンから *N*-メチル-L-アミノ酸を合成する脱水素酵素活性を持ち、種々の *N*-メチル-L-アミノ酸の不斉合成に利用できる。DpkA を用いて効率良く *N*-メチル-L-アミノ酸を生産するためには、本酵素反応により生じた $NADP^+$をグルコース脱水素酵素（GDH）で再酸化する必要があり、高い安定性を持つ DpkA と GDH を取得できれば生産効率の高い *N*-メチル-L-アミノ酸生産システムを構築できる。そこで、本研究ではエラープローン PCR および部位特異的変異導入で DpkA と *Bacillus subtilis* 由来 GDH（BsGDH）を安定化し、これら変異酵素を用いて *N*-メチル-L-フェニルアラニンの合成を試みた。
【方法・結果】*pp3591* を pET21a(+)に連結したプラスミドを鋳型にエラープローン PCR を行い、PCR 産物を pUC18 に連結して *Escherichia coli* JM109 を形質転換した。変異型 DpkA を発現する形質転換体の粗酵素液を調製し、40、45、50℃で 30 分間処理して活性測定し、耐熱性が改善された 2 種類の変異型 DpkA (V117M、Q302R)を得た。また、部位特異的変異導入によりこれらの変異を合わせ持つ二重変異酵素（V117M/Q302R）を作製した。野生型 DpkA、V117M、Q302R、V117M/Q302R をそれぞれ精製し、安定性を比較した。30～55℃、30 分間それぞれの酵素を加温して残存活性を測定した結果、安定性は V117M/Q302R＞V117M＞Q302＞野生型 DpkA の順に高かった。さらに、野生型 DpkA と V117M/Q302R を 30℃で加温し続けると、野生型 DpkA は 1 日で失活したのに対し、V117M/Q302R は 7 日後においても 88%の残存活性を示した。V117M/Q302R は pH に対する安定性も向上しており、30℃、pH5.0～11.0 で 30 分間加温すると、野生型 DpkA は pH6.5～9.0 で 80%以上の活性を維持したが、V117M/Q302R は pH5.0～11.0 のより広い範囲で 80%以上の活性を維持した。また、野生型 DpkA と V117M/Q302R はともに 2-オキソ酸に対して広い基質特異性を示し、キネティックスも同等の特性を示したことから、V117M/Q302R は様々な *N*-メチル-L-アミノ酸の合成に利用できると考えられた。*B. megateirum* 由来 GDH に E170K、Q252L 変異を導入すると安定性が向上することが報告されており、（*J. Biol. Chem*. 264 p.6381–6385. 1989、*A. Microbio. Biotech.* 61 p.329–335. 2003）BsGDH にも同様に E170K、Q252L 変異を導入したところ安定性が向上した。そこで、変異型 DpkA（V117M/Q302R）と変異型 BsGDH（E170K/Q252L）の共発現大腸菌を構築し、*N*-メチル-L-フェニルアラニンの合成を試みた。

N-methy-L-amino acid, asymmetric synthesis, evolutionary engineering

講演番号：3A34a12
講演日時、会場：3 月 28 日 11:21～ A 校舎 34 会場

P450BM3, P450bzo による芳香環を有するカルボン酸、アミンの生変換

Bioconversion of armatic compounds which possess carboxylic acid and/or primary amine by P450BM3 and P450bzo

○新藤 一敏[1]、杉山 牧[1]、中村 悠里[1]、三沢 典彦[2]([1]日本女子大・家政・食物、[2]石川県立大・生物資源工学研)
○Kazutoshi SHINDO[1], Maki SUGIYAMA[1], Yuri NAKAMURA[1], Norihiko MISAWA[2] ([1]Japan Women's Univ., [2]Ishikawa Pref. Univ.)

【目的】我々は種々のシトクロム P450 遺伝子を発現した組換え大腸菌を用いて、様々な化合物への水酸基導入による新規または希少化合物の効率的な創製を目指している。今回は芳香環への水酸基導入に優れた能力を有することが判明している P450BM3(F87V)(CYP101A)及び P450bzo (CYP203A；メタゲノム由来）を用いて、ベンゼン環またはナフタレン環にカルボキシ基あるいはアミノ基を有する化合物の変換を実施し、それぞれの CYP の特徴を調べると共に、有用な新規・希少化合物の創製を試みた。カルボキシ基、アミノ基を有する化合物はビルディングブロックとして医薬品などへの利用が期待できるほか、フェノール性水酸基の存在により抗酸化活性を有することが期待されるため、同活性についても検討した。
【方法】P450BM3(F87V) または P450bzo 遺伝子を組み換んだ大腸菌と基質を、高好気性条件下、基質と共培養による生変換を行った。得られた変換物は溶媒分画、シリカゲルカラムクロマトグラフィー、分取 ODS HPLC 等によって精製後、NMR 及び HRMS 解析により構造決定を行った。さらに得られた化合物について、DPPH ラジカル消去活性評価およびラット脳脂質過酸化抑制評価系により抗酸化活性の検討を実施した。
【結果】カルボキシ基を有するベンゼン環化合物 (3 種)、アミノ基を有するベンゼン環化合物 (4 種)・ナフタレン環化合物 (2 種)、および両官能基を有する tyrosine について検討を行った。その結果、P450bzo で 4‐hydroxy benzoic acid のみ変換反応は進行した。そこでカルボキシ基、アミノ基をそれぞれ脱離が容易なメチル化、Boc 化保護した化合物について同様に変換を実施したところ、[P450BM3(F87V)、P450bzo]で保護カルボキシ基或いはアミノ基を有するベンゼン環化合物[5 種、1 種] (P450bzo で変換反応が進行した基質は P450BM3(F87V)でも変換反応が確認された。しかし変換物は異なっていた。)、ナフタレン環化合物[2 種、0 種]で変換反応が進行した。また、カルボキシ基、アミノ基を両保護した tyrosine では、P450BM3(F87V)、P450bzo 共に同一位の変換物を与えた。なお変換収率は 3～65%と基質によってかなり異なった。
得られた変換物の多くは、DPPH ラジカル消去活性評価およびラット脳脂質過酸化抑制評価系において基質と比較して優れた抗酸化活性を示すことが確認された。

P450, aromatic compounds, bioconversion

講演番号：3A34a13
講演日時、会場：3 月 28 日 11:32～ A 校舎 34 会場

Royal jelly に特異な稀少脂肪酸(*E*)-10-hydroxy-2-decenoic acid の二段階発酵生産

Two-step fermentative production of (*E*)-10-hydroxy-2-decenoic acid specific rare fatty acid in royal jelly

○梶 真介[1]、岡 慶太[2]、木下 翔也[2]、倉田 淳志[2]、岸本 憲明[2] ([1]近畿大院農、[2]近畿大農)
○Shinsuke KAJI[1], Keta OKA[2], Shoya KINOSHITA[2], Atsushi KURATA[2], Noriaki KISHIMOTO[2] ([1]Kinki Univ. Grad. Sch., [2]Kinki Univ.)

【背景・目的】

ミツバチが作るローヤルゼリーに特異な稀少脂肪酸(*E*)-10-hydroxy-2-decenoic acid(10HDA)には様々な生理活性が知られている。しかし、10HDA の生産量は少なく高価であるため、10HDA のさらなる生理活性の研究の障害となっている。本研究では、decanoic acid(DA)を starting material として、*Pseudomonas putida* KT2442 と *Candida maltosa* KU2-106 を用いた二段階発酵で、10HDA を安価に高生産する方法を開発することを目的とした。

KT2442 株　　KU2-106 株
DA--------→3-hydroxydecanoic acid(3OHDA) → 2-decenoic acid(2DA)--------→10HDA

【方法・結果】

供試菌株には、*P. putida* KT2442 と *C. maltosa* KU2-106 を用いた。KT2442 株は sodium decanoate(18.16 g/L)添加 E2 培地で 30 h 培養(2.5 L, 30℃, 380 rpm, 1.4 vvm)すると、菌体内に polyhydroxyalkanoic acid(PHA)を蓄積した。洗浄菌体を 50 mM glycine-NaOH buffer(pH10.6)に再懸濁して 30℃、10 h、250 rpm で攪拌すると、3-hydroxyoctanoic acid(3OHOA)と 3OHDA が buffer 中に放出された。懸濁後の菌体を透過型電子顕微鏡で観察すると、蓄積されていた PHA が消失していた。3OHOA と 3OHDA は methyl tertiary butyl ether で抽出し、50%硫酸存在下で加熱(80℃、3 h)して、2DA と 2-octenoic acid(2OA)に変換した。2DA は分取 HPLC で単離した。

2DA 添加 LM 培地に *C. maltosa* KU2-106 株を培養した(2.5L, 28℃, 350 rpm, 1.4 vvm)ところ、glucose は培養 36 - 48 h 後に消失した。glucose を追添加せずに培養すると 10HDA の生産量は 0.96 g/L(96 h 培養)にとどまったが、glucose を追添加すると 10HDA の生産量は 2.81 g/L まで上昇した。しかし、10HDA とともに(*E*)-dec-2-enedioic acid (2DDA)も生産された。そこで、アルコール脱水素酵素阻害剤である 4-methylpyrazole を添加して培養すると、2DDA の生成は抑制され、10HDA を 2.7 g/L 生産することができた。

(*E*)-10-hydroxy-2-decenoic acid, Decanoic acid, fermentative production

講演番号：3A34a14
講演日時、会場：3 月 28 日 11:43～ A 校舎 34 会場

リジンから効率的にカダベリンを生産する大腸菌の育種

Cadaverine production by *Escherichia coli*

○青柳 隆大、松岡 利奈、鈴木 秀之（京都工繊大院応生）
○Takahiro AOYAGI, Rina MATSUOKA, Hideyuki SUZUKI (Kyoto Institute of Technology)

カダベリンは 5 つの炭素を持つジアミンである。語源の cadaverous「死体のような」が示す通り、自然界では微生物が作り出す腐敗臭の原因物質の一つである。工業面において、カダベリンは微生物により生産可能な化成品中間体として注目されている。薬や肥料、特にポリアミドなどのエンジニアリングプラスチックの原料としての利用が期待され、スマートフォンや自動車部品などの様々な製品への活用が見込まれる。

カダベリンを合成できる微生物の一つが大腸菌である。大腸菌は環境が酸性になると、カダベリンを産生することで酸に対応するシステムを持つ。このシステムはリジン・カダベリンアンチポーター（CadB）とリジンデカルボキシラーゼ（CadA）からなり、CadB と CadA をコードする遺伝子はオペロンを組み、細胞外リジンの存在と酸性条件によって発現が誘導される。CadB は細胞外リジンの取り込み・細胞内カダベリンの放出を行うアンチポーターとして働き、CadA はリジンからカダベリンを合成する働きを持つ。また、大腸菌はもう一つのリジンデカルボキシラーゼ（LdcC）を持ち、こちらは pH の条件に拘わらず生育の定常期に発現している。

ここでは、大腸菌を代謝工学的手法で改良し、リジンを基質とした効率的なカダベリン生産を試みた。

カダベリンを大量に合成させるため CadA, LdcC を多量発現させることに加え、生育の阻害にならない程度に CadB を発現するようなプラスミド（pQE-80L :: *cadA*$^{+}$ *ldcC*$^{+}$ *lacIp*$^{+}$*-cadB*$^{+}$）を構築した。まず、*lac* リプレッサーのプロモーター（*lacIp*）を持つプラスミドに *cadB* 遺伝子をクローニングした（pQE-80L :: *lacIp*$^{+}$*-cadB*$^{+}$）。このプラスミドを *ΔcadB* 株に導入した結果、リジン取り込み・カダベリン放出が回復したことから、*lacIp-cadB* が発現することを確認した。続いて、強発現プロモーター（*T5p*）下に *cadA* 遺伝子と *ldcC* 遺伝子がオペロン構造をとるようにクローニングしたプラスミドへ *lacIp-cadB* を挿入した。より多くのリジンを細胞内へ取り込ませ、合成されたカダベリンを直ちに細胞外へ放出させることで、効率的にカダベリンを生産できると考えた。このプラスミドを持つ大腸菌株を M9-0.2%グルコース+リジン培地で培養した結果、培地中リジンのほぼ全量がカダベリンへ変換された。さらに CadA, LdcC の発現を IPTG で誘導させた結果、カダベリン生産速度を速めることができた。

cadaverine, lysine decarboxylase, lysine/cadaverine antiporter

講演番号：3A34p02
講演日時、会場：3 月 28 日 14:11～ A 校舎 34 会場

芳香族アミノ酸の生産における *aroA* 遺伝子高発現の収率向上への寄与
Impact of *aroA* overexpression on production of aromatic amino acids
○駒 大輔、山中 勇人、森芳 邦彦、大本 貴士（阪市工研）
○Daisuke KOMA, Hayato YAMANAKA, Kunihiko MORIYOSHI, Takashi OHMOTO (OMTRI)

【目的】これまでに芳香族化合物の合成・変換に関わる遺伝子をさまざまな生物種から取得してきた。それらを大腸菌の染色体に導入して、芳香族アミノ酸であるフェニルアラニン（Phe）とチロシン（Tyr）の代謝経路を拡張することにより、バイオマス由来原料からさまざまな芳香族化合物を生産することに成功した（Koma et al. 2012. Appl. Environ. Microbiol. 78:6203-16）。この生産系では、芳香族化合物の生産量は芳香族アミノ酸の合成量に関係することから、芳香族アミノ酸を高収率に合成することが望ましい。そこで、本研究では芳香族アミノ酸の収率を向上させる遺伝的な因子の探索を行った。

【方法および結果】Phe および Tyr 合成に関わるシキミ酸経路の初反応は、ホスホエノールピルビン酸（PEP）とエリスロース-4-リン酸（E4P）からの 3-デオキシ-D-アラビノヘプツロソネート-7-リン酸（DAHP）の合成である。よって、Phe および Tyr の生産量を向上させるためには、DAHP の前駆体である PEP と E4P の合成量を向上させることが重要である。これまでの報告において、Phe および Tyr 合成の中間体であるシキミ酸の生産菌の育種では *ppsA*（ピルビン酸の PEP への再生）と *tktA* 遺伝子（E4P の合成）の高発現が有効であることから、Phe や Tyr 生産菌の育種でもこれらの高発現が有効であると考えられている。そこで本研究では、*E. coli* BW25113 より派生した Phe 生産菌 AR-G91 株 [P_{T7lac}-*aroF*^{fbr} P_{T7lac}-*pheA*^{fbr} *tyrR* λDE3] の染色体に P_{T7lac}-*tktA* と P_{T7lac}-*ppsA* を導入して、同時に高発現させた。しかしながら、予想に反して *tktA* 遺伝子の高発現によって Phe 生産量は大幅に低下した。宿主に用いる株の種類を変更した場合でも同様の傾向が見られたことから、この現象は大腸菌で一般的に起こりうる現象であることが示唆された。

そこで、*ppsA* と *tktA* 遺伝子を高発現させた状態で Phe 生産量が向上するような遺伝的因子の探索を行った。その結果、シキミ酸経路中の *aroA* 遺伝子を高発現した場合に Phe 生産量が大幅に増加することを見出した。*aroA* 遺伝子の高発現は、Phe 生産菌の育種と同様に、Tyr 生産菌の育種においても非常に効果的であった。現在、*tktA* と *aroA* 遺伝子の発現量および Phe 生産量についての関連性についての解析を行っているところである。

aromatic amino acid, shikimate pathway, metabolic engineering

講演番号：3A34p03
講演日時、会場：3 月 28 日 14:22～ A 校舎 34 会場

生体触媒を用いた AOH の合成

Synthesis of AOH by biocatalysis

○菊池 礼花、崔 宰熏、河岸 洋和、徳山 真治（静岡大農）
○Ayaka KIKUCHI, Jae-Hoon Choi, Hirokazu KAWAGISHI, Shinji TOKUYAMA (Shizuoka Univ.)

【背景・目的】

公園，ゴルフ場などで，芝が輪状に繁茂し，時には成長が抑制されたり，枯れたりし，後にキノコがリング状に発生する。この現象をフェアリーリング（ 妖精の輪）と呼ぶ。フェアリーリング惹起化合物として 2-Azahypoxanthine（ AHX ）が分離同定された。さらに，AHX を添加した植物から，植物生長促進活性を示す化合物として 2-Aza-8 oxohypoxanthine（AOH ）が分離された。圃場試験で有効性を実証するためには AHX および AOH が一定量必要になる。しかし，AOH は化学合成が難しく，市販の Xanthine oxidase（ XOD ）を用いた酵素合成法で少量の AOH 合成が可能である。XOD を用いた酵素合成法では，反応液の基質濃度が低く，操作が煩雑であり，市販 XOD は非常に高価である。そこで, 効率的な AOH 合成法の確立を目指し, 微生物菌体を用いた AOH 合成法を検討した。

【方法】

AHX および AOH の定量は，HPLC（C30-UG-5 カラム，0.02% TFA，30 ℃，254 nm）を用いて行った。Xanthine oxidase（ バターミルク由来 ）はオリエンタル酵母から購入した。休止細胞反応は，基質 AHX 70 μg/mL，PBS（pH7.4），30 ℃，150 rpm で行った。フラスコスケール（100 ml）での反応は，AHX 4 mg/mL，40℃で行った。微生物の培養は TSB 培地を用いて，30℃で行った。

【結果】

A1 株は保存菌株の中で最も高い AOH 合成活性を示した。A1 株を含む保存菌株を TSB 等の培地で 20-24 時間培養後, 洗浄した菌体を用いて休止菌体反応（AHX 70 μg/mL，24 時間 ）させたところ，A1 株のみが全ての AHX を AOH に変換した。つぎに，A1 株の培養条件および反応液の菌体濃度, 基質濃度, 温度などを検討し, AHX 4mg/mL, 40℃を最適反応条件とした。フラスコスケール（100 ml）で A1 株を用いて菌体反応させたところ, 0.4g の AHX から約 0.32g の AOH を合成した（ モル収率約 70% ）。A1 株の菌体を用いた AOH 合成法では，XOD を用いた合成に比べ，基質濃度 60 倍の条件で効率的に AOH を合成することが可能になった。

biocatalysis, AOH, AHX

講演番号：3A34p04
講演日時、会場：3 月 28 日 14:33～ A 校舎 34 会場

大腸菌を利用した医薬中間体候補化合物であるメチル化ノルラウダノソリンコレクションの作製

Construction of *O*-methylated-norlaudanosoline collection using engineered *E. coli*

○中川 明[1]、杉本 実菜世[1]、松村 栄太郎[1]、小柳 喬[2]、片山 高嶺[3]、山本 憲二[1]、佐藤 文彦[4]、南 博道[1] ([1]石川県大資源研、[2]石川県大食品、[3]石川県大共生研、[4]京大院生命)

○ Akira Nakagawa[1], Minayo Sugimoto[1], Eitaro Matsumura[1], Takashi Koyanagi[2], Takane Katayama[3], Kenji Yamamoto[1], Fumkihiko Sato[4], Hiromichi Minami[1] ([1]Ishikawa pref. Univ., [2]Food. Ishikawa pref. Univ., [3]Symbi. Ishikawa pref. Univ., [4]Kyoto Univ.)

ベンジルイソキノリンアルカロイド(BIA)は、モルヒネ(鎮痛剤)、ベルベリン(止瀉薬)、マグノフロリン(抗ガン剤)といった医薬品をはじめとする化合物群を含んでおり、強い生理活性を有している．しかし、実用化されている BIA のように薬効まで明らかにされているものは少なく、殆どの BIA は自然界に微量にしか存在しないため、あまり研究が進んでいない．BIA はその複雑な骨格やキラリティから化学合成が難しく多量には得にくいが、我々は大腸菌を用いた BIA の発酵生産に成功している．BIA の 1 つであるノルラウダノソリン(NLS)は、6 位、7 位、3'位、4'位の 4 つの水酸基を持っており(図 1)、それぞれがメチル基転移酵素によってメチル化されうる．BIA の潜在的な生理活性を考えるとメチル化された NLS は、創薬研究において、リード化合物やその原料としての利用が期待される．化学合成法による位置特異的なメチル化は水酸基の保護等、困難であることが知られており、一方で酵素法を利用したメチル化は比較的容易である．そこで、我々は、創薬研究における有用な BIA 類縁化合物の原料となり得るメチル化 NLS 生産系構築を目的に、メチル基転移酵素を利用して、想定されうる全 15 種(2^4-1)のメチル化 NLS コレクションの作製を試みた．6 位、7 位、4'位の水酸基をメチル化する酵素はそれぞれ、6OMT、7OMT、4'OMT が知られている．一方で、3'位の水酸基をメチル化する酵素は植物では単離されていないが、我々はヒトカテコール *O*-メチル基転移酵素がそれを触媒することを見出した．これら 4 つの酵素を様々な組み合わせで NLS に作用させたところ、15 種類のメチル化 NLS のうち 3'-4'-*O*-ジメチル NLS を除く 14 種の生成を確認した．また、NLS に作用させる酵素の順番を変えると、その生成物の種類や生産量に変化が見られた．こうした性質を利用して、効率的にメチル化 NLS コレクションを作製する．また、全ての水酸基がメチル化されたテトラハイドロパパベリンは鎮痙剤アトラクリウムの原料であり、アトラクリウムは世界保健機構の必須医薬品モデルリストに挙げられている重要な医薬品である．本研究で得られた知見を元にテトラハイドロパパベリンの微生物発酵生産の可能性についても論じたい．

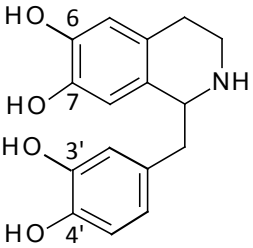


図1. ノルラウダノソリン (NLS)

alkaloid, methylation, atracrium

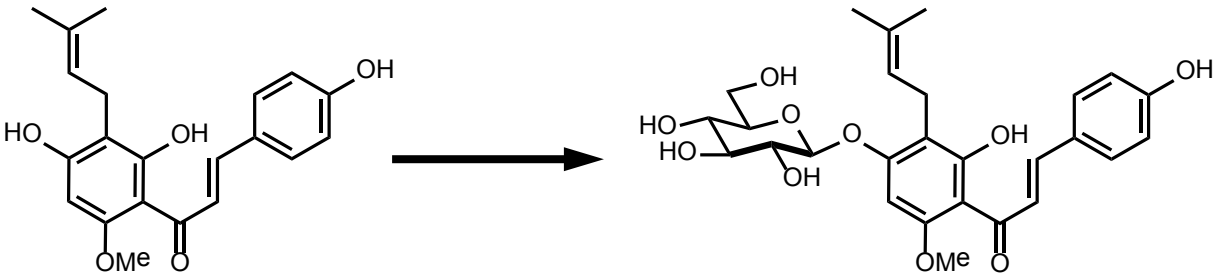
講演番号：3A34p05
講演日時、会場：3 月 28 日 14:44～ A 校舎 34 会場

糸状菌を利用したキサントフモール配糖化による溶解性の改善

Glucosylation of xanthohumol by microbial transformation using filamentous fungi improves the solubility

○太田 愛美、平田 拓、町田 賢司、神田 一、高澄 耕次、中村 剛（サッポロビール・価値創造フロンティア研究所）
○Ami OTA, Hiroshi HIRATA, Satoshi MACHIDA, Hajime KANDA, Koji TAKAZUMI, Takeshi NAKAMURA (SAPPORO BREWERIES LTD.)

【背景】キサントフモールはホップに含まれる代表的なプレニルフラボノイドであり、様々な健康機能性が報告されている。しかしキサントフモールは水に難溶であるために飲料への利用に課題を残す。一般的にフラボノイドは配糖化により溶解性が向上することが知られており、キサントフモールの配糖体は微生物変換による合成例が報告されているが、いずれも食品製造に不向きな微生物（*Penicillium chrysogenum, absidia coerulea* など）によるものである。そこで本研究では食品製造に利用される微生物種を用いてキサントフモールを配糖化することにより、食品利用性の向上を試みた。
【方法】キサントフモール配糖体の標準品は、植物由来 UDP-glucosyltransferase を用いて酵素合成した。酵母、乳酸菌、*Aspergillus* に属する糸状菌からキサントフモール配糖化微生物をスクリーニングした。各種微生物を液体培地にて数日培養を行い、キサントフモールを添加した。生成物を LC-MS/MS によって分析し、キサントフモール配糖化能を評価した。得られたキサントフモール配糖体高生産株について、キサントフモール配糖体の収率を算出した。
【結果】酵素合成したキサントフモール配糖体を用いて水への溶解性を確認したところ、キサントフモールは配糖化により約 60 倍可溶性が向上した。250 株のスクリーニングの結果、糸状菌からキサントフモール配糖化能を有する株を選抜した。選抜株について培養条件の検討を行ったところ、糖源として β-シクロデキストリンを添加した場合、培地中キサントフモール配糖体量が向上した。選抜株を用いてキサントフモール配糖体の収率を算出したところ、小スケール培養において最大で約 0.5%であることがわかった。以上のように、微生物変換により溶解性に優れるキサントフモール配糖体を製造し、飲料への利用を可能にした。



Xanthohumol　　XN-4'-β-D-glucopyranoside

xanthohumol, glucosylation, microbial transformation

講演番号：3A34p06
講演日時、会場：3 月 28 日 15:05～ A 校舎 34 会場

微生物反応及び化学反応を用いたトレハロースから希少糖 D-アロース生産の改良

Improvement of D-allose production from trehalose by microbial and chemical reaction

○成冨 旭[1]、黒田 智美[1]、吉原 明秀[1,2]、高田 悟郎[1,2]、森本 兼司[1,2] ([1]香川大農、[2]香川大希少糖研究センター)
○Akira Naritomi[1], Tomomi Kuroda[1], Akihide Yoshihara[1,2], Goro Takata[1,2], Kenji Morimoto[1,2] ([1]Kagawa Univ., [2]RSRC., Kagawa Univ.)

【目的】*Agrobacterium tumefaciens* M31 株は D-グルコシド 3-デヒドロゲナーゼを有し、様々な単糖および二糖の炭素第三位をケト化することがわかっている。この性質を利用して、本研究では本菌による微生物酸化、化学的還元および加水分解を用いてトレハロースから希少糖 D-アロースの生産法の確立を目的としている。先行研究により M31 株はトレハロースから 3-ケトトレハロースを経て 3,3'-ジケトトレハロースへ変換した後にそれを資化する能力を有するために収率が低下することがわかっている。またトレハロースが反応液中に残留する問題点もあった。本報告では改良した生産条件による結果を報告する。

【方法・結果】 収率を向上させるために UV 照射を行い、短時間で 3-ケトトレハロースおよび 3,3'-ジケトトレハロースの転換率の高い変異株取得を試みたが、野生株と比較し 10%程度しか向上しなかった。そこで野生株の培養条件、転換条件を見直した。1%スクロースを含む無機塩培地で本菌を 30℃、21 時間培養させ、菌体濁度 OD=18、トレハロース濃度 1%で洗浄菌体反応を行い HPLC 分析により生成物を確認した。その結果、反応 9 時間後の反応液中の糖組成比は 3,3'-ジケトトレハロース 99%、3-ケトトレハロース 0.6%、トレハロース 0.6%となった。なお、このときの 3,3'-ジケトトレハロースへの転換率は用いたトレハロース量の約 42%に達した。トレハロースが反応液中にほとんど残留しない条件が確立された。

得られた反応液を 0.025%水素化ホウ素ナトリウムにより還元させ、さらに 0.5N 塩酸により加水分解したのち、HPLC 分析により生成物を確認した。α-D-アロシル-(1, 1)-α-D-グルコース、α-D-アロシル-(1, 1)-α-D-アロースのピークが重なり判別できなかったため、反応液中の糖組成比はα-D-アロシル-(1, 1)-α-D-グルコース、α-D-アロシル-(1, 1)-α-D-アロースを合わせた 97%とトレハロース 3%であった。これを加水分解させることによって D-グルコース、D-アロースが 40：60 で生成されていることがわかった。また水素化ホウ素ナトリウムの濃度を変えることにより還元物の組成比が変化するという結果が示唆されており、詳細に現在検討中である。

rare sugar, D-allose, Agrobacterium tumefaciens

講演番号：3A34p07
講演日時、会場：3 月 28 日 15:16～ A 校舎 34 会場

Leuconostoc mesenteroides が生成する不溶性グルカンからα-1,3-グルカンの調製
Purification of α-1,3-glucan from insoluble-glucan produced by *Leuconostoc mesenteroides*
○堀 友佳理、若林 安希、矢野 成和（山形大院理工）
○Yukari HORI, Aki Wakabayashi, Shigekazu Yano (Yamagata Univ.)

【目的】 乳酸菌 *Leuconostoc mesenteroides* NBRC 100496 は、スクロースを基質としてα-1,6-グルコシド結合とα-1,3-グルコシド結合を有する不溶性グルカンを生成する。この不溶性グルカンは、オリゴ糖生産のための原料として、あるいは生分解性のポリマーとしての利用が期待できる。

我々は、*Bacillus circulans* KA-304 がグリコシダーゼファミリー87 型α-1,3-グルカナーゼ（Agl-KA）を生産すること、大腸菌宿主ベクター系で容易に発現することを報告した(1)。また、Agl-KA は、α-1,3-グルカンを加水分解するだけでなく *L. mesenteroides* が生成する不溶性グルカンも分解すること、さらに、本不溶性グルカンからα-1,3-グルカノオリゴ糖（二糖～四糖）が遊離することを見出した (2)。以上の結果から、*L. mesenteroides* が生成する不溶性グルカン中には、かなりの比率でα-1,3-グルコシド結合が含まれており、本不溶性グルカンからα-1,6-グルコシド結合からなる分枝を取り除くことで、α-1,3-グルカンを調製できると考えた。

本報では、*L. mesenteroides* が生成する不溶性グルカンから、α-1,3-グルカンを簡便に調製する手法を検討した。次いで、Agl-KA のα-1,3-結合ドメインと緑色蛍光タンパク質（GFP）を融合させたタンパク質（α-1,3-bind-GFP）を用い、調製したグルカンへの結合活性を調べた。以上の実験結果を基に、不溶性グルカンから得られるα-1,3-グルカンの利用法を考察した。

【方法と結果】 乳酸菌培養に用いられる MRS 培地の炭素源を 5%スクロースに変更した改変 MRS 培地を用いて、*L. mesenteroides* NBRC100496 の培養を行った。培養液 （3 L）から不溶性グルカン 19 g が得られ、次に、その不溶性グルカンに市販デキストラナーゼを作用させることでα-1,6-グルコシド結合からなる分枝を除去した。酵素処理後、遠心分離することでグルカンを回収した結果（酵素処理グルカン）、その重量は 3.8 g であった。また、遠心分離後の濾液に含まれる糖成分を分析した結果、イソマルトース等のオリゴ糖が含まれていた。

酵素処理グルカン（1%）に対するα-1,3-bind-GFP（2 nmol/ml）の結合活性を調べた結果、約 90%の結合率を示した。一方、不溶性グルカンに対しては、ほとんど結合しなかった。本研究では、さらに、酵素処理グルカンの性質を解析するとともに、酵素固定化材としての利用法を検討した。

(1) Yano, S., Biosci. Biotechnol. Biochem., 67, 1976-82 (2003).
(2) 若林 安希、日本農芸化学会 2014 年度大会講演要旨集、講演番号 2A10p01.

α-1,3-glucan, *Leuconostoc mesenteroides*, insoluble-glucan

講演番号：3A34p08
講演日時、会場：3 月 28 日 15:27～ A 校舎 34 会場

プロトカテク酸脱炭酸反応の強化とリグニン系芳香族化合物を原料とした *cis,cis*-ムコン酸生産へのアプローチ

An approach to enhancement of protocatechuate decarboxylase and production of *cis,cis*-muconate from lignin-reraled aromatic compounds

○諸岡 深雪、今 仁志、園木 和典 (弘前大院農学生命)
○Miyuki MOROOKA, Hitoshi KON, Tomonori SONOKI (Hirosaki Univ.)

【目的】*cis,cis*-ムコン酸（ccMA）は芳香族化合物の中間代謝物であり、ポリアミドやポリエチレンの原料として展開が可能である。これまでにシキミ酸合成経路を経由した ccMA 生産が提案されてきたが、ccMA の前駆体であるプロトカテク酸（PA）の脱炭酸反応（Pdc）がボトルネックとされており、未だ有効な解決方法は提案されていない。また糖質は様々な化学品や燃料生産の原料として利用されているため、リグノセルロース由来の糖質を原料としたとしても、将来的には原料競合が起きることが想定できる。そこで本研究では Pdc 反応の強化方法と、それを用いたリグニン由来の芳香族化合物を原料とした ccMA 生産について検討した。

【方法と結果】*Klebsiella pneumoniae* sp. *pneumoniae* A170-40 株由来の Pdc（AroY）は *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* strain 168 株由来 Phenolic acid decarboxylase の C サブユニット（BsdC）と *Streptomyces* sp. D7 株由来 Vanillate decarboxylase の C サブユニット（VdhC）とそれぞれ 63%、71%の相同性を示した。BsdC や VdhC は他のサブユニットとクラスターを形成してゲノム上に位置し、複合体を形成することが報告されている（BsdBCD、VdhBCD）。しかし *aroY* の周辺にはこれらのサブユニットと相同性を示す領域は存在しなかった。そこで *K. pneumoniae* sp. *pneumoniae* NBRC14940 株から putative 4-hydroxybenzoate decarboxylase をコードする *kpdB*、*kpdC*、*kpdD* をクローニングし、*aroY* と共発現させた結果、*kpdB* と *aroY* を共発現することによって Pdc 活性が向上することを明らかにした。粗酵素液中の比活性は約 12 倍に向上し、最適 pH は 5.5、最適温度は 35℃であった。

ccMA を効率的に生産するために、リグニン系低分子芳香族化合物の代謝能力を有する *Pseudomonas putida* KT2440 株の変異株で、PA と ccMA の代謝能力を欠損させた *P. putida* CBIK 株を宿主とし、*aroY* と *kpdB*、そして *catA*（catechol 1,2-dioxygenase）を組み込んだ形質転換体を作成した。リグニン系芳香族化合物の一つである PA から ccMA の生産を確認した。

Cis,cis-muconate, Lignin, Protocatechuate

講演番号：3A34p09
講演日時、会場：3 月 28 日 15:38～ A 校舎 34 会場

Aureobasidium pullulans M-2 が産生する水溶性β-1,3-1,6-D-グルカンの生合成に関する研究
Research on the biosynthesis of soluble β-1,3-1,6-D-glucan in *Aureobasidium pullulans* M-2
○内山 博文[1,3]、鈴木 智大[2]、草野 妃里[4]、岡部 満康[4]、守屋 祐生子[4]、守屋 直幸[4]、加藤 竜也[1,2]、朴 龍洙[1,2] ([1]静大創科技院、[2]静大グリーン研、[3]株式会社アウレオサイエンス、[4]株式会社アウレオ)
○Hirofumi UCHIYAMA[1,3], Tomohiro SUZUKI[2], Kisato KUSANO[4], mitsuyasu OKABE[4], Yukiko MORIYA[4], Naoyuki MORIYA[4], Tatsuya Kato[1,2], Enoch Y. PARK[1,2] ([1]Shizuoka Univ., Graduate School of Science and Technology, [2]Shizuoka Univ., Research Institute of Green Science and Technology, [3]Aureoscience Co.,Ltd, [4]Aureo Co.,Ltd)

【背景と目的】　免疫賦活作用を有する真菌由来β-1,3-1,6-D-グルカン（以下βグルカン）は、細胞壁に普遍的に含まれるβグルカンおよび菌体外に分泌される水溶性βグルカンの二つに分けることができる。後者は限られた菌のみが産生することが知られているが、その生合成経路や分泌機構は未だ明らかにされていない。我々が保有する黒酵母 *Aureobasidium pullulans* M-2 は特定の培養条件下で水溶性βグルカンを産生し、その構造は側鎖分岐度が約 60%、β-1,6 結合側鎖にグルコース一残基を有するというものだった。我々は、このような水溶性βグルカンは細胞壁βグルカンと異なる生合成経路によって合成されているという仮説を立て、その合成に関与する分子の特定を目標に掲げて研究を進めている。本研究では、*in vitro* でβ-1,3-1,6-D-グルカンを合成することを目的とし、側鎖形成を触媒する糖転移酵素の有無について調べ、得られた成果を報告する。
【方法と結果】　βグルカン産生培地で培養した *A. pullulans* M-2 から得た cDNA を鋳型に縮重 PCR を行い、まず 1,3-β-グルカン合成酵素触媒サブユニットの遺伝子の部分塩基配列を得た。この触媒サブユニットは細胞膜の膜タンパク質として存在することが知られており、ほぼ全ての真菌が有しているタンパク質であると考えられている。縮重 PCR のプライマーセットは *Saccharomyces cerevisiae* などの既知のアミノ酸配列を元に設計した。その後 RLM-RACE (RNA ligase-mediated rapid amplification of cDNA ends)を行い、同酵素遺伝子の全塩基配列（約 6 kbp）を決定した。この塩基配列によってコードされるアミノ酸及び予測される膜貫通領域を既知のそれと比較したが、*A. pullulans* M-2 に特徴的と思われる情報は得られなかった。現在、真菌を宿主とするタンパク質発現系を用いてこの酵素の発現を試みており、今後は組み換え体の遺伝子発現プロファイルやβグルカン産生がどう変化するかを確認していく予定である。また、それと並行して *A. pullulans* M-2 のフルゲノム解析も行い、ゲノムの情報に基づいてβ-1,3-1,6-D-グルカンの生合成経路を解明していきたい。

Aureobasidium pullulans, β-glucan, biosynthesis

講演番号：3A34p10
講演日時、会場：3 月 28 日 15:49～ A 校舎 34 会場

生理活性を有するβ－１，３－グルカンオリゴ糖の酵素的増収法の検討

Examination of efficiently enzymatic production of biologically active beta-1,3-oligosaccharide.

○熊谷 祐也[1,2]、奥山 正幸[1]、木村 淳夫[1] ([1]北大院農、[2]JSPS)
○Yuya KUMAGAI[1,2], Masayuki OKUYAMA[1], Atsuo KIMURA[1] ([1]Hokkaido Univ., [2]JSPS)

【目的】β－１，３－グルカンから成るオリゴ糖は生理活性を持つことから近年大きな注目を集めていており、β－１，３－ポリマーであるカードランを原料とした生産が試みられている。カードランは水への溶解度の低さ、加熱により熱硬化性のゲルになることからオリゴ糖の調製が困難な多糖である。これまでに酸や酵素による加水分解法が報告されているが、オリゴ糖サイズは４糖以下の小さいものが大部分であり、生理活性を有する５糖以上のオリゴ糖の生産が少ないのが現状である。Glycoside Hydrolase Family 64 (GH64) に属するβ－１，３－グルカナーゼはβ－１，３－グルカンを限定的に加水分解する酵素ファミリーであることから本酵素を用いることで比較的長いオリゴ糖の調製が可能であると考えられた。本研究では放線菌 *Kribbella flavida* DSM 17836 より GH64 酵素を調製し、カードランの前処理条件を検討することで効率的な長鎖オリゴ糖の生産を試みた。

【方法】カードランは未処理をコントロールとして 1) 希アルカリ処理法、2) 高アルカリ処理＋ホモジナイズ法、3) リン酸バッファー処理＋加熱法を試みた。*K. flavida* DSM 17836 の GH64 酵素 KfGH64 は大腸菌を宿主として生産し、Co-アフィニティークロマトグラフィーにより精製した。本酵素の基本的性質はラミナリンを基質として BCA 法により還元力を求めることで定量した。カードランの加水分解率は酵素分解後の乾燥重量を測定することで求め、生成物のサイズは HPAEC-PAD およびゲル濾過クロマトグラフィーにより評価した。

【結果】KfGH64 は大腸菌発現系により調製が可能であり、その至適温度および pH はそれぞれ 45℃、4.5-6.5 であった。30 分の処理により活性が半減する温度は 45℃であり、40℃では 8 時間の処理を行っても 80%以上の活性を保持することが分かった。本酵素によりカードランを加水分解したところ、3) の前処理により分解率が約 40%と最も高かった。また、得られたオリゴ糖サイズを評価したところ、生成物の大部分は５糖であり、４糖以下のオリゴ糖がほとんど生産されないことが明らかになった。従って、本前処理法が効果的なオリゴ糖調製に適した手法であることが解明された。

beta-1,3-glucan oligosaccharide, GH64, Actinomycete

講演番号：3A34p11
講演日時、会場：3 月 28 日 16:10～ A 校舎 34 会場

L-ピペコリン酸 4 位水酸化酵素の機能解析と *trans*-4-ヒドロキシ-L-ピペコリン生産プロセスの開発

Characterization of L-pipecolic acid *trans*-4-hydroxylase and its application for *trans*-4-hydroxy-L-pipecolic acid production

○福田 大[1]、日比 慎[2]、森 亮輔[1]、小園 祥子[2]、三宅 良磨[3,4]、川端 潤[3,4]、高橋 里美[2]、小川 順[1]
([1]京大院・農・応用生命、[2]京大院・農・産業微生物、[3]三菱化学科学技術研究セ、[4]エーピーアイコーポレーション)
○Dai FUKUDA[1], Makoto HIBI[2], Ryosuke MORI[1], Shoko KOZONO[2], Ryoma MIYAKE[3,4], Hiroshi KAWABATA[3,4], Satomi TAKAHASHI[2], Jun OGAWA[1] ([1]Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]Ind. Microbiol., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [3]MCRC, [4]API Corp.)

【背景】ヒドロキシピペコリン酸（HyPip）は医薬品の合成中間体として重要な化合物であり、産業的な需要が大きい。これらの生産法に関しては、酵素反応によりピペコリン酸（Pip）を直接水酸化して光学活性な HyPip を得る手法が有効である。これまでに我々は糸状菌 *Fusarium oxysporum* c8D 株が保持する二価鉄/α-ケトグルタル酸依存性ジオキシゲナーゼファミリーに属する酵素 Pip4H1 が、L-Pip に作用して *trans*-4-L-HyPip を生成する活性を保持していることを見出している。本研究では Pip4H1 に関して、詳細な機能解析を行うとともに、高光学純度の *trans*-4-L-HyPip を効率良く生産しうるバイオプロセスへの応用を検討した。
【方法・結果】遺伝子組み換え大腸菌（pQE-Pip4H1/*E. coli* JM109）にて発現した Pip4H1 の精製酵素を用い、酵素学的諸性質を詳細に解析した。その結果、Pip4H1 は L-Pip に対して特に強い水酸化活性を示し、99% *e.e.*以上の光学純度で *trans*-4-L-HyPip を生成する事を確認した。至適酵素反応条件下において pQE-Pip4H1/*E. coli* JM109 の菌体を触媒として用いた水酸化反応では、100 mM の L-Pip を定量的に高光学純度の *trans*-4-L-HyPip に変換できる事を確認した。現在、水酸化反応のさらなる効率化検討の実施により、実用的な *trans*-4-L-HyPip のバイオプロセス開発を目指している。

L-Pipecolic acid hydroxylase, Fe(II)/α-ketoglutarate-dependent dioxygenase, L-*trans*-4-Hydroxypipecolic acid

講演番号：3A34p12
講演日時、会場：3 月 28 日 16:21～ A 校舎 34 会場

Rhodococcus rubropertinctus を用いた水酸化反応による医薬中間体の合成
Production of a pharmaceutical intermediate via biohydroxylation using whole cells of *Rhodococcus rubropertinctus*
石川 千弘[1]、○宗石 和久[1]、木村 隆利[2]、日比 慎[2]、高橋 里美[2]、小川 順[1]([1]京大院農　応用生命、[2]京大院農　産業微生物)
CHIHIRO ISHIKAWA[1], ○KAZUHISA MUNEISHI[1], TAKATOSHI KIMURA[2], MAKOTO HIBI[2], SATOMI TAKAHASHI[2], JUN OGAWA[1] ([1]Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]Ind. Microbiol., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)

【目的】
2-hydroxy-6,7-dihydro-4H-thieno[3,2-c]-pyridine-5-carboxylic acid *tert*-butyl ester（以下 LP1）は抗血小板剤プラスグレルの合成中間体として利用される化合物である。LP1 は、前駆体である 6,7-dihydro-4H-thieno[3,2-c]-pyridine-5-carboxylic acid *tert*-butyl ester（以下 LS1）の水酸化により得ることが可能である。しかし、LS1 の構造中には水酸化可能な位置が複数存在するため、化学反応においては LP1 のみを特異的に生産することは困難である。そこで本研究では、LS1 の 2 位を位置特異的に水酸化して LP1 を生産する微生物の探索と、LP1 高生産のための反応条件の検討を試みた。

【方法と結果】
研究室保存菌株 1345 株を対象に、LS1 の水酸化活性を保持する菌株の探索をおこなった。栄養標準培地を用いて各菌株を 28℃の条件で 48 時間振とう培養した後、LS1 を終濃度 2 mM となるように培養液に直接添加し、さらに 48 時間振とうを継続して反応を行った。反応液中に含まれる LS1 及び LP1 は、高速液体クロマトグラフィーにより定量的に分析した。その結果、*Rhodococcus rubropertinctus* N82 株において最も高い LS1 の LP1 への選択的水酸化活性を見出した。次に本菌株を用いた LP1 生産の最適反応条件の検討をおこなった。菌体の培養条件に関しては、炭素源にグルコース、窒素源にペプトンを使用し、1.2% Yeast extract を添加した条件下で培養した菌体において最も高い水酸化活性を確認した。最適化した反応条件下において菌体反応をおこなった結果、4 mM の LS1 から 3.3 mM の LP1 を生産することができた。

hydroxylation, *Rhodococcus rubropertinctus*, biotransformation

講演番号：3A34p13
講演日時、会場：3 月 28 日 16:32～ A 校舎 34 会場

コリネ型細菌を用いたプロトカテク酸の生産
Production of protocatechuic acid by *Corynebacterium glutamicum*
○岡井 直子[1]、竹嶋 康誠[1]、荻野 千秋[2]、近藤 昭彦[2] ([1]神戸大自、[2]神戸大院工)
○ Naoko OKAI[1], Yasunobu TEKESHIMA[1], Chiaki OGINO[2], Akihiko KONDO[2] ([1]Org.Adv.Sci.Tech., Kobe Univ., [2]Dep.Chem.Sci.Eng., Kobe Univ)

[目的] 化石資源は有限であり、化成品原料・プラスチック原料のバイオマスからの生産が望まれる。本研究ではポリマー原料となる芳香族化合物を、糖を原料として微生物により発酵生産することを目的とし、プロトカテク酸（3,4-ジヒドロキシ安息香酸）の生産を検討した。プロトカテク酸は化成品のビルディングブロックや機能性ポリマー原料として有用な化合物である。プロトカテク酸はコリネ型細菌において 4-ヒドロキシ安息香酸から変換され代謝される。そこで、芳香族アミノ酸前駆体のコリスミ酸から 4-ヒドロキシ安息香酸への反応を触媒するコリスミ酸ピルビン酸リアーゼ（CPL）をコリネ型細菌で高発現させ、糖を原料とするプロトカテク酸の発酵生産系の構築を行った。
[方法] 大腸菌由来のコリスミ酸ピルビン酸リアーゼ遺伝子（*ubiC*）を、*C. glutamicum* フェニルアラニン生産株に、また野生株（ATCC13032）に導入した。*C. glutamicum ubiC* 発現株をグルコース 40g/L を含む培地を用いて 30℃で好気的に 80 時間培養し、培養上清を経時的に採取して 4-ヒドロキシ安息香酸、プロトカテク酸、および糖濃度を測定した。また得られた芳香族化合物について LC/MS による測定を行った。次に、*ubiC* 発現 *C. glutamicum* についてファーメンターを用いて pH6.0-7.5 の条件を検討し、グルコース 50g/L を含む培地を用いて 30℃で 72 時間発酵を行った。
[結果] コリスミ酸ピルビン酸リアーゼ遺伝子 *ubi*C を発現した *C. glutamicum* について、野生株を宿主とした場合にわずかな 4-ヒドロキシ安息香酸の生成が認められたのに対し、フェニルアラニン生産株を宿主とした場合に 36 時間で 28 mg/L の 4-ヒドロキシ安息香酸を培養上清中に生成していた。このとき同株はグルコースを発酵基質として 80 時間で 213 mg/L のプロトカテク酸を培養上清中に生産した。更にファーメンターを用いた発酵条件検討の結果 *ubiC* 発現 *C. glutamicum* はグルコースから pH7.5、好気条件において 72 時間で 0.61g/L のプロトカテク酸を生産した。
[謝辞] 本研究は JST 科学技術振興調整費「バイオプロダクション次世代農工連携拠点の形成」の研究の一環として行われたものである。

Protocatechuic acid, *Corynebacterium glutamicum*

講演番号：3A34p14
講演日時、会場：3 月 28 日 16:43～ A 校舎 34 会場

微生物によるアクリル酸水和反応に関する研究

Studies on microbial hydration of acrylic acid

西川 恵美[1]、浦野 信行[1]、冨士 亮介[2]、西本 菜津紀[1]、○片岡 道彦[1,2] ([1]阪府大院生環科・応用生命、[2]京大院農・応用生命)
Megumi NISHIKAWA[1], Nobuyuki URANO[1], Ryosuke FUJI[2], Natsuki NISHIMOTO[1], ○Michihiko KATAOAKA[1,2] ([1]Osaka Pref. Univ., [2]Kyoto Univ.)

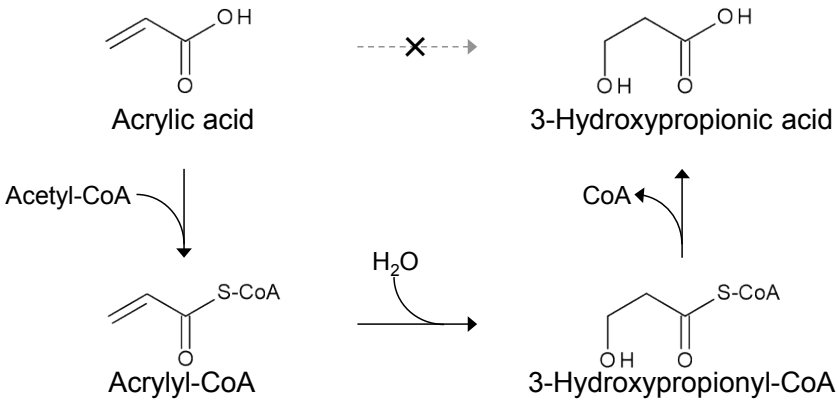
【背景・目的】

アクリル酸はポリマー原料として広く利用されている化合物の一つであり、もっとも単純な不飽和カルボン酸として分子内に炭素間二重結合を有している。我々は微生物によるアクリル酸の炭素間二重結合の変換反応の探索と応用に関する研究を進めており、これまでに休止菌体を使用した反応においてアクリル酸を 3-ヒドロキシプロピオン酸（3HPA）へと水和する 2 種類の真菌（*Fusarium* 属および *Acremonium* 属）の単離に成功している。本発表では、この変換反応に関与する酵素系の解明を目的として、変換反応の諸性質の検討を行ったので報告する。

【方法・結果】

アクリル酸による誘導性の酵素であるかを検討するために、両菌株培養時におけるアクリル酸添加の有無による影響を、休止菌体を用いた反応で調べた。その結果、培養時のアクリル酸添加の有無による差異はほとんど見られず、この変換酵素系はアクリル酸誘導性ではないことが明らかとなった。続いて、両菌株を超音波破砕し、その遠心上清（無細胞抽出液）を使用してアクリル酸の変換反応を試みたが、3HPA の生成は全く認められなかった。そこで、反応液中へ様々な補酵素類を添加したところ、アセチル-CoA 添加時にのみ 3HPA の生成が見られた。また、3HPA 生成量は添加するアセチル-CoA 量に依存的であったことから、両菌株におけるアクリル酸の 3HPA への変換反応はアセチル-CoA 依存性であり、図に示す反応経路の存在が示唆された。

これまでに遊離 CoA を補因子とする同様の反応はいくつかの古細菌において発見・報告がなされているが、アセチル-CoA を補因子とする反応は報告されておらず、両菌株の有するこのアクリル酸変換経路は非常にユニークなものであると考えられる。



short-chain unsaturated fatty acid, carbon double bond, acrylic acid

講演番号：3A34p15
講演日時、会場：3 月 28 日 16:54～ A 校舎 34 会場

生体制御分子硫酸体の調製技術の開発

Development of production method of sulfated bioregulatory molecules

○下平 武彦[1]、黒木 勝久[1]、Liu Ming-Cheh[2]、榊原 陽一[1]、水光 正仁[1] ([1]宮崎大学院農工、[2]トレド大学薬)
○Takehiko Shimohira[1], Katuhisa Kurogi[1], Ming-Cheh Liu[2], Yoichi Sakakibara[1], Masahito Suiko[1] ([1]Univ of Miyazaki, [2]The Univ of Toledo)

【目的】生体制御分子の一種であるポリフェノール化合物は、抗ガン作用等の様々な生理作用をもつ。これらのポリフェノール化合物の多くは生体内に取り込まれると、主に腸管と肝臓で硫酸転移酵素(SULTs)等の薬物代謝酵素により代謝される。そのため、生体内では多くのポリフェノール化合物は硫酸体のような代謝物として存在している。近年、このような代謝物の生体内での重要性が認識されるようになってきたが、ポリフェノール化合物の硫酸体は、ひとつの化合物に対して位置特異的な硫酸体が複数存在することから、有機化学的な合成が難しいため、ライブラリー構築を目指した多種の硫酸体の調製が困難である。また、その硫酸体の機能性も未だ解明されていない。そこで、本研究では、様々なポリフェノール化合物をモデルに多種多様なポリフェノール硫酸体の調製技術開発とその硫酸体の機能解明を目的に研究を行った。

【方法】大腸菌発現用ベクターである pGEX ベクターを用いてリコンビナント硫酸転移酵素を GST 融合タンパク質として大腸菌体内に発現させた後、基質を含む硫酸体調製用培地で培養することで基質の硫酸化を行った。その培養上清を回収し Diaion HP20 を用いてポリフェノール化合物の硫酸体を粗精製し、C18 逆相カラムを使用した HPLC にて硫酸体の分取を行った。さらに、分取した硫酸体をフーリエ変換型質量分析装置 Q-Exactive および、核磁気共鳴装置 AV300M digital NMR を用いて硫酸体の構造を決定した。また、生産したポリフェノール化合物の硫酸体をヒト肝臓がん細胞株 HepG2 細胞に作用し硫酸体の細胞増殖抑制効果を確認した。

【結果および考察】SULTs を発現させた大腸菌を、基質を添加した硫酸体調製用の培地で培養することで、様々なポリフェノール化合物の位置特異的な硫酸体の大量調製を行うことができた。また、調製した硫酸体を質量分析装置および核磁気共鳴装置を用いることで構造決定を行うことができた。そして、本手法を用いて調製したポリフェノール化合物の硫酸体のガン細胞増殖抑制効果を比較したところ、硫酸体の硫酸基の位置の違いでガン細胞増殖抑制効果に違いがあることが判明し、生体内でのポリフェノール化合物の代謝と機能のメカニズムの一端が解明された。以上の結果から、今後、本技術は様々なポリフェノール性の生体制御分子硫酸体の生産および機能解明に貢献できる技術になることが期待される。

sulfotransferase, polyphenol, anti-cancer

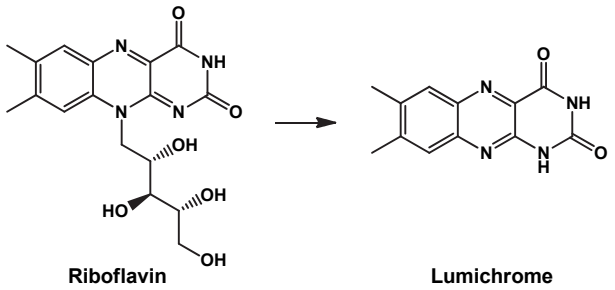
講演番号：3A34p16
講演日時、会場：3 月 28 日 17:15～ A 校舎 34 会場

Microbacterium sp. TPU3598 を用いたルミクロムの効率的生産法の開発

Efficient production of lumichrome by *Microbacterium* sp. TPU3598

○山本 和範[1,2]、浅野 泰久[1,2] ([1]富山県大工・生工研セ、[2]JST, ERATO)
○Kazunori YAMAMOTO[1,2], Yasuhisa ASANO[1,2] ([1]Biotech. Res. Center & Dept. Biotech., Toyama Pref. Univ., [2]ERATO, JST)

【目的】リボフラビンの光分解産物であるルミクロムは、蛍光プローブや有機半導体材料として利用可能な産業上有用な化合物である。ルミクロムの製造方法に関しては化学的な方法がこれまでに報告されているが、収率が低く、ルミクロムを安価に製造する方法の開発が求められている。また、数種の微生物がリボフラビンをルミクロムに変換することは既に知られているが、高濃度のリボフラビンを原料にしてルミクロムを効率的に製造する方法は報告されていない。本研究では、自然界からのリボフラビンからルミクロムを生産する微生物の探索と、単離した微生物を用いる効率的なルミクロム生産方法を開発した。



【方法と結果】リボフラビンを含む Gellan Gum 培地上でクリアゾーン形成を指標にスクリーニングを行い、ルミクロムへの変換能の高い微生物を土壌から単離することに成功した。本分離菌は、16S rDNA 配列と生理化学的性質から *Microbacterium* 属に分類されたので、*Microbacterium* sp. TPU3598 と命名した。

本菌はリボフラビン存在下で培養することによって、ルミクロムへの変換活性が誘導されたので、ルミクロムへの変換は 100 μM のリボフラビンを含む栄養培地で培養した菌体を用いて検討した。1 L の培養液から得られた菌体とリボフラビン (3.8 g, 10.1 mmol) を 500 mL の 10 mM リン酸バッファー (pH 7.0) に添加し、30ºC で 24 時間反応させて、2.4 g (9.9 mmol) のルミクロムを得ることができた (モル収率 98%)。次に、本菌を 3.8 g のリボフラビンを含む 500 mL の培地で、30ºC、24 時間培養し、さらに同量のリボフラビン (3.8 g) を添加して 30 時間培養した。その結果、7.6 g (20.2 mmol) のリボフラビンから 4.7 g (19.4 mmol) のルミクロムを得ることができた (モル収率 96%)。上記の方法で生成したルミクロムはいずれも固体として反応溶液中に蓄積したので、遠心分離と再結晶により高純度に精製することが可能であった。

以上のように本研究では、新たに分離した *Microbacterium* 属細菌を用いて、休止菌体反応および培養によってルミクロムを効率的に生産する方法を開発することに成功した。

Microbacterium sp. TPU3598, Lumichrome, Riboflavin

講演番号：3A34p17
講演日時、会場：3 月 28 日 17:26～ A 校舎 34 会場

微生物変換による新規 Nrf2 活性化薬 RS9 の創出

A novel Nrf2 activator RS9：Discovery with microbial transformation and biological activities

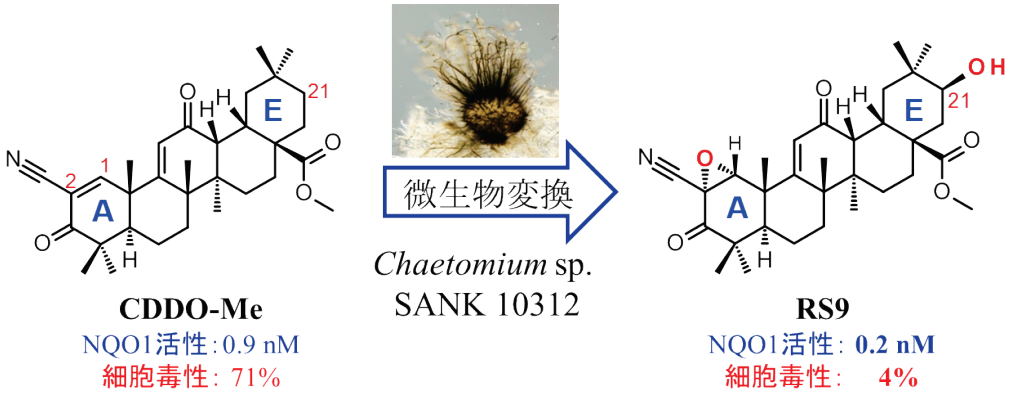
○増田 華代子[1]、飯塚 真由美[1]、小野 泰典[1]、大貫 貴史[1]、江尻 政彦[1]、波田野 恵美子[2]、井上 達也[2]、小森谷 聡[2]、中神 康裕[2]（[1]第一三共 RD ノバーレ株式会社、[2]第一三共株式会社）
○Kayoko MASUDA[1], Mayumi IIZUKA[1], Yasunori ONO[1], Takashi OHNUKI[1], Masahiko EJIRI[1], Emiko HATANO[2], Tatsuya INOUE[2], Satoshi KOMORIYA[2], Yasuhiro NAKAGAMI[2] ([1]DAIICHI SANKYO RD NOVARE CO., LTD., [2]DAIICHI SANKYO CO., LTD.)

【背景】

Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) は、多くの抗酸化酵素や第二相異物代謝酵素群のプロモーター領域に存在する抗酸化剤応答配列（ARE）に結合して酸化ストレス応答を制御する。Nrf2 活性化薬として知られている Bardoxolone methyl (CDDO-Me) は、糖尿病性腎症を対象として臨床開発が進んだが、心不全などの有害事象も確認されている。我々は、CDDO-Me を出発化合物として新規 Nrf2 活性化薬の探索研究を実施した。CDDO-Me は化学修飾に適した官能基が乏しいことから、化学合成的な誘導体展開には限界があった。そこで、CDDO-Me に誘導体展開可能な官能基を導入することを目的に、微生物変換による化合物修飾を試みた。

【方法・結果】

自社保有菌株から水酸化反応の履歴を有する菌株 20 株を用いてスクリーニングを行ったところ、真菌 *Chaetomium* sp. SANK 10312 株の培養液中から分子量が 32 増加した RS9 を見出した。構造解析の結果、A 環にエポキシ基、E 環 21 位に水酸基が導入された化合物であった。各種生物評価を実施したところ、RS9 は CDDO-Me と比較して Nrf2 活性化能（Hepa1c1c7 細胞での NQO1 活性を 2 倍に誘導する濃度）が約 4 倍向上し、かつ細胞毒性（ARPE-19 細胞での濃度 200 μM 時の LDH 放出率）は 10 倍以上低減するという、画期的なプロファイルを示した。以上のように我々は、微生物変換による二箇所の酸化反応のみで CDDO-Me を Nrf2 活性化能と細胞毒性の両面で凌駕した RS9 の取得を達成した。RS9 は *in vivo* で網膜血管透過性に対する抑制作用を示しており（Nakagami Y.,*et.al.*, , *Br J Pharmacol* (in press)）、加齢黄斑変性などの眼疾患治療薬として期待される。



Nrf2 activator, microbial transformation, *Chaetomium*

講演番号：3A34p18
講演日時、会場：3 月 28 日 17:37～ A 校舎 34 会場

新規 Nrf2 活性化薬 RS9 大量合成を目的とした微生物変換法の確立

Microbial transformation pitch in with chemical synthesis: Development of a practical and improved method for the large-scale preparation of RS9, a novel Nrf2 activator

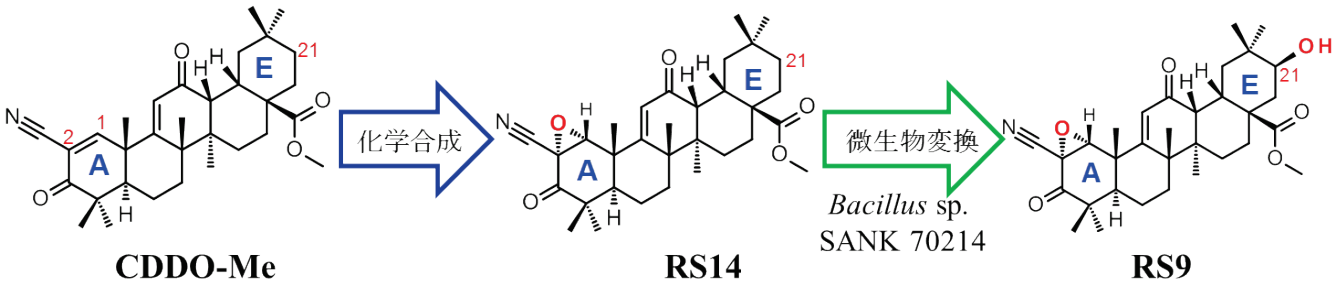
○大貫 貴史、増田 華代子、坂本 篤信、南 雅子、石井 由紀、藤原 美恵、小野 泰典、田中 一新（第一三共 RD ノバーレ株式会社）
○Takashi OHNUKI, Kayoko MASUDA, Atsunobu SAKAMOTO, Masako MINAMI, Yuki ISHII, Mie FUJIWARA, Yasunori ONO, Isshin TANAKA (DAIICHI SANKYO RD NOVARE CO., LTD.)

【背景】

Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) は活性酸素，小胞体ストレスによって活性化され，高等動物における酸化ストレス適応反応を制御する因子である。我々は Bardoxolone methyl (CDDO-Me) を基質とし、真菌 *Chaetomium* sp. SANK 10312 株を用いた微生物変換において新規 Nrf2 活性化薬 RS9 を見出している。本化合物の高次評価に向けて、大量かつ高効率の RS9 生産方法の確立を目的として研究を行った。RS9 は CDDO-Me A 環のエポキシ化および E 環 21 位の水酸化の二段階酸化反応を経て生成すると想定された。化学合成的手法において A 環エポキシ化は可能だが、 E 環水酸化は困難が予想されたため、化学合成と微生物変換を組み合わせた新たな合成ルートを検討した。

【方法・結果】

化学合成による種々の条件検討の結果、ほぼ定量的に A 環エポキシ体 RS14 を得る条件を見出した。続いて E 環 21 位の水酸化を目的に RS14 を基質とした微生物変換を検討した。細菌を中心に自社保有菌株 約 3,000 株にてスクリーニングを実施したところ、北海道の淡水より分離された好アルカリ性バクテリアである *Bacillus* sp. SANK 70214 株が目的の水酸化能を有していることを見出した。SANK 70214 株についてさらに培養条件検討を重ねることにより、培養日数 7 日で変換率約 30% に達する変換条件を確立した。本条件をフラスコにてスケールアップすることで、当初の真菌株を用いたルートの三分の二の期間でグラム単位の RS9 を高純度で取得することができた。以上により、CDDO-Me への二か所の酸化反応を化学合成と微生物変換を効果的に組み合わせる段階的な反応を確立できたことで、RS9 の安定供給が可能となった。



Nrf2 activator, Microbial transformation, *Bacillus*

講演番号：3A34p19
講演日時、会場：3 月 28 日 17:48～ A 校舎 34 会場

新規 Nrf2 活性化薬 RS9 の P450 異種発現株を用いた生産系の構築

Heterologous expression of a novel P450 gene in *Bacillus subtilis* for the large-scale production of RS9

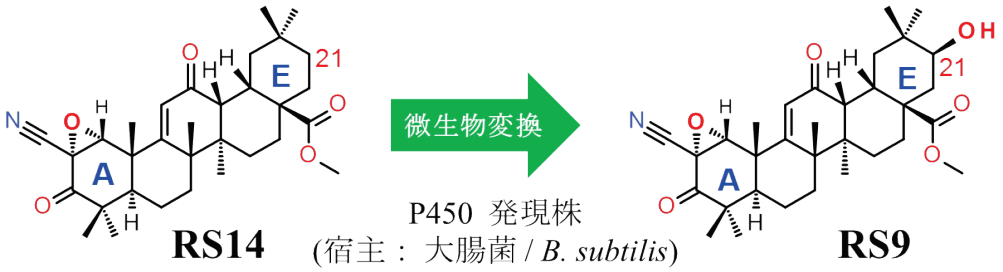
○小野 泰典、増田 華代子、福田 大介、大貫 貴史（第一三共 RD ノバーレ株式会社）
○Yasunori ONO, Kayoko MASUDA, Daisuke FUKUDA, Takashi OHNUKI (DAIICHI SANKYO RD NOVARE CO., LTD.)

【研究背景】

Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) は酸化ストレス応答を制御する因子である。我々は自社微生物を用いた微生物変換反応により新規 Nrf2 活性化薬 RS9 を見出した。加えて高次評価へも供給可能な大量合成用ルートとして、Bardoxolone methyl (CDDO-Me) を出発原料とし、化学合成と好アルカリ性 *Bacillus* sp. SANK 70214 を用いた微生物変換を組み合わせた二段階の酸化反応で RS9 を合成する手法を確立した。しかしながら、本微生物変換ではより高濃度の基質に対する反応性が低く未だ多くの課題があり、さらなる高効率な生産系が望まれた。そこで本研究では、CDDO-Me エポキシ体である RS14 から RS9 への酸化反応を担う蛋白質をコードする遺伝子を SANK 70214 株からクローニングし、異種発現株を用いた RS9 の大量供給可能な生産系を構築したので報告する。

【方法・結果】

RS14 から RS9 への変換遺伝子を短時間で探索するために、PacBio RSII と Miseq を用いて SANK 70214 株のゲノムシークエンスを行なった。その結果、SANK 70214 株のゲノムサイズは約 4.0 Mb（GC 含量、40.8%）、CDS 数は 3,695 個と推定される高品質な解析データを得ることができた。本変換は水酸化酵素の Cytochrome P450 （P450）で行なわれると推定し、ゲノム配列に対して P450 のドメイン検索を実施した。その結果、P450 の 3 個のドメインを保持する ORF が一つだけ存在していた。この遺伝子を大腸菌に導入したところ、微弱ながら RS14 から RS9 への変換反応を確認した。そこで、*B. subtilis* を宿主とした発現検討を行ったたところ、100 μg/ml の基質濃度でほぼ定量的な変換反応を確認した。このように、我々は SANK 70214 株の RS14 から RS9 への変換を担う P450 遺伝子を推定するとともに、当該遺伝子を利用した異種発現系により、高効率で新規 Nrf2 活性化薬 RS9 を生産する方法を確立することができた。



Nrf2 activator, genome sequencing, cytochrome P450

講演番号：3A36a02
講演日時、会場：3 月 28 日 09:11～ A 校舎 36 会場

過酷な生育環境から単離された微細藻類がもつ新奇な環境ストレス耐性機構の解析
Novel systems to tolerate environmental stresses of the microalgae isolated from extreme severe environments

○岡田 和隆、長嶋 雄大、淺野 朋美、小俣 翼、加藤 聖子、田邉 義和、宮田 彩実、新村 洋一、川崎 信治（東農大バイオ）
○Kazutaka OKADA, Yuta NAGASHIMA, Tomomi ASANO, Tsubasa OMATA, Syoko KATO, Yoshikazu TANABE, Ami MIYATA, Yoichi NIIMURA, Shinji KAWASAKI (TUA-Bio)

【目的】　光合成生物は強光が付随する環境ストレス下では、活性酸素の生成を伴う光酸化ストレスを発生し枯死にいたる。我々は一般植物の生育が困難な過酷な生育環境（直射日光下の真夏のアスファルトやコンクリート壁、砂漠土壌など）から、光独立栄養的に生育する微細藻類を探索し、現在約70株の微細藻類を単離・保有している。これらは、淡水性でありながら強い塩耐性を示し、かつ強光下で水分が０％の乾燥下でも数ヶ月間生存するなど優れた環境ストレス抵抗性を示すことから、一般植物が持たない光酸化ストレス防御機構を保持することが推察された。真夏のアスファルトから単離した真核微細藻類のKi-4株は、強光が付随する環境ストレス下で、真核の植物界で初めての発見となる脂溶性のカロテノイド（アスタキサンチン）を結合する水溶性タンパク質（AstaPと命名）を大量に発現した。その同定と諸性質については昨年度の農芸化学会にて報告した[1)]。本学会では、AstaPの生物分布を調査した結果と、Ki-4株が保持する環境ストレス耐性能について分子生物学的な手法により解析を行った結果について報告する。

【方法・結果】過酷な生育環境から単離した微細藻類の中から液体培養に成功した菌株を使用して、AstaPの生産性を調査した。また生物界に広く分布するAstaPに高い相同性を示すホモログは全て機能未知であり、その機能解明に着手した。Ki-4株の強光下での環境ストレス耐性能に関しては、プロテオーム解析やRNA発現に着目した解析を行っている。

1)川崎ら　2014年農芸化学会 3A12a11

microalgae, photooxidative stress, astaxanthin

講演番号：3A36a03
講演日時、会場：3 月 28 日 09:22～ A 校舎 36 会場

出芽酵母α-マンノシダーゼ AMS1 の活性制御機構の解析
Nutrient status regulates α-mannosidase activity
○中井 大貴、槙島 一樹、氏原 将人、山本 祥平、若山 守、梅川 碧里（立命館大生命）
○ DAIKI NAKAI, KAZUKI MAKISHIMA, MASATO UJIHARA, SHOHEI YAMAMOTO, MAMORU WAKAYAMA, MIDORI UMEKAWA (Ritsumeikan Univ.)

S. cerevisiae のα-マンノシダーゼである AMS1 は、細胞質内で発現し、Cvt 経路及びオートファジーによって液胞へ輸送され、液胞における糖質分解を担うことが知られている。*S. cerevisiae* のいくつかの液胞内分解酵素は、窒素源飢餓により発現量が増加し、オートファジーによる細胞内へのアミノ酸供給に関わることが報告されているが、AMS1 の活性制御機構及び生理機能は明らかでない。

我々は、*S. cerevisiae* が有する糖鎖結合を含む基質 *p*NP-(α-Glucopyranoside, β-Glucopyranoside, α-Mannopyranoside)に対する無細胞抽出画分における分解活性を解析したところ、興味深いことに *p*NP-α-Mannopyranoside に対する分解活性のみ糖質飢餓条件下において顕著に上昇することを見出した。AMS1 の遺伝子欠損株及び AMS1 の過剰発現株を用いて栄養条件下、糖質飢餓条件下及び窒素源飢餓条件下における *p*NP-α-Mannopyranoside に対する分解活性を解析した結果、糖質飢餓及び窒素源飢餓によって AMS1 が強く誘導されることが明らかとなった。本酵素の活性上昇は、オートファジー及び Cvt 経路に必須な ATG1 の欠損株においては著しく抑制されたが、AMS1 の液胞輸送に関わる ATG19、ATG34 の両遺伝子欠損株においては野生株と同程度であったことから、本酵素の活性上昇にオートファジーは必要であるが、液胞への輸送は必要でないことが示唆された。

stress response, autophagy, carbohydrte metabolism

講演番号：3A36a04
講演日時、会場：3 月 28 日 09:33～ A 校舎 36 会場

HKR1 発現量と細胞極性制御および HM-1 キラートキシン耐性との関係

Expression levels of HKR1 effect cell polarity and resistance to HM1 killer toxin in saccharomyces cerevisiae

○鈴木 宇香、笠原 紳（宮城大・食産業・環境）
○UKYO SUZUKI, SHIN KASAHARA (Miyagi Univ.)

Hansenula mrakii（*Williopsis saturnus* var. *mrakii*）が生産する HM-1 キラー・トキシンは，*Saccharomyces cerevisiae* に対して極めて高い殺菌作用を示す。その作用点は，細胞壁 β−グルカン合成系であるとされている。*S. cerevisiae* の細胞表層ムチン様タンパク質 Hkr1p は，HOG（High-Osmolarity Glycerol）経路，CWI（Cell Wall Integrity）経路と関連して同菌の浸透圧応答や細胞壁構築等を制御するとの報告があるが，当初はその過剰発現により HM-1 キラー・トキシンに対する耐性を付与する因子として同定，単離されたものである。Hkr1p は 1 回の膜貫通領域をもち，全構成アミノ酸のうち約 80%が細胞外に存在している。その細胞外領域はセリンとスレオニンに富み，高度に糖鎖付加されて細胞壁マンナンの骨格を構成していると考えられる。また，その細胞内領域にはカルシウムイオン結合モチーフである EF ハンドを有している。細胞外領域を含めた全体構造は，同菌の Msb2p と酷似しているが，Msb2p の過剰発現は HM-1 キラー・トキシン耐性をもたらさず，機能的には一致しない点も多い。

S. cerevisiae の *GAL1* プロモーター支配下に当該遺伝子 *HKR1* を配置し，誘導的過剰発現による HM-1 キラー・トキシン耐性を評価したところ，対照実験として逆方向に *HKR1* を挿入した場合に極めて強い HM-1 キラー・トキシン耐性が認められた。このクローンでは，転写によりアンチセンス RNA が生じることで，*HKR1* の正常な転写産物が不活性化されていると考えられた。この結果から，Hkr1p の過剰発現のみならず発現抑制によっても HM-1 キラー・トキシン耐性が獲得されると推察された。また，これらの Hkr1p の過剰発現株および発現抑制株について，Calcofluor 染色により出芽方向性に基づく細胞極性の変化を観察したところ，いずれの場合も野生株と比較して極性喪失等の顕著な相違が見られた。このことから，Hkr1p が通常レベルで発現している場合には細胞極性は正常に維持されるが，HM-1 キラー・トキシンに対する感受性が高く，Hkr1p の発現レベルが通常よりも高い，または低い場合においては細胞極性は乱れ，HM−1 キラー・トキシンに対する感受性が低くなっていることが示された。

これらの知見および Hkr1p と HOG 経路，CWI 経路との関連性についての一連の報告を総合して，HM-1 キラー・トキシンの作用機作の詳細な解明と Hkr1p 発現レベルの変化による HM-1 トキシン耐性の獲得機構について考察したい。

(参考) Miyamoto, M. *et al.* (2012) *Yeast* **29:** 475-

HKR1, killer toxin, cell polarity

講演番号：3A36a05
講演日時、会場：3 月 28 日 09:44～ A 校舎 36 会場

The role of intracellular manganese ion accumulation in yeasts against gamma-irradiation

○Masakazu Furuta[1], Tuan Anh Do[1,3], Morio Murata[1], Masao Kishida[2] ([1]Osaka Prefecture Univ. Eng., [2]Osaka Prefecture Univ. Bio., [3]IET-VAST)

Background: Manganese ions play an important role in activities of cells as a divalent cation to protect cells from oxidative damage. Following Barnese., et al (2008); McNaughton., et al (2010) with the presence of manganese and phosphate in the yeast cell can protect cell against oxidative damage. Interestingly, in our work, we find out the isolated yeast strain of *Saccharomyces cerevisiae* – named *S. cerevisiae* IM3 - the variants strain, which have four to five-fold accumulate manganese than the original yeast *Saccharomyces cerevisiae* BY4741. Can a higher manganese accumulation help the yeast cells more resistant to gamma-irradiation stress? Therefore *S. cerevisiae* BY4741 and the variants *S. cerevisiae* IM3 were grown in media that supplemented with manganese ion were subjected to gamma-irradiation.

Materials and Methods: The both yeast strains were grown in YPD media supplemented with various concentration of manganese ion. After diluted approximately $5x10^7$cells/ml in YPD media of the cell suspensions were irradiated with gamma-irradiation with the doses of 0.5kGy, 1.0kGy, 1.5kGy, 2.0kGy to 2.5kGy. After irradiation, cell suspensions were diluted by saline solution and spread out in YPD-agar plates and incubated for 3- 4 days. Cell viability was determined by colony counting and survival rates were calculated.

Results: The both Yeast strains showed slightly resistant to gamma-irradiation with increasing supplemented with manganese at the concentration of 0.5mM, 1mM, 2mM, and even 10mM, suggesting that manganese might be contributing for preventing oxidative stress caused by gamma-irradiation.

Saccharomyces cerevisiae, gamma-irradiation, Manganese accumulation

講演番号：3A36a06
講演日時、会場：3 月 28 日 10:05～ A 校舎 36 会場

酵母の酢酸耐性獲得における 7 回膜貫通型タンパク質 Mrh1 と Yro2 の寄与

Mrh1 and Yro2 are involved in acetic acid tolerance in Saccharomyces cerevisiae

○河添 希美、高畠 暁子、井澤 真吾（京工繊大応生）
○Nozomi Kawazoe, Akiko Takabatake, Shingo Izawa (Kyoto Inst. Tech.)

木質・草本系バイオマスから製造されるバイオエタノールは、食糧資源と競合しないことや未利用資源有効活用の点から更なる普及が期待されている再生可能エネルギーである。木質・草本系バイオマスの糖化前処理などで生じる酢酸は、酵母の生育と発酵能を抑制する発酵阻害物質であり、バイオエタノールの製造コスト改善や普及促進をはかる上で大きな障壁となっている。そのため、酵母の酢酸耐性の向上が強く求められているが、酢酸ストレスに対する酵母の応答機構は未だ十分に解明されていないのが現状である。

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の *MRH1* 遺伝子とそのパラログである *YRO2* 遺伝子は 7 回膜貫通型タンパク質をコードしている。両タンパク質のアミノ酸配列は 67%が同一であるが、細胞内でどのような機能を担っているのかはよくわかっていない。*YRO2* 遺伝子の転写は弱酸応答性の転写因子 Haa1 によって活性化すると報告されていたが、*YRO2* のプロモーター領域に Haa1 の認識配列がないことから直接の標的遺伝子ではないと考えられている(*Nucleic Acids Res.* **39**, 6896-6907, 2011)。今回、酢酸ストレス応答における *YRO2* と *MRH1* の挙動を解析した結果、*YRO2* の発現が酢酸ストレスや定常期への移行によって誘導されるのに対し、*MRH1* はストレスに応答せず構成的に発現していることが転写レベルおよびタンパク質レベルで明らかとなった。さらに、両タンパク質は細胞膜表面にドット状に局在することが確認された。各遺伝子の破壊株(*yro2*Δ, *mrh1*Δ, *yro2*Δ*mrh1*Δ)を解析したところ、酢酸ストレス下で遺伝子破壊株の生育が著しく遅延していたことから、酢酸耐性獲得に両タンパク質が関与していると考えられた。さらに、酢酸ストレス下でのアルコール生成能も *yro2*Δ*mrh1*Δ株は顕著に低かったことから、効率的なバイオエタノールの製造において Yro2 と Mrh1 が重要な役割を担っていると考えられた。一方で、乳酸ストレスや熱ショックストレス、栄養枯渇ストレスなどに対する感受性については野生株と *yro2*Δ*mrh1*Δ株で有意な違いは見られなかった。両者が膜タンパク質であることから、細胞質での酢酸の代謝ではなく、細胞内への酢酸の流入やプロトン排出の制御を介して、酢酸耐性の獲得に寄与しているのではないかと考えられた。

Acetic acid stress, Bioethanol, Seven-transmembrane protein

講演番号：3A36a07
講演日時、会場：3 月 28 日 10:16～ A 校舎 36 会場

エタノールストレス下の酵母 mRNA flux に対する TREX-2 構成因子欠損の影響

Effects of TREX-2 component deficiency on yeast mRNA flux under ethanol stress conditions

○石田 陽子[1]、河合 孝朗[1]、池田 佳代[2]、井上 善晴[2]、井澤 真吾[1] ([1]京工繊大応生、[2]京大農)
○Yoko ISHIDA[1], Takao KAWAI[1], Kayo IKEDA[2], Yoshiharu INOUE[2], Shingo IZAWA[1] ([1]Kyoto Inst. Tech., [2]Kyoto Univ.)

酵母自身のアルコール発酵によって生成するエタノールは、日本酒やワインの醸造過程終盤で高濃度に達するため、ストレス源となって酵母の mRNA flux にも様々な変化を引き起こす。実験室条件下では、5～6% (v/v)のエタノールストレスによって翻訳活性の低下が誘導され始め、10%エタノールストレスでは著しく翻訳活性が抑制されてしまう。また、非翻訳状態の mRNA と RNA 結合タンパク質によって細胞質中に形成される P-body や stress granule (SG)に関しても、6%以上のエタノールストレスによって P-body の形成が活発になり、10%以上では SG も形成されることが報告されている(*Biosci. Biotechnol. Biochem*. **71**, 2800-2807, 2007; *Yeast* **28**, 339-347, 2011)。エタノールストレスは mRNA の核外輸送に対しても影響を与え、bulk poly(A)$^+$ mRNA の核外輸送が 6%エタノールによって阻害され始め、10%エタノールストレス下では大部分の mRNA が核内に蓄積してしまう。これは、ストレス下で緊急性を要する mRNA を効率的に輸送するために不要不急の mRNA の輸送を抑制する「選択的な mRNA の核外輸送」が行われているためだと考えられている。その際には、Rat8/Dbp5 や Gle2 などの mRNA 核外輸送関連因子がエタノール濃度依存的・可逆的に核内に蓄積することも報告されている(*J. Cell Sci.* **117**, 4189-4197, 2004; *J. Biol. Chem.* **279**, 35469-35478, 2004)。

今回、mRNA 核外輸送阻害に関するエタノール高感受性株のスクリーニングを行った結果、TREX-2 の構成因子である Sac3 と Thp1 の欠損株では、野生株よりも低濃度のエタノールストレスで Rat8 が核に蓄積してしまうことを見出した。FISH 解析で mRNA の細胞内局在を解析したところ、*sac3*Δ株や *thp1*Δ株では 2-3%のエタノールストレスで bulk poly(A)$^+$ mRNA が核内に蓄積することが確認された。TREX-2 は Sac3、Thp1、Sus1、Sem1 および Cdc31 によって構成される核内タンパク質複合体であり、核膜孔を介した核-細胞質間物質輸送に関与している(*Biochim. Biophys. Acta* **1819**, 555-565, 2012)。Sac3 と Thp1 以外の TREX-2 構成因子の欠損株・変異株でも *sac3*Δ株や *thp1*Δ株と同様の傾向が認められたことから、エタノールストレス下での mRNA の選択的核外輸送に TREX-2 が深く関与していると考えられた。mRNA の核外輸送だけでなく、翻訳や mRNA 分解などに対しても TREX-2 が関与するのかを明らかにするため、TREX-2 構成因子の欠損や変異が、翻訳抑制ならびに P-body や SG の形成に及ぼす影響について現在検討を行っている。

mRNA flux, ethanol stress, TREX-2

講演番号：3A36a08
講演日時、会場：3 月 28 日 10:27～ A 校舎 36 会場

出芽酵母 RNase T2 が関与するリボソーム分解機構の解析
Mechanism of ribosome degradation involved in the yeast RNase T2, Rny1p
○陣内 凱、島 日佳理、大石 早希子、大本 哲也、小川 哲弘、日高 真誠、正木 春彦（東大院農生科・応生工）
○Gai Jinnai, Hikari Shima, Sakiko Oishi, Tetsuya Omoto, Tetsuhiro Ogawa, Makoto Hidaka, Haruhiko Masaki (Univ. of Tokyo)

【目的】分泌型リボヌクレアーゼである RNase T2 は、一本鎖 RNA を非特異的に分解する。解読されたほぼ全ての生物ゲノムにコードされることから、生物学的に重要かつ普遍的な役割を持つと考えられるが、機能についてはほとんど明らかにされてない。近年、シロイヌナズナやゼブラフィッシュにおいて、RNase T2 が rRNA を分解することが明らかにされた。我々は、出芽酵母 RNase T2（Rny1p）が、ラパマイシンに応答して rRNA を分解すること、これを通して生育の適応化を図ることを報告した [1)]。また、最近 Rny1p が液胞に局在することが明らかにされた。そこで、本研究では Rny1p の rRNA 分解がリボソーム動態へ及ぼす影響、および Rny1p の細胞内局在性に注目して解析を進めた。

【方法・結果】ラパマイシンを作用させた野生株、*rny1*Δ株より total RNA を調製し、定量 PCR により 35S, 18S, 25S rRNA 量を定量して比較した。35S rRNA 量は、ラパマイシンの添加により両株共に著しく減少した。一方で 18S, 25S rRNA 量については野生株では減少が見られたものの、破壊株では、その減少の程度は低かった。ラパマイシン処理により野生株、破壊株共に前駆体である 35S rRNA の転写が抑制され、かつ野生株では Rny1p 依存的に成熟リボソーム内の rRNA が分解されるが、破壊株ではこの分解が起こらないと考えられる。また、ラパマイシンを作用させた野生株、*rny1*Δ株を液胞および核酸染色して顕微鏡観察を行った。*rny1*Δ株ではラパマイシンにより液胞内に核酸が蓄積する様子が観察され、Rny1p が液胞で rRNA を分解することが分かった。次に、Rny1p による rRNA 分解が、リボソームそのものの分解に影響するかを調べた。そこで、ラパマイシンを作用した後、リボソームタンパク質 Rpl28p 量をウエスタンブロッティングにより定量し、これを指標にリボソーム量の変動を経時的に調べた。その結果、野生株では時間経過に応じて Rpl28p の減少が見られたが、破壊株ではその程度が緩やかであった。Rny1p による rRNA 分解が、リボソームそのものの分解にも影響を及ぼすことが分かった。

1) 陣内ら、日本農芸化学会 2014 年度大会講演要旨集

ribonuclease, stress response, ribosome

講演番号：3A36a09
講演日時、会場：3 月 28 日 10:38～ A 校舎 36 会場

酵母細胞における青枯病菌エフェクターの膜局在化メカニズムの解析

Functional analysis of the membrane-targeting mechanism of a Ralstonia solanacearum effector in yeast cells

忻 詩博、加本 佳大、藤原 祥子、東構 真城、田中 直孝、○田淵 光昭（香川大農）
Subo SHIN, Yoshihiro KAMOTO, Shoko FUJIWARA, Mashiro HIGASHIGAMAE, Naotaka TANAKA, ○Mituskai TABUCHI (Kagawa Univ.)

動物や植物に感染する病原性細菌の多くはⅢ型分泌装置と呼ばれる構造物を介して病原因子であるエフェクターを宿主細胞内に直接注入し、エフェクターによって宿主細胞内の様々な細胞機能を阻害することにより最終的に感染を成立させている。エフェクターの分子機能の解明は、病原菌の感染戦略を理解する上で重要であるが、エフェクターの多くは一次構造から機能を予測することが困難であり、未だに多くのエフェクターが機能不明な状態にある。一部のエフェクターは酵母細胞内で発現させることによりエフェクターの宿主標的因子の酵母カウンターパートに作用することにより酵母に増殖阻害を引き起こすことが知られており、酵母システムの有用性が示されている。

我々は植物病原性細菌である青枯病菌のエフェクターについて、酵母発現系を用いて分子機能の解明を試みてきた。これまでに青枯病菌エフェクター38 個について酵母発現系を用いて調べたところ 8 個のエフェクターが酵母に増殖阻害を引き起こすことを見出した。それらの中で、非病原力遺伝子 AvrA として報告されている RSc0608 は、酵母細胞内において娘細胞膜特異的に発現するという特徴的な局在を示した。本研究では、RSc0608 についての酵母発現系を用いた詳細な機能解析について報告する。

RSc0608 は、230 アミノ酸からなるタンパク質であり、一次構造をもとにモチーフ検索を行ったところ、膜貫通ドメインを含めて機能を推定できるような特徴的なドメインは見られなかった。そこで、RSc0608 の機能ドメインを明らかにするため、二次構造予測により推定されたαヘリックス、βシート単位で N 末端および C 末端からそれぞれ欠失変異体を作製し、酵母で発現させることによりその局在および増殖阻害活性について解析した。その結果、RSc0608 の細胞膜への局在化に必須な機能ドメインが N 末端部分に、そして増殖阻害活性を有する機能ドメインは C 末端部分に存在することが明らかとなり、これら 2 つの機能ドメインは互いに独立していることが明らかになった。また、N 末端の膜局在化ドメインの一部には増殖阻害活性を抑制する自己阻害ドメインと考えられる機能ドメインの存在が示唆された。これより、RSc0608 は、細胞膜への局在化を介してエフェクターとしての機能を獲得している可能性が示唆された。

また、RSc0608 の膜局在化メカニズムについて解析したところ、RSc0608 は形質膜に特異的に局在化する膜脂質であるホスファチジルイノシトール 4,5-2 リン酸やホスファチジルセリン非依存的に膜に局在化した。

pathogen effector, Saccharomyces cerevisiae, membrane targeting

講演番号：3A36a10
講演日時、会場：3 月 28 日 10:49～ A 校舎 36 会場

宿主内因子によりグルタチオン分解活性を獲得する病原菌エフェクターの酵母システムによる解析

Functional analysis of a plant pathogen effector protein, which acquires γ-glutamyl cyclotransferase activity by the host endogenous factors

○藤原 祥子[1]、川添 智貴[1]、長谷川 純一[1]、田中 直孝[1]、大西 浩平[2]、田淵 光昭[1] ([1]香川大学農、[2]高知大学遺伝子実験施設)
○Shoko FUJIWARA[1], Tomoki KAWAZOE[1], Junnichi HASEGAWA[1], Naotaka TANAKA[1], Kouhei OHNISHI[2], Mitsuaki TABUCHI[1] ([1]Kagawa Univ., [2]Kochi Univ.)

ヒトや植物に感染する病原菌の多くは、Ⅲ型分泌装置と呼ばれる構造物を介して、宿主細胞内にエフェクターと呼ばれる病原因子を注入することで感染を成立させている。エフェクターの分子機能の解明は、病原菌の感染戦略を理解する上で重要である。

一部のエフェクターは酵母細胞において発現させると宿主標的因子の酵母カウンターパートに作用することにより酵母増殖阻害を引き起こすことが知られている。我々は酵母増殖阻害を引き起こす、細菌性植物病原菌である青枯病菌のエフェクターRSp1022 に着目し、機能解析を行ってきた。昨年の本大会において我々は、RSp1022 が細胞内レドックス恒常性維持に必須の役割を果たすグルタチオン（GSH)を分解するγ-グルタミルシクロトランスフェラーゼ（γ-GCT)であること、本酵素は青枯病菌細胞内で不活性な状態として合成され、宿主真核生物由来の未同定の活性化因子によって活性を獲得している可能性について報告した。今回、RSp1022 活性化因子を同定したので報告する。

我々は大腸菌で発現、精製した不活性型 RSp1022 の活性化を指標として、酵母タンパク質抽出液から RSp1022 活性化因子を各種クロマトグラフィーにより精製し、最終的に質量分析により Activator タンパク質を同定した。不活性型 RSp1022 は酵母野生株の抽出液を添加すると活性化するが、Activator 遺伝子を欠損させた酵母株の抽出液は RSp1022 を活性化しなかった。また、大腸菌で発現、精製した酵母 Activator 及びその植物ホモログは、試験管内で RSp1022 を濃度依存的に活性化した。さらに、Activator によって活性化された RSp1022 と、酵母内在性γ-GCT である Gcg1 の比活性を比較したところ、活性型 RSp1022 は Gcg1 の約 50 倍もの高い比活性を示した。以上の結果から、RSp1022 は宿主細胞中で Activator により活性化され、宿主内在性の ChaC タンパク質よりもはるかに高い活性で、宿主細胞内の GSH を枯渇させることで病原性を発現することが考えられた。

しかし Activator のホモログは原核生物から真核生物に至るまで存在していた。そこで、各種生物由来の Activator ホモログを比較し系統樹を作成したところ、真核生物型と原核生物型に分類された。また、青枯病菌の Activator タンパク質は、試験管内で RSp1022 を全く活性化できなかった。これより RSp1022 は、真核生物型 Activator を特異的に認識し、活性化する機構を持つと考えられた。

さらに興味深いことに、Yeast two hybrid 法による解析により、RSp1022 は植物における病原菌に対する免疫応答時に特異的に発現することが知られる Activator isoform と特に強い相互作用を示した。これより、RSp1022 は宿主細胞の免疫応答を利用した活性化機構をもつ可能性が示唆された。

pathogen effector, yeast, glutathione

講演番号：3A36a11
講演日時、会場：3 月 28 日 11:10～ A 校舎 36 会場

酵母ユビキチンリガーゼ Rsp5 とアダプタータンパク質によるタンパク質の品質管理機構
Protein quality control through the ubiquitin ligase Rsp5 and its adaptor proteins in yeast.

○志賀 岳希、渡辺 大輔、高木 博史（奈良先端大・バイオ）
○Takeki SHIGA, Daisuke WATANABE, Hiroshi TAKAGI (Nara Inst. Sci. Tech.)

【目的】酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は、製パンや醸造、バイオエタノール等の生産に幅広く利用されており、産業上重要な有用微生物である。しかしながら、これらの発酵生産環境には、高温、高濃度エタノール、高浸透圧など多様なストレスが複合的に存在し、それらは酵母の有用機能の抑制を引き起こす。とりわけ細胞膜上のタンパク質は直接的にこれらの環境ストレスに曝され、常に変性の危機に瀕している。しかしながら、細胞内のタンパク質については分子シャペロンによる修復やオートファジーによる分解など変性タンパク質の除去機構が多く研究されているのに対し、細胞膜タンパク質の品質管理機構についての研究例は少なく、その詳細については未だ不明な点も多い。当研究室ではこれまでに、様々な環境ストレスに対して感受性を示す Rsp5 変異株（*rsp5*^{A401E}）を取得している。Rsp5 は Nedd4 ファミリーに属するユビキチンリガーゼで、多くの細胞膜タンパク質のユビキチン化とエンドサイトーシスに必要である。本研究では、Rsp5 を介した細胞膜タンパク質の品質管理機構が酵母のストレス耐性に重要な役割を果たしていると考え、そのメカニズムの解明を目的としている。

【方法と結果】まず初めに、細胞膜上のアミノ酸パーミアーゼ Gap1 を Rsp5 のモデル基質として、エタノールを発酵環境におけるモデルストレスとして、ストレスにより誘導される Rsp5 を介した Gap1 のユビキチン化とエンドサイトーシスに関する解析を行った。その結果、ストレス下で Rsp5 依存的な Gap1 のポリユビキチン化とエンドサイトーシスが認められた。Gap1 のユビキチン化とエンドサイトーシスは、すでに硫酸アンモニウムのような資化しやすい窒素源によって誘導されることが知られており、その際にはアダプタータンパク質 Bul1/2 が Gap1 と Rsp5 を仲介することが報告されている。一方、ストレス下での Gap1 のエンドサイトーシスには、Bul1/2 以外のアダプタータンパク質が関与する可能性を見出した。そこで次に、ストレス下でこの両者を仲介するアダプタータンパク質の探索を試みた。その結果、アレスチン様アダプタータンパク質 Art1 について、単独の欠損では Gap1 のエンドサイトーシスに大きな影響は見られなかったが、Bul1/2 も同時に欠損させた三重遺伝子破壊株において、ストレス下での Gap1 のエンドサイトーシスが阻害されることが明らかになった。また興味深いことに、Art1 の単独欠損のみによって、種々のストレスに対する感受性が上昇したため、Art1 が細胞膜タンパク質の品質管理とは別のメカニズムによりストレス応答にも関与することが示唆された。現在、ストレス応答遺伝子の発現制御に着目し、さらなる解析を進めている。

Rsp5, stress response, quality control

講演番号：3A36a12
講演日時、会場：3 月 28 日 11:21～ A 校舎 36 会場

酵母ユビキチンリガーゼ Rsp5 の WW ドメインを介した基質認識機構の解析

The mechanism of WW domain-mediated substrate recognition by yeast ubiquitin ligase Rsp5

○村井 浩紀、佐々木 俊弥、渡辺 大輔、高木 博史（奈良先端大・バイオ）
○Hiroki Murai, Toshiya Sasaki, Daisuke Watanabe, Hiroshi Takagi (Nara Institute of Science and Technology)

【目的】酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の HECT 型ユビキチンリガーゼ Rsp5 は、細胞膜上の多くのタンパク質をユビキチン化し、エンドサイトーシスを誘導することで、環境応答やタンパク質品質管理などの重要な生命現象に深く関わっている。Rsp5 には、WW ドメインと呼ばれる保存性の高い基質結合ドメイン（WW1, WW2, WW3）がタンデムに存在している。しかし、基質認識の役割を果たす WW ドメインがなぜ複数存在し、これらが多様な基質タンパク質をどのように正確に認識するのかは明らかになっていない。そこで本研究では、Rsp5 の WW ドメインを介した基質認識機構の解明を目的として、WW ドメイン内のアミノ酸残基を置換した Rsp5 変異株を用いた解析を行った。
【結果と考察】Rsp5 の基質であるアミノ酸パーミアーゼ Gap1 は、プロリンやアラントインなどの資化しにくい窒素源のみ存在する環境では細胞膜上に局在し、アミノ酸を細胞内に取り込む。しかし、アンモニウムイオンなどの資化しやすい窒素源の存在下ではアミノ酸の取込みが不要となるため、Gap1 はアダプタータンパク質 Bul1 および Bul2（Bul1/2）を介して Rsp5 によりユビキチン化され、エンドサイトーシスを経て分解される。この機構に関与する WW ドメインを同定するために、各 WW ドメインにおいて基質結合に必要な「Trp-X-X-Pro」モチーフを「Phe-X-X-Ala」に置換した変異株（*rsp5-ww1*, *rsp5-ww2*, *rsp5-ww3*）を作製した。その結果、すべての変異株が Gap1 のエンドサイトーシスに欠損を示したことから、Rsp5 のいずれの WW ドメインも Gap1 のユビキチン化に必要であると考えられる。また当研究室での先行研究において、WW2 ドメイン内の Thr357 のリン酸化が Gap1 のエンドサイトーシスを阻害したことから（Sasaki & Takagi, *Gene Cells*, 2013）、WW1, WW3 ドメイン内の Thr357 に相当する残基（Thr255, Thr413）をアラニンに置換した変異株（$rsp5^{T255A}$, $rsp5^{T413A}$）を解析した。その結果、いずれの変異株も Gap1 のエンドサイトーシスが抑制されたため、Thr255, Thr413 のリン酸化は、Thr357 の場合とは逆に Gap1 のエンドサイトーシスを促進することが示された。したがって、各 WW ドメインのリン酸化による基質認識の制御には特異性があることが明らかとなった。以上の結果から、Rsp5 の Bul1/2 を介した Gap1 の認識において、WW ドメイン間の協調的な相互作用と各 WW ドメインの選択的なリン酸化制御の重要性が示唆された。現在、免疫共沈実験により、WW ドメイン内の各アミノ酸置換が Bul1/2 の認識に及ぼす影響をより直接的に解析している。

Rsp5, WW domain, Ubiquitin ligase

講演番号：3A36a13
講演日時、会場：3 月 28 日 11:32～ A 校舎 36 会場

分泌経路遮断時のシグナル伝達における Sch9 の機能解析

Function of Sch9 in the secretory response.

○矢吹 友佳理、船戸 耕一、水田 啓子（広島大院）
○Yukari YABUKI, Kouichi FUNATO, Keiko MIZUTA (Hiroshima Univ.)

【目的】

細胞が正常に増殖するためには、染色体の複製だけでなく、細胞膜や細胞壁など細胞を構成する様々な成分がバランスよく合成される必要がある。細胞はリボソームの生合成に莫大なエネルギーを費やしているため、その生合成量は他の細胞内制御機構と連携して厳密に調節されている。出芽酵母において、出芽時の膜合成に必須な分泌経路に欠陥が生じると、リボソーム蛋白質遺伝子や rRNA 遺伝子の転写が特異的、かつ顕著に抑制される。分泌経路の停止は、細胞表層ストレスセンサーWsc によって感知され、そのシグナルがプロテインキナーゼ C (Pkc1)を経て核内へ伝達されると考えられているが、その詳細な機構は明らかにされていない。

近年、分泌経路の遮断は TORC1 下流でリボソーム生合成を正に制御する Sch9 のリン酸化型の割合を減少させることが報告されている（Lempiäinen H *et al.* 2009)。このことから、分泌経路遮断時におけるリボソーム蛋白質遺伝子の転写抑制は、Sch9 の活性低下によるものである可能性について検討したので、その結果を報告する。

【方法・結果】

活性化型と不活性化型の Sch9 発現株、*SCH9* の破壊株を用いて分泌経路遮断時のリボソーム蛋白質遺伝子の転写を調べた。その結果、活性化型 Sch9 発現株において、分泌経路遮断時のリボソーム蛋白質遺伝子の転写は野生株と同様に抑制されていた。一方、不活性化型 Sch9 発現株および *SCH9* の破壊株は、分泌経路遮断時のシグナル伝達に欠陥を示した。また、分泌経路阻害剤添加時におけるリボソーム蛋白質遺伝子の転写抑制のタイミングとリン酸化型 Sch9 の減少のタイミングを比較した結果、リン酸化型 Sch9 の割合はリボソーム蛋白質遺伝子の転写抑制に先立って減少する訳ではなかった。これらの結果から、分泌経路遮断時のリボソーム蛋白質遺伝子の転写抑制は Sch9 の不活性化によって引き起こされるものではないことが示唆された。しかしながら、分泌経路遮断後の後期にはリン酸化型 Sch9 の減少が観察された。

以上の結果から、分泌経路遮断時のシグナル伝達において、初期の段階では活性化型 Sch9 が必要であり、その後 Sch9 が不活性化される必要がある、つまり、分泌経路遮断時のシグナル伝達は、複数の経路によって時空間的に制御されていることが示唆された。

ribosome biogenesis, vesicle transport, Sch9

講演番号：3A36a14
講演日時、会場：3 月 28 日 11:43～ A 校舎 36 会場

細胞形態形成ネットワーク MOR 経路と微小管制御系との機能関連性

Study on a functional linkage between Morphogenesis Orb6 network and microtubules.

○金子 さゆり[1]、水沼 正樹[2]、平田 大[2,3]、久米 一規[2]([1]広島大・工、[2]広島大・院先端研、[3]朝日酒造)
○Sayuri KANEKO[1], Masaki MIZUNUMA[2], Dai HIRATA[2,3], Kazunori KUME[2] ([1]Hiroshima Univ., [2]AdSM. Hiroshima Univ., [3]Asahi-Shuzo Sake Brewing Co.,Ltd.)

【目的】分裂酵母は、細胞周期を通して直径が一定で細胞端でのみ極性成長する円筒形の細胞形態を示す。その成長極性は細胞周期と連動してダイナミックに変化する。細胞が円筒形を維持するためには、細胞骨格であるアクチンと微小管が重要であり、特に、アクチンは、成長極性部位（細胞端）に局在し，円筒形の維持に必須である。我々はこれまでに、本制御に関わるシグナル伝達経路として、細胞形態形成ネットワーク・ＭＯＲ経路（Ｍｏｒｐｈｏｇｅｎｅｓｉｓ　Ｏｒｂ６　ｎｅｔｗｏｒｋ）を明らかにした。ＭＯＲ経路は、進化上保存されたＰｍｏ２５、Ｎａｋ１、Ｏｒｂ６、Ｍｏｒ２により構成され、細胞質分裂後の細胞極性の確立と細胞極性の維持に重要である。ＭＯＲ経路変異体はすべて制限温度で、アクチンが細胞全体に分散した球形の細胞形態異常を示す。さらに興味深いことに、*ｏｒｂ６*および*ｍｏｒ２*変異体が、微小管重合阻害剤（ＴＢＺ）に強い感受性を示すことから、ＭＯＲ経路と微小管制御系との機能的関連性が示唆された。しかしながら、その詳細は不明である。そこで我々は、ＭＯＲ経路が関わる微小管制御系の全容を明らかにするために、*ｍｏｒ２*変異体が示す、ＴＢＺ感受性を抑圧する*ｓｕｐ*変異体（６遺伝子座に分類）を取得し、解析を進めている。本研究では、６遺伝子座に分類された*ｓｕｐ*変異体のうち、既知の*ｎｄａ２*（α-ｔｕｂｕｌｉｎ）および*ｎｄａ３*（β-ｔｕｂｕｌｉｎ）を除く、４つの*ｓｕｐ*変異体について解析を行った。
【方法・結果】*ｓｕｐ*単独変異体および*ｍｏｒ２ｓｕｐ*二重変異体は、微小管重合阻害剤（ＴＢＺ）に対し、野生株と同程度もしくはそれ以上の耐性を示すことから、微小管が安定化していることが予想された。そこで、α-ｔｕｂｕｌｉｎにＧＦＰを連結した株を用い、野生株および*ｓｕｐ*変異体での細胞質微小管構造を観察した。その結果、*ｓｕｐ*変異体では、野生株に比べ、細胞端に到達した微小管の数が増加していた。通常、細胞質微小管は、細胞中央にある核近傍から、細胞端に向かって伸長し、細胞端に到達すると脱重合へと切り替わり、収縮する。つまり、*sup* 変異により微小管の安定化が促進されていることが示唆された。現在、*ｓｕｐ*変異の原因遺伝子を同定するために、クローニングを行っている。

Cell morphogenesis, Microtubule, Fission yeast

講演番号：3A36a15
講演日時、会場：3 月 28 日 11:54～ A 校舎 36 会場

DNA 複製チェックポイント経路による成長極性制御に関わる遺伝子の探索
Search for genes are related with the regulation of growth polarity by DNA replication check-point pathway
○鈴木 将司[1]、水沼 正樹[2]、平田 大[2,3]、久米 一規[2]([1]広島大・工、[2]広島大・院先端研、[3]朝日酒造)
○Masashi SUZUKI[1], Masaki MIZUNUMA[2], Dai HIRATA[2,3], Kazunori KUME[2] ([1]Hiroshima Univ., [2]AdSM. Hiroshima Univ., [3]Asahi-Shuzo Sake Brewing Co.,Ltd.)

【目的】細胞極性は、細胞増殖と連動し、適切に制御されるが、その連携制御機構については不明である。我々は、単細胞真核生物・分裂酵母を用い、細胞極性と細胞増殖（細胞周期）との連携制御機構の解明を目指している。分裂酵母は、細胞周期を通して直径が一定で、細胞端でのみ極性成長する。その成長極性は細胞周期と連動しダイナミックに変化する。特に、細胞は、Ｇ２期初期に、その成長極性を単極成長から両極成長へと変換する。この成長極性変換点をＮＥＴＯ（ＮＥＴＯ：ｎｅｗ　ｅｎｄ　ｔａｋｅ　ｏｆｆ）と呼ぶ。ＮＥＴＯ遂行には、ＤＮＡ複製の完了と一定の細胞サイズへの到達が必要であるが、それらをモニターし、ＮＥＴＯを制御する分子機構の実体は不明であった。しかし、当研究室の最近の解析から、高温で増殖停止しＮＥＴＯの起こらない単極成長変異体の原因遺伝子として、*ｐｏｌ１*（ＤＮＡ　ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ−α)が同定され、さらに、*ｐｏｌ１*変異体（ＤＮＡ複製異常時）では、高温でＲａｄ３−Ｃｄｓ１（ＤＮＡ複製チェックポイントキナーゼ）依存的に、細胞周期遅延のみならずＮＥＴＯ遅延が誘導されることがわかった。さらに、そのＮＥＴＯ遅延機構には、Ｃｄｓ１の下流で、Ｃａｌｃｉｎｅｕｒｉｎ（ＣＮ：Ca^{2+}／ｃａｌｍｏｄｕｌｉｎ−ｄｅｐｅｎｄｅｎｔ　ｐｈｏｓｐｈａｔａｓｅ)、微小管安定化因子・Ｔｉｐ１が必要で、その詳細な制御機構として、ＤＮＡ複製異常時に、活性化したＣｄｓ１が、ＣＮをリン酸化することにより活性化し、活性化したＣＮは、Ｔｉｐ１を脱リン酸化することにより、微小管安定化を伴う、ＮＥＴＯ遅延を誘導することが明らかになった(1)。しかし、ＣＮは、通常細胞内Ca^{2+}濃度の上昇により活性化されるが、*ｐｏｌ１*変異体でのＣＮ活性化に、細胞内Ca^{2+}濃度の調節機構が必要かどうかは不明である。そこで、本研究では、ＤＮＡ複製異常時のＣｄｓ１によるＣＮ活性化機構を明らかにするため、細胞内Ca^{2+}濃度調節因子に注目し、*ｐｏｌ１*変異体が示すＮＥＴＯ遅延に関与する遺伝子を探索した。

【方法・結果】Ｐｏｍｂｅ　Ｇｅｎｅ　Ｄａｔａ　Ｂａｓｅをもとに、細胞内Ca^{2+}濃度調節に関わる１７遺伝子のうち、非必須遺伝子について、それぞれの遺伝子破壊株と*ｐｏｌ１*変異体との二重変異体を構築し、制限温度での細胞形態を観察した。その結果、複数の遺伝子破壊により、*ｐｏｌ１*変異のＮＥＴＯ遅延が部分的に抑圧された。現在、これらの遺伝子破壊株におけるＣＮ活性化への関与、Ｃｄｓ１、ＣＮとのＮＥＴＯ遅延における機能的上下関係について解析をすすめている。

１、ＫｕｍｅＫ．*ｅｔ　ａｌ．*，Ｎａｔ．　Ｃｅｌｌ　Ｂｉｏｌ．，１３：２３４−２４２（２０１１）

checkpoint, cell polarity, calcineurin

講演番号：3A36p02
講演日時、会場：3 月 28 日 14:11～ A 校舎 36 会場

高圧二酸化炭素処理によるバイオフィルムの殺菌

Inactivation of biofilm by high-pressure carbon dioxide treatment

○田上 峻、荒井 拓、渡邉 一希、古川 壮一、森永 康（日大院・生資科）
○shun tagami, ARAI Taku, WATANABE Kazuki, FURUKAWA Soichi, MORINAGA Yasushi (Nihon Univ.)

【背景・目的】

自然界で微生物は浮遊状態よりもむしろ固体表面に付着し、バイオフィルム（BF）を形成する場合が多い。近年、BF は医療現場における感染症の原因としてのみならず、食品製造現場における微生物汚染源としても注目されている。食品製造工程での BF 形成制御は重要な課題であり、形成されてしまった BF の洗浄・殺菌はさらに重要である。現在は薬剤を用いた洗浄が広く行われているが、薬剤を使用すると食品中への残存や洗浄作業者の安全が懸念される。

一方、加圧した二酸化炭素（高圧二酸化炭素、以下 HPC）は、高い殺菌効果を有することが知られており、数 MPa の HPC 処理により、ほとんどの細菌栄養細胞を殺菌可能なことが報告されている。

そこで本研究では、食品媒介病原細菌を含む食品関連微生物の形成した BF を HPC 処理によって殺菌することを目的として、基本的な検討を行ったので報告する。

【方法及び結果】

供試菌株として *Escherichia coli* K-12 BW25113、*Staphylococcus aureus* A7510、 *Lactobacillus plantarum* ML 11-11 などの食品関連微生物を用いた。微生物を所定の培地・培養温度で培養して、培地中に入れたステンレスビーズやポリスチレンビーズの表面に BF を形成させた。BF 形成後、ビーズを生理食塩水で洗浄し、HPC 処理用のステンレス管に入れ、処理溶媒として生理食塩水を添加した。その後、高圧二酸化炭素処理装置（AKICO 社製）を用いて二酸化炭素をバブル状にして吹き込み、3 MPa・37℃・30 min の条件で HPC 処理を行った。HPC 処理後、超音波処理によりビーズ上の BF を剥離し、適宜希釈を行った後に、生菌数を平板法で測定した。同時に浮遊細胞への HPC 処理も行い、比較として加熱殺菌処理の影響も検討した。

HPC 処理は供試した菌の BF に対して殺菌効果を示した。浮遊細胞への殺菌効果は、菌によりばらつきはあるが、BF への効果とほぼ同等かそれ以上の効果を示した。加熱処理は浮遊細胞への殺菌効果を示したが、BF への効果が低下する傾向がみられ、BF が形成されることにより熱への耐性が向上している可能性が考えられた。なお、ステンレスビーズ上の BF はポリスチレンビーズと比べ HPC 処理感受性が高い傾向を示したことから、金属上に形成された BF は HPC 処理で比較的殺菌しやすいのではないかと考えられた。

Carbon dioxide, Bioflm, Sterilization

講演番号：3A36p03
講演日時、会場：3 月 28 日 14:22～ A 校舎 36 会場

大腸菌のアミノ酸・核酸代謝関連遺伝子の変異がバイオフィルム形成におよぼす影響

Effect of mutations in amino acids and nucleic acids metabolism related genes on the biofilm formation of *Escherichia coli*

○太田 瑛美、古川 壮一、森永 康（日大院・生資科）
○Emi OTA, Soichi FURUKAWA, Yasushi MORINAGA (Nihon Univ.)

【目的】

自然界で微生物は固体表面に付着しバイオフィルム（BF）を形成する場合が多い。BF は微生物の生活様式の 1 つであると考えられる。当研究室では、大腸菌のアミノ酸・核酸代謝関連遺伝子欠損株の BF 形成能を解析した結果､BF 形成と Trp や UMP の細胞内濃度との関連性を示唆する結果を得ている。また、培地に添加した L-Trp が BF を抑制し崩壊させることも明らかにしてきた。本研究は、大腸菌の Trp・UMP 代謝と BF 形成の関連性について検討を行うことを目的としている。

【方法】

＜BF 形成量評価＞本研究では、*Escherichia coli* K-12 BW25113 やその Trp・UMP 代謝関連欠損株を用いた。これらの二代培養菌液（0.D=1.2）を 1/100 量接種した LB 培地または Trp 添加 LB 培地を Microtiter plate にて 30℃、24 h 静置培養することで BF を形成させた。形成された BF を洗浄、0.1% crystal violet で染色後、EtOH 抽出し、吸光度 590 nm を測定し BF 形成量とした。

＜インドール生成量測定＞同様の菌株の二代培養菌液(0.D=1.2)を 1/100 量接種した LB 培地を 30℃、24 h で静置培養した。培養後の菌液上清を回収し、酢酸エチルで抽出した。抽出液に Kovac’s reagent を加え 2min 静置し、吸光度 540nm を測定し、検量線によりインドール生成量を算出した。

【結果・考察】

Trp 合成欠損株は BF 高形成を示し、Trp 添加培地では形成が抑制された。一方、Trp 分解欠損株も BF 高形成を示したが、Trp 添加による抑制は認められなかった。これらより、Trp 分解産物のインドールが BF 形成に関与する可能性が考えられたため、BF 形成条件下でのインドール生成量を測定した。その結果、BF 高形成を示す Trp 合成欠損株も野生株と同様に約 150～200μM のインドールを生成する一方、Trp 分解欠損株は全くインドールを生成せず、BF 形成量とインドール生成量に相関関係はみられなかった。また、UMP 合成欠損株は BF 低形成、UMP 合成制御解除株は BF 高形成を示し、いずれも野生株なみのインドール生成を示した。さらに、合成制御解除株の BF 形成は Trp 添加培地で抑制された。これら結果から、細胞内 Trp の欠乏や UMP の過剰が BF 形成誘導の要因となっている可能性が高く、インドールが要因である可能性は低いことが示唆された。現在、細胞内のアミノ酸濃度やリアルタイム PCR を用いた遺伝子発現解析など行い、検討を続けている。

biofilm, *Escherichia coli*, tryptophan

講演番号：3A36p04
講演日時、会場：3 月 28 日 14:33～ A 校舎 36 会場

ショ糖脂肪酸エステルによるバイオフィルム形成阻害機構の解析

Inhibition mechanism of sucrose fatty acid ester on biofilm formation

○柳原 希枝子、古川 壮一、袴田 航、岩淵 範之、荻原 博和、森永 康（日大院・生資科）
○ Kieko YANAGIHARA, Soichi FURUKAWA, Wataru HAKAMATA, Noriyuki IWABUCHI, Hirokazu OGIHARA, Yasushi MORINAGA (Nihon Univ.)

【目的】

当研究室では感染症や食中毒の原因となるバイオフィルム（BF）の形成阻害剤を探索した結果、食品添加物であるショ糖脂肪酸エステル（SE）が BF 形成を阻害することを見出してきた。

本研究は、SE による BF の形成阻害機構の解明を目的とした。

【方法】

Escherichia coli K-12 BW 25113(野生株)， Δ*tolR*， Δ*rfaG*（SE 耐性変異株：SE 存在下で BF を形成可能な株、Keio collection より入手）の前培養菌液を 7～16 HLB（Hydrophilic Lipophilic Balance）の各種 10 ppm SE 添加 LB 培地に 1/100 量接種し、親水性及び疎水性の 96 穴 microtiter plate に分注した。その後、30℃、16 h 静置培養し、クリスタルバイオレット法により BF 形成量を測定した。

次に、フェニルセファロース CL-4B を担体とする HIC 法（Hydrophobic Interaction Chromatography 法）を用いて細胞表面の疎水性を測定した。

また、SE の付着を直接的に実証するために、Dansyl Chloride で蛍光標識した SE を調製し、LB 培地に 10～100 ppm 添加して培養し、BF 形成量及び細胞への付着状態を蛍光顕微鏡で観察した。

【結果・考察】

①野生株は、SE 非存在下では疎水性、親水性のいずれの plate でも同等の BF 形成を示した。一方、SE 存在下では、疎水性 plate における BF 形成は HLB 値が大きくなるほど強く阻害され、親水性 plate では SE の BF 形成阻害効果は認められなかった。これらの結果は、SE が固体表面と相互作用して特性を変化させること、および SE の HLB 値がその相互作用に影響することを示唆していた。

②細胞表層が変化したと考えられるコリシン取込み（Δ*tolR*）や LPS 合成（Δ*rfaG*）の欠損変異株は、表層構造の変化が SE との相互作用の変化をもたらし、SE 耐性を獲得したものと考えられた。

③HIC 法による解析で、SE 添加条件下に生育した野生株細胞の疎水性が有意に高いことが明らかとなった。この結果は、SE が細胞表面に付着することを示唆していた。

④蛍光標識 SE が細胞表面に付着することが蛍光顕微鏡観察により確認された。

これらの結果より、SE は固体表面及び細胞表層に付着して特性を改変し、両者の相互作用を変化させることで、BF 形成を阻害するのではないかと推察された。

biofilm, *Escherichia coli*, sucrose fatty acid ester

講演番号：3A36p05
講演日時、会場：3 月 28 日 14:44～ A 校舎 36 会場

改良型バイオアッセイ法を用いた *Rhodovulum sulfidophilum* の *N*-アシルホモセリンラクトン(AHL)生産の検証

Improved bioassay for detecting *N*-acylhomoserine lactone (AHL) of *Rhodovulum sulfidophilum*

○寺田 岳史[1]、沖見 卓哉[1]、菊池 洋[2]、梅影 創[1] ([1]豊橋技術科学大学、[2]早稲田大学 先進理工)
○ Takeshi TERADA[1], Takuya OKIMI[1], Yo KIKUCHI[2], So UMEKAGE[1] ([1]Toyohashi Tech., [2]Waseda Univ.)

クォーラムセンシングは、細胞密度に応じて迅速な環境適合を可能にする細菌の遺伝子制御システムで、オートインデューサーと呼ばれる化学シグナルによって誘導される。グラム陰性菌では、オートインデューサーとして *N*-アシルホモセリンラクトン（AHL）が使用される。

グラム陰性菌に属する海洋性光合成細菌 *Rhodovulum sulfidophilum* は、菌体外に自身の核酸を放出し、フロックと呼ばれる菌の凝集体構造を形成する(1)。我々は、過去の研究において、AHL を包接し、クォーラムセンシングを阻害する *α*-シクロデキストリンが、本菌のフロックの維持を阻害することを見出している。このことから、本菌の AHL 生産とフロック維持に相関関係があることが示唆されたが、*R. sulfidophilum* が AHL を生産する直接的な証拠は得られていない。そこで、本研究では、本菌による AHL 生産の検証を行った。

まず、*R. sulfidophilum* が AHL を生産するのかを確かめるために、C4 から C8 の側鎖を持つ短鎖 AHL を感知し紫色色素(ビオラセイン)を生産する *Chromobacterium violaceum* CV026 株(2)、あるいは C10 から C18 の側鎖を持つ長鎖 AHL を感知しビオラセインを生産する *C. violaceum* VIR07 株(3)を用いた一般的なバイオアッセイ法を行った。具体的には、*R. sulfidophilum* 培養上清を酢酸エチルによって抽出したものを濾紙に染み込ませ、CV026 株、あるいは VIR07 株の撒かれたプレートに載せて培養し、ビオラセインの生産を検証した。しかし、ビオラセインの生産を再現よく確認することはできなかったことから、*R. sulfidophilum* 培養上清の酢酸エチル抽出物にビオラセインの生産を阻害する物質が含まれていると考えバイオアッセイ法の改良を行った。具体的には、培養上清抽出物を逆相 TLC で展開し、C6 から C18 の既知の AHL の Rf 値を基に分画し、個別に再抽出したものを濾紙に染み込ませ、CV026 株、あるいは VIR07 株の撒かれたプレートに載せて培養し、ビオラセインの生産を検証した。この改良型バイオアッセイを行った結果、VIR07 株を用いた場合のみ *R. sulfidophilum* の培地条件（富栄養・貧栄養）および培養条件（嫌気明・好気暗）の違いに関係なく複数の TLC 抽出画分からビオラセインが検出された。以上から *R. sulfidophilum* は培地条件や培養条件に関係なくアシル鎖長が C10 から C18 の長鎖 AHL を複数種類生産することが明らかとなった。

References

1) Suzuki, H., Daimon, M., Awano, T., Umekage, S., Tanaka, T. and Kikuchi, Y., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **84**(2), 349-356 (2009)

2) K. H. McClean, *et al. Microbiology* **143**, 3703-3711 (1997)

3) Morohoshi, T., Kota, M., Fukamachi, K., Kato, N. and Ikeda, T., *FEMS Microbiol. Lett.* **279**(1), 124-30 (2008).

quorum sensing, *N*-acylhomoserine lactone (AHL), bioassay

講演番号：3A36p06
講演日時、会場：3 月 28 日 15:05～ A 校舎 36 会場

Lysinibacillus 属細菌由来新規アシル化ホモセリンラクトン分解遺伝子の機能解析
Characterization of the novel *N*-acylhomoserine lactone-degrading gene of the genus *Lysinibacillus*

○諸星 知広[1]、菊池 沙緒里[1]、染谷 信孝[2]、池田 宰[1]([1]宇都宮大学、[2]農研機構)
○ Tomohiro MOROHOSHI[1], Saori KIKUCHI[1], Nobutaka SOMEYA[2], Tsukasa IKEDA[1] ([1]Utsunomiya Univ., [2]NARO)

【目的】グラム陰性病原性細菌の多くは、シグナル物質であるアシル化ホモセリンラクトン（AHL）を介した細胞間情報伝達機構 Quorum Sensing（QS）により病原性遺伝子発現を制御している。AHL を生産できない変異株は、病原性が極度に低下することから、QS 阻害技術は新しい病原性抑制技術として注目されている。ここ十数年で数多くの AHL 分解細菌の存在が明らかになり、AHL 分解酵素により病原菌の AHL を分解することで、病原性を抑制可能であることが明らかとなった。*Lysinibacillus* 属細菌は、殺虫性タンパク質を生産する種も存在することから、微生物農薬としての応用が期待されている。本研究では、*Lysinibacillus* 属細菌から新規 AHL 分解遺伝子をクローニングするとともに、植物病原菌の防除効果について解析を行うことを目的とした。
【実験方法及び結果】データベース上で公開されている *Lysinibacillus* 属細菌の全ゲノム配列から、AHL 分解遺伝子ホモログを検索したところ、AHL 分解細菌 *Solibacillus silvestris* 由来 AHL 分解遺伝子（*ahlS*）と相同性を示す遺伝子が存在することが明らかになり、これらの遺伝子を *aiiL* と命名した。NBRC より入手した *L. fusiformis* NBRC 15717 株及び *L. sphaericus* NBRC 15095 株、ジャガイモ根から単離した *L. fusiformis* StRB057 株の合計 3 株を用い、PCR により *aiiL* を含む領域をクローニングした。*aiiL* 発現プラスミドを大腸菌に導入して AHL 分解活性を調べたところ、3 菌株からクローニングした *aiiL* を導入した大腸菌すべてが AHL 分解活性を有することが明らかになった。次に、アシル鎖長の異なる AHL に対する AiiL の分解活性を調べたところ、AiiL はアシル鎖長が 10 の C10-HSL よりもアシル鎖長が 6 の C6-HSL に対して、やや高い分解活性を有することが明らかとなった。さらに、AiiL の AHL 分解機構を調べるために、AiiL により分解された AHL の構造解析を行った結果、AiiL は AHL のラクトン環を加水分解する AHL ラクトナーゼとして機能することが明らかとなった。現在、ジャガイモ軟腐病菌に *aiiL* を導入し、病原性抑制効果について解析を行っている。

quorum sensing, acylhomoserine lactone, *Lysinibacillus*

講演番号：3A36p07
講演日時、会場：3 月 28 日 15:16～ A 校舎 36 会場

非リボソームペプチド(NRP)によるロドコッカス属細菌の自己凝集制御の可能性

A nonribosomal peptide may regulate bacterial aggregation in *Rhodococcus* sp. SD-74

○茂木 亮介[1]、長田 啓司[2]、稲葉 知大[2]、中島 敏明[3]、内山 裕夫[3]、豊福 雅典[3]、野村 暢彦[3]([1]筑波大生物資源、[2]筑波大院生命環境、[3]筑波大生命環境系)
○ Ryosuke MOGI[1], Keiji NAGATA[2], Tomohiro INABA[2], Toshiaki NAKAJIMA[3], Hiroo UCHIYAMA[3], Masanori TOYOFUKU[3], Nobuhiko NOMURA[3] ([1]Colledge of Agrobiological resource sciences, University of Tsukuba, [2]Graduate School of Life and Environment Sciences, University of Tsukuba, [3]Faculty of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba)

多くの微生物は凝集体を形成する。凝集体は微生物細胞の自己凝集による 3 次元構造を持ち、分散状態とは異なる性質を示す。微生物の産業利用において、凝集体は固液分離の容易化や担体としての利用が期待される。したがって、凝集体の制御は重要であるが、凝集体の形成メカニズムやその制御に関する報告は多くない。

Rhodococcus sp. SD-74 は当研究室で炭化水素資化細菌として土壌から単離された、多機能な糖脂質を生産するグラム陽性細菌である。この SD-74 株は、液体培地中で粒形が最大で約 10 mm にも及ぶ大きく強固な凝集体を形成する。この顕著な凝集性は物質生産に有用であり、凝集体制御により分離精製プロセスの高効率化が可能となる。そこで、SD-74 株をモデルとして凝集体制御についての解析を行った。SD-74 株の凝集体形成を観察すると、まず微小な凝集体を形成された後、それが集合・発達して大きな凝集体を形成することが分かった。凝集体形成後も更に培養を続けると、凝集体の崩壊が観察された。この一連の観察から SD-74 株の凝集体形成は、細胞が細胞密度に依存して凝集しているわけではなく、秩序だった形成過程が存在し、それが何らかの因子によって制御されている可能性が示唆された。

また、凝集体崩壊後の培養上清を培地に添加して SD-74 株を培養すると、凝集体形成の阻害が観察された。加熱処理をした培養上清においても凝集体形成が阻害されたため、SD-74 株の放出する熱安定性の物質が、凝集体の形成阻害または崩壊に関与していることが示唆された。このような SD-74 株の凝集体制御に関与する遺伝子を特定するために、トランスポゾンを用いたランダムな遺伝子破壊と、得られた破壊株ライブラリーより凝集形態の異なる株のスクリーニングを行った。その結果、長時間培養しても凝集体が崩壊しない強凝集株を取得した。この強凝集株の培養上清は、SD-74 株の野生株の凝集体形成を阻害しなかったことから、強凝集株は凝集体の形成阻害、または崩壊に関与する遺伝子が破壊されていることが示唆された。シークエンス解析の結果、強凝集株はトランスポゾンにより nonribosomal peptide synthetase (NRPS)と推定される遺伝子が破壊されていることが分かった。NRPS が合成するペプチド(NRP)は多くの放線菌で生産され、抗生物質や抗腫瘍剤として利用されるものもある。この SD-74 株の NRP は熱に安定な凝集体形成阻害因子、または凝集体崩壊因子である可能性が示唆された。NRPS の凝集体制御への関与を示唆する報告は本研究が初めてであり、本研究は微生物の産業利用における凝集体制御の一助となることが期待される。

bacterial aggregation, nonribosomal peptide, rhodococcus

講演番号：3A36p08
講演日時、会場：3 月 28 日 15:27～ A 校舎 36 会場

多様な AHL に応答する *Chromobacterium violaceum* のクオラムセンシングメカニズムの解析

Analysis of quorum sensing mechanism in *Chromobacterium violaceum*

○島村 裕子[1]、豊福 雅典[1]、諸星 知広[2]、池田 宰[2]、野村 暢彦[1]([1]筑波大院生命環境、[2]宇都宮大院工)
○Hiroko SHIMAMURA[1], Masanori TOYOFUKU[1], Tomohiro MOROHOSHI[2], Tsukasa IKEDA[2], Nobuhiko NOMURA[1] ([1]University of Tsukuba, [2]Utsunomiya University)

微生物は集団中において、シグナル物質を細胞外に生産し、周囲の微生物が特異的なレセプターを介してシグナル物質を受け取ることにより、コミュニケーションをとることが明らかとなっている。微生物間コミュニケーションの一種であるクオラムセンシングは、微生物がシグナル物質を生産、感知、応答するシステムであり、菌体密度の変化に応じて遺伝子発現、そして微生物の集団行動を変化させる。クオラムセンシングにより様々な遺伝子が制御され、微生物の毒素生産等に関連していると考えられている。最もよく知られているグラム陰性細菌のシグナル物質として、アシル化ホモセリンラクトン(AHL)がある。微生物間コミュニケーションにおいて、一般的に一つのシグナル物質に対し、一つのレセプターが対応する。一方、グラム陰性細菌である *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472 株は、解明されているレセプターが CviR 一種類であるのに対し、側鎖の長さが異なる様々な AHL に応答する。しかしながら、どのような機構で多様な AHL に応答するのか分かっていない。
本研究では、*C. violaceum* ATCC 12472 株が様々な AHL に応答する機構を解析するために、ATCC 12472 株の AHL レポーター株(VIR07 株)の遺伝子をランダムに破壊したところ、AHL の応答性に変化が見られる株が得られた。そこで、推定レセプター遺伝子を破壊した欠損株を作製し、AHL 応答性を検証したところ、欠損株において、AHL 応答性の低下が観察された。さらに、*cviR* 破壊株を作製し、推定レセプター遺伝子と *cviR* の関係性を解析した。これらの結果より、*C. violaceum* ATCC 12472 株において、*cviR* とは異なるレセプター遺伝子が AHL の感知に関与することが示された。一つの細菌が一種類だけでなく様々な AHL に応答するメカニズムの解明は、既知のクオラムセンシング機構とは異なる知見をもたらすことが期待される。

quorum sensing, acyl-homoserine lactone, cell-cell communication

講演番号：3A36p09
講演日時、会場：3 月 28 日 15:38～ A 校舎 36 会場

凝集体形成における細胞間コミュニケーションの新たな役割

An unexpected role of cell-cell communication in bacterial aggregation

○森永 花菜、豊福 雅典、野村 暢彦 (筑波大院生命環境)
○Kana MORINAGA, Masanori TOYOFUKU, Nobuhiko NOMURA (Tsukuba Univ.)

環境中の多くの細菌は、細胞間でコミュニケーションを行なうことで集団の挙動を変化させている。この挙動は、細胞外に放出される低分子化合物をシグナル物質として利用し、遺伝子の制御を行なうことでコントロールされている。*N*-Acyl-homoserine-lactone(AHL)は、グラム陰性細菌において、主要な細胞間コミュニケーションのシグナル物質である。AHL はアシル基とラクトン環から成るが、アシル基の炭素鎖は C4-C18 が報告されており、細菌種によって使用する AHL が異なる。長鎖のアシル基を持つ AHL は疎水性であり、短鎖 AHL よりも拡散性が低いことが予想される。このような長鎖の AHL がどのように伝達され、どのような遺伝子を制御しているのかに関する報告は少なく、未解明な部分が多い。当研究室の先行研究において、排水処理に用いられる活性汚泥から AHL の生産菌の単離を試みたところ、興味深いことに長鎖 AHL を生産する *Paracoccus* 属細菌が多数同定された。そこで、本研究では、*Paracoccus denitrificans* をモデル細菌とし、長鎖 AHL の細胞間コミュニケーションに関する知見を得ることを目的とした。

P. denitrificans は炭素鎖 C16 の AHL を生産するが、その AHL 合成遺伝子である *luxI* を欠損させた株を液体培養すると、野生株とは異なり凝集体を形成することが観察させた。また、凝集体の一つであるバイオフィルム形成においては、野生株が底面にのみバイオフィルムを形成するのに対し、*luxI* 欠損株では、底面のみならず、気液界面にも膜上のバイオフィルムを形成することがわかった。これまでの報告においては、多くの細菌で AHL 濃度の増加に伴って凝集体形成が誘導されることが報告されていた。一方、本研究では、活性汚泥に多く存在する *Paracoccus* 属細菌において、細胞間コミュニケーションが凝集体形成の抑制に関与しているという興味深い結果が得られた。

活性汚泥においては凝集形態の維持は、槽内からの菌体の流出を防ぐことや、排水処理活性の維持において重要な意味を持つ。活性汚泥から AHL の生産菌の単離を試みたところ、*Paracoccus* 属細菌が多数同定された。従って、細胞間コミュニケーションを制御することで、活性汚泥のフロック形成の新たなコントロール法への応用が期待される。今後は、*P. denitrificans* の凝集体形成メカニズムの詳細な解明を行なう。

cell-cell communication, aggregation, AHL

講演番号：3A36p10
講演日時、会場：3 月 28 日 15:49～ A 校舎 36 会場

非運動性グラム陰性細菌によるバイオフィルム形成機構の解析

Biofilm formation by a non-motile Gram-negative bacterium

○吉田 圭太朗、豊福 雅典、野村 暢彦（筑波大院生命環境）
○Keitaro YOSHIDA, Masanori TOYOFUKU, Nobuhiko NOMURA (Univ. Tsukuba)

【背景と目的】バイオフィルム(BF)は固体表面に付着した微生物の集合体であり、細菌は環境中で主に BF を形成して生息する。運動性を持つグラム陰性細菌による BF の形成機構は、浮遊状態の菌体が固体表面へ付着し、増殖して立体構造を持つ BF が形成され、やがて一部の菌体が BF から脱離する、というサイクルが知られている。この過程で菌体の運動性は、固体表面への菌体の接触頻度や BF からの菌体の脱離に重要な役割を果たす。一方、非運動性のグラム陰性細菌も環境中に存在し、BF を形成することが報告されているが、BF の形成機構については解析が進んでいない。本研究では非運動性のグラム陰性細菌である *Paracoccus denitrificans* を用いて BF の形成機構を解析した。
【結果と考察】*P. denitrificans* が BF を形成するかどうかを microtiter plate assay により調べた結果、microtiter plate 上に付着型の BF を形成した。また、*P. denitrificans* は鞭毛遺伝子を有するため、motility assay により運動性を確認した結果、運動性は観察されなかった。次に、BF 形成に関与する因子を解析するため、*P. denitrificans* のトランスポゾン(Tn)ミュータントライブラリーを構築し、BF 形成能についてスクリーニングを行った。その結果、1986 株の Tn ミュータント中、野生株と比べ BF 形成量が減少する株を 5 株、増加する株を 1 株得た。さらにこれらの株について菌体表面の疎水性を評価した結果、野生株より BF 形成量が減少した株で疎水性が低下し、BF 形成量が増加した株で疎水性が増加した。菌体表面の性質は菌体の付着に重要であり、細胞外多糖やタンパク質の生産等により変化することから、*P. denitirificans* の BF 形成に菌体表面の疎水性が影響している可能性が示唆された。本発表では Tn 挿入部位の解析結果について考察し、発表を行う。

non-motile Gram-negative bacteria, biofilm, *Paracoccus denitrificans*

講演番号：3A36p11
講演日時、会場：3 月 28 日 16:10～ A 校舎 36 会場

緑膿菌環境単離株における QS システムの多様性

Variety of QS system in environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*

○遠矢 正城[1]、豊福 雅典[1]、木暮 一啓[2]、野村 暢彦[1] ([1]筑波大院・生命環境、[2]東京大・大気海洋研)
○Masashiro Toya[1], Masanori Toyofuku[1], Kazuhiro Kogure[2], Nobuhiko Nomura[1] ([1]Tsukuba Univ., [2]Tokyo Univ.)

微生物は様々な物質を介してお互いにコミュニケーションを行うことがわかってきている。Quorum sensing(QS)はそのような微生物間コミュニケーションの一つであり、細菌特有のシグナル物質を用いて一定以上の菌体密度に到達したことを感知し、特定の遺伝子群の制御を行う機構である。緑膿菌はシグナル物質を介して QS を行い、毒素生産、運動性、バイオフィルム形成などの様々な機能が調節されている。また緑膿菌は日和見感染症を引き起こす病原菌として知られる一方で土壌や淡水域・海洋といった多様な自然環境中に生息する環境常在菌としての側面を持っている。現在までに緑膿菌感染症の制御のため、病原性やバイオフィルム形成と密接に関わる QS を標的として、臨床由来の標準株において盛んに研究がなされてきた。しかし緑膿菌の環境単離株における QS の知見はほとんどなく、自然環境中において QS がどのような意義をもっているのかは未解明である。

本研究では河川・沿岸領域・外洋領域より単離された緑膿菌株について QS シグナルの生産量と、QS 制御下にある毒性色素ピオシアニンの生産量に着目し、比較を行った。その結果、標準株 PAO1 や沿岸領域で単離された株に比べて、河川や外洋領域で単離された株は QS シグナル生産量が少なく、ピオシアニンをほとんど生産しないことがわかった。またそれぞれの株によってコロニー形態の違いも観察された。以上から自然環境中の緑膿菌はその生息環境に応じて、自らの QS システムを改良し、巧みに適応していることが示唆された。

cell-cell communication, Quorum sensing, *Pseudomonas aeruginosa*

講演番号：3A36p12
講演日時、会場：3 月 28 日 16:21～ A 校舎 36 会場

Holin-Endolysin システムを介した緑膿菌のメンブランベシクル形成
Membrane Vesicle Formation via Holin-Endolysin system in *Pseudomonas aeruginosa*

○黒沢 正治、豊福 雅典、野村 暢彦（筑波大学・生命環境）
○Masaharu KUROSAWA, Masanori TOYOFUKU, Nobuhiko NOMURA (Tsukuba univ.)

近年、多くの微生物がメンブランベシクル(MV)と呼ばれる細胞膜から成る nm サイズの小胞を生産していることが報告されている。MV はタンパク質や核酸、細胞間シグナル物質など様々な微生物由来の物質を内包し、細胞外へ放出された後、周囲の細胞に付着・融合すると考えられている。このような特徴から、毒素やシグナル物質の輸送、遺伝子の水平伝播など微生物の生態において MV が重要な機能を果たしていることが予想されているが、MV がいつ、どのように形成されるのか、その詳細なメカニズムは明らかとなっていない。MV 研究のモデル細菌である緑膿菌は、DNA ダメージに応答し、SOS レスポンスと呼ばれる DNA 修復機構を介して MV を形成することが我々の先行研究において明らかとなった。さらに、SOS レスポンスによって制御されている Pyocin 生産が MV 形成に関与していることも示された。Pyocin とは緑膿菌が生産するバクテリオシンで、同種や近縁種に対してのみ抗菌活性を持つバクテリオファージ尾部様の構造体である。本研究では Pyocin 生産の MV 形成への関与の詳細解明を目的とし実験を行った。その結果、興味深いことに Pyocin 本体の構造ではなく、Pyocin の放出(宿主の溶菌)に関わるとされる PA0614(推定 Holin)と PA0629(推定 Endolysin)が MV 形成に重要であることが明らかとなった。前大会ではこの PA0614 と PA0629 を介した推測の MV 形成モデルの考案までを報告した。本発表では PA0629 の Endolysin としての溶菌活性が MV 形成において重要であることを示す。PA0629 の活性部位に変異を与えたところ、宿主の溶菌に加えて MV 形成も観察されなかった。また、PA0629 の活性による溶菌及び MV 形成は PA0614 非存在下では確認されなかったことから PA0629 の影響は PA0614 依存的であることも明らかとなった。Endolysin が Holin によって内膜に形成された孔からペリプラズムへと移行し、ペプチドグリカンを分解することで外膜が剥離し MV が形成されると考えられる。SOS レスポンス及び Holin-Endolysin システムは緑膿菌のみならず多くの微生物に保存された機構であり、本研究は新奇かつ微生物に普遍的な MV 形成メカニズムの存在を示唆した。

Membrane vesicle, SOS response, Holin-Endolysin system

講演番号：3A36p13
講演日時、会場：3 月 28 日 16:32～ A 校舎 36 会場

Paenibacillus 属細菌の集団内における芽胞形成
Sporulation in microbial community of *Paenibacillus* species
○横山 佳奈[1]、尾花 望[1]、久保田 浩美[2]、横畑 綾治[2]、湯井 幸治[2]、野村 暢彦[1] ([1]筑波大院生命環境、[2]花王安全性科学研究所)
○Kana YOKOYAMA[1], Nozomu OBANA[1], Hiromi KUBOTA[2], Ryoji YOKOHATA[2], Koji YUI[2], Nobuhiko NOMURA[1] ([1]Tsukuba Univ., [2]Kao Corp.)

【背景・目的】*Bacillus, Clostridium* 属細菌を含むグラム陽性の芽胞形成細菌は、古くから食品や原料の変敗の原因として知られている。さらに *Paenibacillus* 属細菌は、他の芽胞形成細菌と比較して芽胞の耐性が高いことや低温でも増殖できるという点から、近年その制御が求められてきている。多くの細菌は実環境中において集合体であるバイオフィルムを形成しており、浮遊菌と比べ高い付着性や耐性を保持している。そのためバイオフィルムと食品や原料の変敗には深い関連性があると示唆されている。しかし本菌における芽胞やバイオフィルムに関する知見は少ない。そこで本研究では、*Paenibacillus* 属細菌の芽胞やバイオフィルム形成の詳細解析を行うことで、本菌による変敗の防止につながる知見を得ることを目的とした。前年度大会では多くの *Paenibacillus* 属細菌がバイオフィルム形成能を有することを報告したため、今回はその内部で形成される芽胞の性質に着目した。
【方法・結果】初めに、腐敗食品や原料などから分離されてきた *Paenibacillus* 属の 6 種 13 株を用い、96 穴プレートにてそれぞれバイオフィルムを形成させ、クリスタルバイオレット染色により定量した。その結果、多くの株においてバイオフィルム形成が観察されたが、培地によってバイオフィルム形成能は大きく異なることが分かった。次に、芽胞形成培地にて振とう培養及び静置培養により芽胞形成を継時的に観察したところ、芽胞形成の時期は異なるが、静置培養すなわちバイオフィルム形成条件下においても振とう培養同様に多くの芽胞を形成した。また、高いバイオフィルム形成能を有する *P. glucanolyticus* と *P. polymyxa* において芽胞の形成能とその局在を調べるため、静置培養にて形成したバイオフィルムとそれ以外の浮遊菌液部分を分離した後、それぞれの芽胞形成効率を検証した。その結果、いずれの株においてもバイオフィルム中により多くの芽胞を形成した。最後に、*P. polymyxa* ATCC 39564 において振とう培養液中に形成される芽胞と、バイオフィルム中に形成される芽胞を比較したところ、バイオフィルム中ではより長い芽胞が形成されており、その形態が異なることが示唆された。本結果から、菌体の生育環境の違いによって形成する芽胞の性質に変化が起こる可能性が示された。*Paenibacillus* 属細菌を含む多くの細菌は実環境中においてバイオフィルムを形成していることから、菌の集団中に形成される芽胞の性質を検証することが重要であると考えられる。

Biofilm, Spore, *Paenibacillus*

講演番号：3A36p14
講演日時、会場：3 月 28 日 16:43～ A 校舎 36 会場

蛍光菌 Pf0-1 株におけるプリン核酸生合成とバイオフィルム形成の関係（２）
Relationship between purine nucleotide biosynthesis and biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1 (2)
○吉岡 資郎（分子研）
○Shiro YOSHIOKA (Institute for Molecular Science)

蛍光菌(*Pseudomonas fluorescens*) Pf0-1 株のバイオフィルム形成において、ホスホリボシルピロリン酸(PRPP)からイノシン一リン酸(IMP)に至る *de novo* プリン核酸生合成経路に含まれる遺伝子（purB を除く purC、purD、purE、purF、purH、purK、purL および purM）の欠損により、バイオフィルム形成量が天然型(WT)の 1/2～1/3 程度まで減少する事を見出し、昨年度の大会で報告した。新たに、これらのミュータントに関する２つの知見を得たので、報告する。

①蛍光菌 Pf0-1 株のバイオフィルム形成量は、K10T-1 培地を用いた静置培養において６時間ほどで最大に達する。この時のバイオフィルムを綿棒で掻き取り、生菌数を測定したところ、WT とミュータントで大きな差が見られなかった。このことから、ミュータントのバイオフィルム形成量が減少した原因は、菌が小さくなったためではないかと推定された。そこで、WT と３種類のミュータント（purC、purH、および purK）について、バイオフィルムの電子顕微鏡写真を撮影した。その結果、WT では菌の長さは 1.42～2.81μm の範囲であったが、ミュータントでは 0.9～2.00μm であり、明らかに菌が小さくなっている事が分かった。ミュータントにおけるバイオフィルム中の ATP 総量が WT の 1/9～1/20 程度であった事を考慮すると、細胞内の ATP 濃度の減少に連動して菌の大きさが小さくなったものと考えられる。

②プリン核酸生合成経路の欠損により、細胞内の ATP および GTP 濃度が低下すると考えられるため、ミュータントはプリン要求性になると考えられる。そこで、上記の３種類のミュータントについて、アデニンやグアニン等の核酸塩基を添加してバイオフィルム形成を行ったところ、アデニンとヒポキサンチンのみでバイオフィルム形成が WT と同等までに回復した。また、尿酸やカフェイン誘導体は、バイオフィルム形成量に大きな影響を与えなかった。プリン核酸の代謝を考えると、これらの結果は妥当なものと言える。しかし、通常 DNA や RNA 中に含まれないキサンチン、イソグアニンまたは８−ヒドロキシグアニンの添加によりバイオフィルム形成量が若干回復するケースが観察された。この事は、プリン核酸の欠乏により、本来の核酸塩基ではないものが DNA または RNA 中に取り込まれ、菌の生育を促したためであると推測される。DNA 修復酵素の働きによってゲノム中への変異導入は避けられると考えられるが、非常に興味深い結果と言える。

biofilm, purine nucleotide biosynthesis

講演番号：3A36p15
講演日時、会場：3 月 28 日 16:54～ A 校舎 36 会場

シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC6803 の塩ストレス誘導性バイオフィルム形成に必要なヒスチジンキナーゼの同定とシグナル伝達機構
Identification of histidine kinases and signal transduction mechanisms required to salt stress-induced biofilm formation in *Synechocystis* sp. PCC6803

○永山 達也[1]、久米井 智裕[1]、牧野 恒平[1]、井田 智章[2]、赤池 孝章[2]、鈴木 石根[3]、七谷 圭[1]、魚住 信之[1] ([1]東北大・院工・バイオ工学、[2]東北大・院医・環境保健医学、[3]筑波大・生命環境)
○Tatsua Nagayama[1], Tomohiro Kumei[1], Kohei Makino[1], Tomoaki Ida[2], Takaaki Akaike[2], Iwane Suzuki[3], Kei Nanatani[1], Nobuyuki Uozumi[1] ([1]Grad. Sch. of Eng., Tohoku Univ., [2]Grad. Sch. of Med., Tohoku Univ., [3]Grad. Sch. of Life and Env., Tukuba Univ.)

微生物のバイオフィルムは主に細胞外多糖からなり、環境ストレスから菌体を保護する役割を担う。バイオフィルム形成の過程において、細菌は多糖合成、運動性、および細菌細胞間での情報伝達などの変化を伴う。これらの変化を誘導するストレス感知および応答の機構は興味がもたれており、ストレス感知には二成分制御系を構成するヒスチジンキナーゼが関与していることが明らかになっている。これまで本研究グループでは、ラン藻 *Synechocystis* sp. PCC6803 は塩ストレスに応答してバイオフィルムを形成することを報告した。本研究では、バイオフィルム形成を誘導する塩ストレス感知機構を明らかにするために、塩ストレスを感知しバイオフィルム形成を誘導するヒスチジンキナーゼの探索を行った。*Synechocystis* が有する 44 種類のヒスチジンキナーゼ遺伝子(*hik1*～*hik44*)の各欠損株における NaCl 添加時のバイオフィルム形成量を調べた。野生型株および欠損株を 500 mM NaCl を添加した培地および添加していない培地で培養し、クリスタルバイオレッド染色法によってバイオフィルムの形成量を測定した。NaCl の添加によるバイオフィルム形成量の増加率に着目した結果、野生型株のバイオフィルム形成量は NaCl の添加により 5.5 倍増加した。一方、44 種類のヒスチジンキナーゼ欠損株の中には、増加率が 2 倍より小さい株が複数存在した。増加率が 2 倍を下回った株において欠損しているヒスチジンキナーゼについて、既知の機能やドメイン構造およびゲノム情報からその周辺にある関連遺伝子を調べた。その結果、c-di-GMP 合成または分解ドメインをもつ、またはそのようなドメインをもつレスポンスレギュレーターが近傍に存在しているヒスチジンキナーゼがいくつか存在した。c-di-GMP は他の細菌においてバイオフィルム形成を誘導することがよく知られているセカンドメッセンジャーである。私たちも *Synechocystis* のバイオフィルムの形成にも c-di-GMP の関与を見いだしており，その中の一部の二成分系分子に関して報告している。今回それらを含めて，細胞内 c-di-GMP 濃度の制御への関与が予測されるヒスチジンキナーゼとペアを組むレスポンスレギュレーターを探索した。本研究では Bacterial Adenylate Cyclase Two-Hybrid System によって、バイオフィルム形成を司ると推定されるヒスチジンキナーゼと相互作用するレスポンスレギュレーターを探索して、ペアの同定を行った。さらに、c-di-GMP 関連のドメインをもつヒスチジンキナーゼとレスポンスレギュレーターの一部のタンパク質を精製した後に c-di-GMP 合成活性を測定して、これらのタンパク質が c-di-GMP 合成活性を持つことを明らかにした。これらの解析により、*Synechocystis* における塩ストレス誘導性のバイオフィルム形成に c-di-GMP がシグナル因子の役割を担っていることが示された。

cyanobacteria, biofilm, salt stress

講演番号：3A36p16
講演日時、会場：3 月 28 日 17:15～ A 校舎 36 会場

機能未知二成分制御系 YehU/YehT によるバイオフィルム形成抑制機構の解明

Negative regulation of biofilm formation by the uncharacterized two-component system YehU/YehT

○石塚 俊行[1,2]、石浜 明[3,4]、小笠原 寛[1,2] ([1]信州大学・繊維・応用生物、[2]信州大・ヒト環境・遺伝子(信州大学ヒト環境科学研究支援センター遺伝子実験部門)、[3]法政大学・生命科学・生物機能、[4]法政大・マイクロナノテク研)

○Toshiyuki ISHIZUKA[1,2], Akira ISHIHAMA[3,4], Hiroshi OGASAWARA[1,2] ([1]Div. Appl. Biol., Textile Sci. Tech. Shinshu Univ., [2]Res.Center for Human Environ. Sci. Shinshu Univ., [3]Dept of Frontier Biosci., Hosei Univ., [4]Micro-Nano Tech. Res Center, Hosei Univ.)

【目的】

自然環境中の多くの細菌種は、固体表面で細胞が集合しバイオフィルムを形成する。細菌のバイオフィルム形成に関わる遺伝子発現は環境変化に応じて厳密に制御されており、その発現制御には多くの転写因子が関与している。大腸菌のバイオフィルム形成に関わる Curli 線毛やセルロース合成に関わる遺伝子発現制御には転写因子 CsgD が中心的な役割を果たしており、その発現量は様々な環境変化に応じて変化することが知られている。我々はこれまでの研究で、*csgD* プロモーターは 10 種以上の転写因子が直接制御に関与することを同定し、多因子プロモーターであると報告して来た。そこで我々は *csgD* 発現制御の全貌を明らかとするために大腸菌の全転写因子の約 75%にあたる 202 種類の精製転写因子を用いて PS-TF (Promoter specific transcription factor)screening を実施した。その結果、*csgD* プロモーター特異的に結合する新規転写因子が新たに複数種存在することが明らかとなった。本研究ではそれらのうち、二成分制御系のレスポンスレギュレーターの一つで機能未知転写因子である YehT による *csgD* 発現制御機構の全容解明を試みた。

【方法と結果】

大腸菌野生株の Curli 発現が誘導される条件下において YehT 過剰発現系を用いて *csgD* 発現への影響を調べた結果、転写レベルでその発現は抑制され、更に Curli 線毛形成の著しい抑制も観察された。さらに YehT 過剰発現株におけるバイオフィルム形成についても同様に著しく抑制されることが明らかとなった。また、ゲルシフトアッセイにより、YehT は *csgD* プロモーターの上流に位置し、逆方向に転写される Curli 繊毛構成成分遺伝子オペロン *csgBAC* のプロモーター領域にも同様に結合することが明らかにされた。*csgB* に対する YehT の遺伝子発現抑制効果は、*csgD* よりも顕著であることが判明した。これらの結果より YehT は *csgD* と *csgB* 発現を共に抑制することで、バイオフィルム形成抑制に関与していることが示唆された。

Biofilm, Two-component system, Escherichia coli

講演番号：3A36p18
講演日時、会場：3 月 28 日 17:37～ A 校舎 36 会場

枯草菌の定常菌の細胞死における SigI シグマ因子の役割

The role of Sigma factor, SigI, in cell death at stationary phase in *Bacillus subtilis*

○朝井 計[1]、清水 葉子[1]、吉川 博文[2] ([1]埼玉大院理工、[2]東京農大応生科)
○Kei ASAI[1], Yohko SHIMIZU[1], Hirofumi YOSHIKAWA[2] ([1]Saitama Univ., [2]Tokyo Univ. of Agric.)

【目的】
枯草菌の代替シグマ因子の一つ SigI は熱ストレス応答シグマとして見出された。SigI のレギュロンとしてこれまで、MreBH（細胞骨格アクチン蛋白質の一つ)、BcrC（細胞壁合成阻害剤バシトラシン耐性)、LytE（細胞壁溶解酵素の 1 種、DL-endopeptidase）をコードする遺伝子が知られている。また我々の解析から、SigI が LytE とは別の DL-endopeptidase である CwlO をコードする遺伝子の転写にも関わっていることが判明している。この LytE と CwlO の同時欠失は、細胞の伸長阻害をまねき合成致死になる。また *lytE* と *cwlO* 遺伝子の転写は、低 G+C グラム陽性細菌に広く保存されている増殖に必須な 2 成分制御系 WalK/WalR で正に制御されている。一方、LB 培地液体培養で、定常期の後期に入ると *sigI* 破壊株では野生株に比べて、著しい細胞死が観察されたことから、熱ショック応答以外に定常期の細胞の恒常性維持に SigI が関っていると考え、本大会でこれまでに発表した。このような背景から、SigI は WalK/WalR とともに、細胞表層の変化を感知し、表層の構造に関わる因子の発現を制御し、細胞の恒常性維持に関わる重要な転写因子と考え、SigI の定常期における役割について解析を進めている。
【方法と結果】
cwlO 遺伝子のプロモーター配列は、既知のレギュロンである *mreBH* 等のプロモーター配列と異なっていたため、*cwlO* プロモーターに部位特異的変異を導入し、SigI の認識に関わる塩基の同定を試みた。その結果、既知のプロモーター配列に近づけた場合に、転写活性が上昇し、SigI の認識に強く関わる塩基配列を割り出した。また、*sigI* 遺伝子の発現を人為的に変化させた時のマイクロアレイ解析等による転写解析から、SigI で転写を正に制御される遺伝子として細胞壁や細胞分裂に関わる遺伝子や、DNA 合成・DNA 修復に関わる遺伝子をいくつか同定し、転写開始点を決定した。それらのプロモーター配列は SigI による転写誘導の弱い *cwlO* 型のプロモーターであった。
WalK/WalR は対数増殖期に活発に働き、定常期になると発現が弱まっていく。これに対し、*sigI* 遺伝子の発現は対数増殖期に弱く、定常期になり誘発される。*sigI* の転写活性は WalK/WalR の活性化によって抑制されことが報告されている。時期特異的な個々の細胞における *sigI* の発現を、SigI プロモーター活性を GFP によりモニターすることで観察した。顕微鏡観察により定常期の SigI の発現と細胞死の関係を解析中である。

Bacillus subtilis, sigma factor, cell death

講演番号：3A36p19
講演日時、会場：3 月 28 日 17:48～ A 校舎 36 会場

大腸菌 SymE-SymR toxin-antitoxin system の SymE toxin は DNA ジャイレース阻害タンパク質である

SymE, a hexameric *E. coli* toxin, is an endogenous DNA gyrase inhibitor

○山口 良弘[1,2]、井上 正順[3] ([1]阪市大複合先端、[2]阪市大院理、[3]ニュージャージー医科歯科大)
○Yoshihiro Yamaguchi[1,2], Masayori Inouye[3] ([1]OCARINA, [2]Osaka City Univ., [3]UMDNJ)

【目的】 機能的細胞死 (アポトーシス) は真核生物において細胞の分化に必須の機能である。近年、大腸菌のような原核生物もアポトーシスを備えており、ストレス環境下での生存に重要であることが示唆されている。細菌においてアポトーシスを引き起こす toxin-antitoxin (TA) system は、ストレス条件下で誘導され細胞を休眠状態にすると考えられている。しかし、その作用機構及び生理的役割は未だ不明である。SymE は SOS 応答で誘導される TA system の toxin のひとつで、その発現はアンチセンス RNA である SymR によって調節されている。今回私は、SymE toxin の細胞内標的が DNA gyrase の構成成分 GyrA であることを明らかにしたので報告する。

【方法および結果】 SymE の標的を同定するために、SymE 発現後の DNA、RNA およびタンパク質合成を in vivo で解析した。その結果、SymE 発現の 20 分後に DNA および RNA 合成が阻害され、その後タンパク質合成が阻害された。この結果から、SymE は DNA 複製および転写を阻害しその後翻訳が阻害されていることが明らかとなった。複製および転写の 2 つに関与する酵素として DNA の負の超らせん形成煮必須の DNA guyase および 負の超らせんを緩和する DNA トポイソメラーゼ I が大腸菌では知られている。よって、SymE は DNA gyrase または DNA トポイソメラーゼ I 活性を阻害する可能性が示唆された。そこで、SymE 発現後の DNA トポロジーを解析した結果、負の超らせんが緩和されたプラスミドが蓄積したことから、SymE の標的は DNA gyrase であることが示された。さらに SymE を精製し、DNA gyrase 構成成分である GyrA および GyrB との相互作用を免疫沈降法により解析した。その結果、SymE は GyrA と結合した。興味深いことに、SymE はこれまで報告されている DNA gyrase 阻害タンパク質である CcdB, SbmC(GyrI), MurI および YacG とは相同性がなく新規の DNA gyrase 阻害タンパク質であった。精製した SymE タンパク質をゲルろ過クロマトグラフィーにより解析したところ、SymE はヘキサマーを形成することが明らかとなった。SymE による DNA gyrase 阻害に必須のアミノ酸残基をアラニンスキャニングにより探索した結果、K61A, R86A, または K95A を持つ変異体で阻害活性を消失した。

toxin-antitoxin system, *Escherichia coli*, DNA gyrase

講演番号：3A36p20
講演日時、会場：3 月 28 日 17:59～ A 校舎 36 会場

二酸化炭素による連鎖球菌莢膜多糖生産制御メカニズムの解明
Regulatory mechanism of the capsule biosynthesis genes in *Streptococcus anginosus*
○三宅 克英、松本 裕子（石川県大資源研）
○Katsuhide MIYAKE, Yuko MATSUMOTO (Ishikawa Pref. Univ.)

菌体外莢膜多糖はバイオフィルムの主成分として細菌を外部環境から保護する働きを有している。我々はこれまで溶血性連鎖球菌 *Streptococcus agalactiae* や口腔連鎖球菌 *S. anginosus* の莢膜多糖に着目し、これらの菌株から莢膜多糖生合成（*cps*）遺伝子群をクローン化し、その解析を行ってきた。連鎖球菌の莢膜多糖遺伝子群は多くの菌株で報告されてきており、その構造や特徴も明らかになっているが、遺伝子群を調節し、莢膜多糖の生産を制御するメカニズムは不明な点が多い。これまでに我々は *S. anginosus* では二酸化炭素がその誘導因子である可能性を示してきた。今回は CO_2、炭酸および不飽和脂肪酸が莢膜多糖の生産、*cps* 遺伝子群の発現及び細菌の増殖に与える影響について解析したので報告する。

CO_2 (5%)、炭酸、不飽和脂肪酸は莢膜多糖生産量を増強することを *S. anginosus* 抗血清を用いた ELISA 法で明らかにした。この増強が遺伝子の転写レベルで起こっていることを確認するために RT-qPCR 法を行ったところ、遺伝子群の中の *cpsA, cpsB, cpsE* のいずれもが CO_2、炭酸、不飽和脂肪酸によって転写を増強されていることが判明した。これらの結果は CO_2 の存在が単に酸素濃度を減少させることではなく、何らかの代謝反応を介して影響を与えていることを示唆していた。莢膜多糖生合成遺伝子群は通常一つのオペロンで構成されており、最上流にプロモーターが存在する。また遺伝子群の 5'側には必ず４つの制御蛋白質（*cpsA-D*）が存在しており、このうち *cpsA* は転写因子、*cpsB-D* は酸素濃度とチロシンリン酸化を介した莢膜多糖鎖長決定に関与すると報告されている。そこでプロモーター及びこれらの４つの遺伝子を含めたプロモーター解析用 GFP ベクターを作製し、*S. anginosus* での GFP の発現を解析した。その結果、CO_2 と炭酸及び不飽和脂肪酸が *cps* 遺伝子群の発現を正に制御しており、その効果にはプロモーターだけでなく *cpsA* 遺伝子を必要としていることがわかった。莢膜多糖生産増強結果は CO_2 を炭酸に変換する carbonic anhydrase の強制発現株でも確認されており、CO_2 の効果は変換された炭酸によって引き起こされていることも示されている。炭酸がどのように機能するのか、不飽和脂肪酸と炭酸の関係については現在検討中である。一方上記の現象を司る調節遺伝子に関しては、*cps* 遺伝子群近傍下流に存在する二成分制御系因子（OrfO、OrfP、OrfQ、OrfR）の欠損変異株と強制発現株を取得し、莢膜多糖生産への影響を解析している。

capsular polysaccharide, carbon dioxide, Streptococcus

講演番号：3A37a01
講演日時、会場：3 月 28 日 09:00～ A 校舎 37 会場

大腸菌における新規チオ硫酸イオン輸送体 YeeED の機能解析

Functional analysis of new thiosulfate ion importer YeeED in *E.coli* and application to cysteine fermentative production

○城山 真恵加、河野 祐介、大津 厳生、高木 博史（奈良先端大）
○Maeka SHIROYAMA, Yusuke KAWANO, Iwao OHTSU, Hiroshi TAKAGI (Grad. Schl. Biol. Sci., Nara Inst. of Sci. and Tech.)

【背景と目的】生物地球化学サイクルのうちで、生命活動に必須な「硫黄」の循環に着目する。微生物、高等植物は土壌中に豊富に存在する無機硫黄を取り込み有機硫黄化合物に固定する硫黄同化系が存在する。一方、ヒトを含めた哺乳類には、この硫黄同化経路は存在しない。そのため哺乳類は生命活動に必要な硫黄源を微生物・植物に依存している。そのため微生物・植物における無機性硫黄同化の重要性が理解できる。最近、私たちは大腸菌においてチオ硫酸イオン（$S_2O_3^{2-}$）が硫酸イオン（SO_4^{2-}）の利用を抑制することで、チオ硫酸経路優先的にシステイン（Cys）を合成する硫黄源の選択的利用機構「チオ硫酸リプレッション（TSR）」を見出した。TSR の詳細な分子機構は不明であるが、炭素原や窒素源と同様に、TSR は転写レベルによる輸送体の制御ではないかと考えている。本研究では、大腸菌における 2 つの $S_2O_3^{2-}$輸送体 CysPTWA と YeeED に着目し、その機能解析を行った。
【結果と考察】$S_2O_3^{2-}$輸送体CysPTWAを欠損した株、$S_2O_3^{2-}$からCysの前駆体である*S*-スルホシステインを合成できない*cysM*欠損は$S_2O_3^{2-}$単一硫黄源培地で前者は良好に、後者はわずかながら生育できる。このことは、CysPTWAシステム以外の$S_2O_3^{2-}$輸送体が存在し、硫酸経路上に存在する亜硫酸イオンや硫化物イオンへとバイパスする新規なチオ硫酸同化経路が存在することを意味する。よって、チオ硫酸硫黄転移酵素の関与が強く示唆された。そこで、ゲノムワイドにチオ硫酸硫黄転移酵素を探索し、機能未知の*yeeD*遺伝子を見出した。また、その上流に9回膜貫通領域を有する内膜タンパク質YeeEをコードする*yeeE*遺伝子が存在し、これら遺伝子はオペロンを形成していると示唆された。$S_2O_3^{2-}$輸送体を欠損した変異株を用いた生育実験により、YeeEDは新規な$S_2O_3^{2-}$輸送体であることが判明した。さらに、YeeEDは、YeeEもしくはYeeDのどちらか一方を欠損すると機能しないため協調的に働き、YeeEは環境中から$S_2O_3^{2-}$を細胞内に取り込み、YeeDにより速やかに亜硫酸イオンと硫化物イオンに変換することで、硫酸経路を介して、Cysを合成できると考えられる。また、この硫黄転移反応には、YeeD内部に存在する13番目と39番目の2つのCys残基が必須であり、ダイチオール反応により亜硫酸イオンを生成すると示唆された。大腸菌においてCysPTWAシステム以外にYeeEDシステムで$S_2O_3^{2-}$を取り込むことで、硫酸経路一つで$S_2O_3^{2-}$をCys合成に利用できる点でエネルギー節約型の合理的なシステムも獲得していると考えられる。実際、酵母や真核微生物ではYeeEDシステム様の硫黄同化経路を主としているため、進化的な面から非常に興味深い経路である。YeeDの強化はシステイン発酵生産性向上にも有用である（本研究は農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業の支援を受けて実施）。

Escherichia coli , sulfate assimilation, L-cysteine fermentation

講演番号：3A37a02
講演日時、会場：3 月 28 日 09:11～ A 校舎 37 会場

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* における新規チオ硫酸代謝経路の発見とエタノール生産性の向上

A Finding of thiosulfate pathway for synthesis of organic sulfur compounds in *Saccharomyces cerevisiae* and an improvement of Ethanol production

○舟橋 依里、佐伯 恭平、河野 祐介、大津 厳生、高木 博史（奈良先端大）
○Eri FUNAHASHI, Kyohei SAIKI, Yusuke KAWANO, Iwao OHTSU, Hiroshi TAKAGI (Grad. Sch. Biol. Sci., NAIST)

【目的】我々は大腸菌において環境中に硫酸塩とチオ硫酸塩が同時に存在する場合、チオ硫酸塩を優先的に利用することを見出している。硫酸塩からのシステイン合成は、2 分子の ATP と 4 分子の NADPH の消費を伴う一方で、チオ硫酸塩からは 1 分子の NADPH を消費するのみであり、大腸菌がシステイン合成のためにチオ硫酸塩を優先することは合理的であると考えられる。そこで、本研究では酵母 *Saccharomyces cerevisiae* のチオ硫酸塩の資化能および新規チオ硫酸代謝経路とその効果について調べることを目的とした。
【方法と結果】これまで、チオ硫酸塩を単一硫黄源として *S. cerevisiae* が生育できるかどうかについては報告されていない。そこで、チオ硫酸塩を単一硫黄源とした最少（SD）培地における野生株の生育について調べた。その結果、硫酸塩を単一硫黄源とした SD 培地と比べて、僅かではあるが良好な生育を示すことが判明した。次に、チオール試薬（Monobromobimane）を含むメタノールで細胞内代謝物を抽出し、LC-MS/MS に供することで、硫黄化合物のメタボローム解析を行った。その結果、硫酸塩に比べてチオ硫酸塩の方が、亜硫酸塩、硫化物塩、ホモシステインが短時間で生成されていたことから、*S. cerevisiae* は大腸菌と同様にチオ硫酸塩を単一硫黄源としてホモシステインを生合成することが明らかとなった。また、培地中のエタノール濃度をガスクロマトグラフィーにより測定したところ、硫酸塩に比べてチオ硫酸塩の方が、短時間でエタノールを高生産することも見出した。さらに、メタボローム解析および ^{13}C-グルコースを用いたフロー解析の結果から、チオ硫酸塩で培養すると硫酸塩に比べ、細胞内の NADPH の消費が少なく、またペントースリン酸経路のフローが減少していることが判明した。以上の結果から、酵母 *S. cerevisiae* において、硫酸塩よりチオ硫酸塩の方がホモシステインを合成するために 2 分子の ATP と 1 分子の NADPH を節約できると考えられる。そのため、ペントースリン酸経路のフローが減少し、解糖系からのエタノール生産が促進されることで、より短時間でエタノールを高生産したものと結論した（本研究は、農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業の支援を受けて実施した）。

sulfur assimilation, thiosulfate, ethanol production

講演番号：3A37a03
講演日時、会場：3 月 28 日 09:22～ A 校舎 37 会場

麹菌の硝酸イオントランスポーター遺伝子の解析
Analysis of a nitrate transporter gene in *Aspergillus oryzae*
○佐野 元昭、北川 治恵、大箸 信一 (金沢工大)
○Motoaki Sano, Harue Kitagawa, Shin-ichi Ohashi (KIT)

【目的】
外界の様々な栄養源を取り込むため、生物はトランスポーターを用いて糖やアミノ酸など多くの有用物質を細胞の外から細胞内に輸送を行っている。麹菌(*Aspergillus oryzae*)は約12,000個の遺伝子を有しており、そのうち600個程度がトランスポーターとして働くと考えられている。しかしながら、麹菌のトランスポーター遺伝子の機能解析があまり進んでいないのが現状である。そこで今回、硝酸ナトリウムの取り込みにかかわるトランスポーターについて解析を行ったので報告する。

【方法と結果】
*A. nidulans*の硝酸イオントランスポーター遺伝子(*nrtA*)と高い相同性を有する遺伝子を麹菌データベース中から抽出した[1)]。麹菌でこの遺伝子は、窒素源に硝酸ナトリウムを用いると強く発現誘導されることが確認された。次に、*A. oryzae ligD*破壊株を宿主にして遺伝子破壊株の作製を行った。遺伝子破壊株は、硝酸ナトリウムを単一窒素源とした培地で生育確認を行ったところ、顕著な生育不良も認められた。これらの結果から、今回破壊した遺伝子は、硝酸ナトリウムの取り込みに関わる重要な遺伝子であることが判明した。現在、更なる詳細な解析を進めている。

1) 佐野ら ：第 14 回糸状菌分子生物学コンファレンス、 P70 (2014)

Aspergillus oryzae, transporter, nitrate

講演番号：3A37a04
講演日時、会場：3 月 28 日 09:33～ A 校舎 37 会場

酵母を用いた CO_2 輸送体スクリーニング法の開発

Development of a CO_2 transporter screening method using yeast.

○中原 由揮、柴坂 三根夫、且原 真木（岡山大・植物研）
○Yoshiki NAKAHARA, Mineo SHIBASAKA, Maki KATSUHARA (IPSR, Okayama Univ.)

CO_2 は、生物の基本的な 2 つの代謝である呼吸と光合成において重要な役割を果たす物質である。呼吸や醗酵における CO_2 は、細胞質で生成され最終的に細胞外へと排出されるが、光合成では、細胞外から細胞内へと取り込まれた後、葉緑体のストロマへと輸送され、炭素固定反応に用いられている。このように生体膜では、異なる形態の CO_2 輸送が行われている。そのため、局在や輸送の方向が異なる多様な CO_2 輸送体が存在することが考えられる。これまでに CO_2 輸送体は、植物から NtAQP1、HvPIP2 family、AtPIP1;2 など 10 種のアクアポリンが、藻類からは LCI1 が同定されている。生体膜における CO_2 輸送機構への理解を深めるためにも、多くの新規 CO_2 輸送体を同定することは重要であり、CO_2 輸送体を効率的に発見することのできる手法の開発が急がれている。

我々は、これまでに炭酸脱水酵素(Carbonic Anhydrase：CA)を恒常的に発現する酵母株(CA 株)を用い、植物アクアポリンの CO_2 透過性を研究してきた。本研究では、CA と CO_2 輸送体の共発現によって引き起こされる生育の変化を指標とした CO_2 輸送体のスクリーニング法開発に取り組んでいる。本大会では、スクリーニング法開発の経過を報告し、その有効性について議論したい。

CO_2 plays important roles in fundamental metabolisms, photosynthesis and respiration. CO_2 is produced by respiration and fermentation in the cytosol and released into the extracellular space, whereas in the photosynthesis, CO_2 is up taken across the plasma membrane and transported into the stroma of chloroplasts. Thus, CO_2 transport system with different features should be present. Many types of CO_2 transporter with different localization or directionality are assumed to exist. Until now, CO_2 transporter has been identified in ten aquaporins (e.g. NtAQP1, HvPIP2 family, AtPIP1;2) from plants and LCI1 from algae. To understand CO_2 transport system in living cells, efficient screening method to identify many other CO_2 transporters is important.

We have been studying on CO_2 conductance of plant aquaporins using a yeast strain which expresses constitutively carbonic anhydrase. In the present study we are developing a screening method for CO_2 transporters using the differences in the growth rate of yeast cells when co-expressing carbonic anhydrase and a CO_2 transporter. In this presentation, we will report the progress of the development in this method, and discuss the availability of this method.

CO_2 transporter, Yeast, Screening method

講演番号：3A37a05
講演日時、会場：3 月 28 日 09:44～ A 校舎 37 会場

ワインアロマ生成に関する酵母グリコシダーゼの解析

Analysis of yeast glycosidases relevant to wine aroma generation

○池原 作務、小野 大洋、遠藤 尚矢、大森 麻宥子、松村 卓磨、妙田 貴生、戸枝 一喜、藤森 嶺、西澤 信、遠藤 明仁、宮地 竜郎、中川 純一（東農業大生産）
○Samu IKEHARA, Hiromi ONO, Naoya ENDO, Mayuko OMORI, Takuma MATSUMURA, Takao MYODA, Kazuki TOEDA, Takane FUJIMORI, Makoto NISHIZAWA, Akihito ENDO, Tatsuro MIYAJI, Junichi NAKAGAWA (Tokyo Univ. of Agriculture)

【目的】

ワインの香りはその商品価値を左右する重要な要素のひとつである。ワイン醸造において、酵母はアルコール醗酵を行う際にブドウ果汁中の香気成分前駆体である配糖体化合物にグリコシダーゼを作用させて糖を切り離すとされる。その際に、糖が結合していた香気成分が揮発することでワインアロマとして感じられるようになる。このグリコシダーゼの発現と生成されるワインアロマとの関わりを解析し、重要な香気成分の生成に関与するグリコシダーゼ遺伝子の探索を目的とした。

【実験方法】

菌株は、*Saccharomyces cerevisiae* BY4741 株 の野生株 (WT) 、同株のヒストンアセチル基転移酵素 (HAT) 関連遺伝子欠損株である *Δada2*、ワイン醸造用酵母株である VL-1 の 3 株を用いた。前培養として、各菌株を 5 mlYPD 液体培地にシングルコロニーを植菌し、30°C で 20 時間培養後、100 mlYPD 培地に移し、更に 30°C で 20 時間培養後、グルコースを 2% になるように添加した Basal 培地に移して 30°C で 20 時間培養した。それを北海道産マスカット・オットネル種を糖度が 20% になるように補糖したブドウ果汁培地に OD_{660nm}=1.5 になるように植菌し、室温で 24 時間遮光保存後、17°C で醗酵させた。各酵母株の醗酵具合から、醗酵の初期、中期、後期の日数を決定し、それぞれの時期に達したところで菌体と果汁を回収し、逆転写 PCR による 5 種類のグリコシダーゼ候補遺伝子の発現、および GC/MS による香気成分の分析を行った。

【結果】

使用した 3 菌株において醗酵初期、中期、後期のそれぞれでグリコシダーゼ遺伝子の発現パターンおよび、生成される香気成分の量や種類が異なることが観察された。今回グリコシダーゼ遺伝子の候補として、*CWH41*、*EXG1*、*MAL12*、*MAL32*、*SPR1* の 5 つの遺伝子の解析を行ったが、*MAL12* および *MAL32* の発現量の多い時期でワインアロマ系の香気成分が多く検出される傾向が見られた。

Saccharomyces cerevisiae, glycosidase, wine

講演番号：3A37a06
講演日時、会場：3 月 28 日 10:05～ A 校舎 37 会場

Aspergillus terreus における pH 依存的イタコン酸生産制御機構の解明
Regulation of pH responsive itaconic acid production in *Aspergillus terreus*
○安藤 祥生[1]、尾花 克哉[2]、金政 真[2]([1]中部大院・応生、[2]中部大・環境生科)
○Yoshiki ANDO[1], Katsuya OBANA[2], Shin KANAMASA[2] ([1]Grad. Sch. Biosci. Biotech. Chubu Univ., [2]Dept. Envi. Biol. Chubu Univ.)

【背景・目的】
イタコン酸は不飽和基を有する二価の水溶性有機酸であり、その構造から共重合によって線状高分子を形成できる特性がある。その特性と高い安全性から、合成樹脂や合成繊維、接着剤や印刷インキ等、工業製品の原料や添加剤として幅広く利用されている。また、イタコン酸は米国エネルギー省により、バイオマスから生産することを期待される 12 種類の基礎化学物質（ビルディングブロック）の一つとして選定されている。イタコン酸は、*Aspergillus terreus*、*Aspergillus itaconicus* のような糸状菌や、*Candida tsukubaensis* のような酵母において生合成できることが知られており、工業生産においては生育速度の観点からもっぱら *A. terreus* が使用されてきた。*A. terreus* において、イタコン酸生産性向上のための研究は数多く行われてきたが、イタコン酸の生合成経路は近年まで未解明であった。これまでに、我々は本菌由来のシス・アコニット酸デカルボキシラーゼ（CAD）をコードする *CAD1* 遺伝子を単離・同定し、CAD がクエン酸回路（TCA 回路）代謝物であるシス・アコニット酸を基質としてイタコン酸を直接生成することから、イタコン酸生産の鍵酵素であることを明らかとした。
これまでの研究により、本菌は pH2～3 のみで旺盛にイタコン酸を生産し、pH4 を超えるとイタコン酸生産性は大幅に減少することが知られている。しかし、この現象の原因は未解明である。そこで本研究では、本菌のイタコン酸生産性が pH 依存的に変化する仕組みを分子レベルで理解することを目指して行った。
【方法・結果】
前培養した本菌を、イタコン酸生産に適した pH3 と、ほとんどイタコン酸を生産しない pH5 の培養条件にシフトして培養し、それぞれ *CAD1* 遺伝子転写量と CAD 活性を測定した。mRNA の定量は qRT-PCR を用い、CAD 活性は細胞破砕液を粗酵素、シス・アコニット酸を基質とした反応により生成するイタコン酸を HPLC にて定量した。その結果、pH3 で培養した場合、pH5 と比較して *CAD1* 遺伝子転写量と CAD 活性が共に高かった。以上のことから、本菌のイタコン酸生産の pH 依存的な変化は *CAD1* 遺伝子の転写レベルで起こっていることが分かった。

Aspergillus terreus, *cis*-aconitic acid decarboxylase, itaconic acid

講演番号：3A37a07
講演日時、会場：3 月 28 日 10:16～ A 校舎 37 会場

酵母に含まれる代謝物マーカー探索における GC-MS 法と GC-MS/MS 法の比較

Comparison of metabolite maker discovery in a yeast between GC-MS and GC-MS/MS

○坂井 健朗[1]、川名 修一[1]、飯田 順子[1]、馬場 健史[2]、福崎 英一郎[2]([1]島津製作所、[2]大阪大学大学院工学研究科生命先端工学専攻)
○Takero SAKAI[1], Shuichi KAWANA[1], Junko IIDA[1], Takeshi BAMBA[2], Eiichiro FUKUSAKI[2] ([1]Shimadzu Co., [2]Dept. Biotech., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

【目的】

メタボロミクスで測定が行われている酵母及び食品サンプル等には、多くの代謝物や夾雑物が含まれているため、優れたクロマトグラフィー分離能を有し、高感度で安定した測定が可能な GC-MS が広く用いられている。しかしながら、これらのサンプルには、多数の代謝物と妨害成分を含むため、シングル GC/MS では分離が不十分な場合がある。そのため、近年、GC-MS/MS の Multiple Reaction Monitoring モード(MRM)での測定が広まりつつある。本発表では、Scan と MRM の測定モードを用いて、酵母の野生株及び変異株の代謝物測定を行い、共に検出された成分を PCA 解析、及び OPLS 解析に供して得られた両株における差異を示すマーカー候補の検討結果について報告する。

【方法】

前処理は、乾燥菌体重量 5 mg を採取し、ボールミルで粉砕、メタノール/ 水/ クロロホルム溶液(5:2:2)で抽出した後、メトキシムとトリメチルシリル誘導体化を行い、測定サンプルとした[1)]。GC-MS は GCMS-TQ8040(㈱島津製作所)を用い、各サンプルを Scan と MRM で各 5 回測定を行った。なお、両測定モードにおける測定対象代謝物は、GC/MS 代謝成分データベース（㈱島津製作所）に登録されている 193TMS 誘導体化代謝物とした。

【結果】

測定対象 193 代謝物中、野生株において検出された代謝物数は、Scan 73、MRM 106、変異株においては Scan 74、MRM 102 であった。また、両測定モードにおいて野生株、及び変異株両方から検出された成分は 63 代謝物であった。両測定モードで検出された 63 代謝物を用いて PCA 解析を行った結果、Scan、MRM 共に野生株と変異株の群が同方向に分離されたが、MRM の方がよりクリアであった。更に、これらのデータを OPLS 解析に供した結果、各株に偏在するマーカー代謝物を Scan では 12 成分、MRM では 20 成分を検出した。Scan では妨害成分の影響によりマスクロマトグラムにオーバーラップが生じた成分が、MRM では妨害成分の影響が除去され、正確な測定が可能であった。その結果、MRM では各群の分離がクリアになり、各株に偏在するマーカー代謝物の検出数が増加した。以上の結果より、酵母の代謝物測定において、測定対象成分が同じ場合、MRM の方が Scan よりマーカー代謝物候補をより多く、正確に検出できることが示された。

1) 実践的メタボローム分析プロトコール イチから始めるメタボローム分析　P29,30 ESI 友の会編

metabolomics, GC-MS/MS, yeast

講演番号：3A37a08
講演日時、会場：3 月 28 日 10:27～ A 校舎 37 会場

Metabolome analysis revealed the effect of carbon catabolite repression to poly (γ-glutamic acid) biosynthesis in *Bacillus licheniformis*

○HITOSHI MITSUNAGA[1], LENA MEISSNER[2], THOMAS PALMEN[2], TAKESHI BAMBA[1], JOCHEN BUECHS[2], EIICHIRO FUKUSAKI[1] ([1]Dept.Biotech., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [2]AVT-Biochem. Eng., RWTH Aachen Univ.)

[Introduction]

Poly (γ-glutamic acid) (PGA) is a polymer composed of L- and/or D- glutamic acids. In most case, it is produced by *Bacillus* sp. Because the polymer is applicable to many applications. So far, effects of extracellular environmental conditions for PGA production have been studied for an intended PGA production. Among them, it has been reported that higher PGA production was observed in a medium containing glycerol rather than glucose. However, there are few reports on the intracellular metabolic regulation of the PGA production. To reveal the regulation system might provide a clue for the construction of a strategy for enhanced PGA production.

Metabolomics is an 'omics' research based on exhaustive profiling of metabolites and would quantitatively reflect the functional level of the cell. It attracts attention as a tool for high-resolution phenotype analysis and metabolic engineering.

[Objective]

In this study, PGA producing *Bacillus* sp. was subjected to metabolome analysis to reveal the metabolic mechanisms of PGA production on different carbon sources.

[Result]

B. licheniformis was cultivated in a medium including citric acid, glutamic acid, and glucose or glycerol. As the result of the metabolome analysis, acetyl-CoA and citric acid were accumulated in glycerol and glucose medium, respectively. The metabolic profiling seemed to imply that citrate synthase and aconitase were repressed in the medium containing glycerol and glucose, respectively, by carbon catabolite control. Though, because both media contain citric acid, the cells might only be able in glycerol medium to produce more glutamic acid for PGA production from the citric acid. Based on the result, a cultivation in a medium with added further citric acid for improvement of PGA production was performed. Thereby, as the hypothesis, higher PGA production was observed in the glycerol medium containing additional citrate than previous one, while there was slightly increase in the glucose medium with additional citrate.

Metabolomics, Bacillus licheniformis, Poly (γ-glutamic acid)

講演番号：3A37a09
講演日時、会場：3 月 28 日 10:38～ A 校舎 37 会場

代謝システム解析に基づく酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の中心代謝調節機構の解明

Elucidation of the central metabolic control mechanism in *Saccharomyces cerevisiae* based on metabolic systems analysis

○西野 駿佑、岡橋 伸幸、富田 淳美、松田 史夫、清水 浩（阪大院・情報・バイオ情報）
○Shunsuke NISHINO, Nobuyuki OKAHASHI, Atsumi TOMITA, Fumio MATSUDA, Hiroshi SHIMIZU (Dept. of Bioinfo. Eng., Grad. Sch. IST, Osaka Univ.)

【目的】出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の高いグルコース資化能力は、酵素発現量レベルの調節を通じた中間体含量、および代謝フラックスの制御によるものと考えられる。そこで本研究では、酵母解糖系の代謝調節機構の解明を目指し、代謝関連遺伝子破壊株の中心代謝中間体の絶対定量、^{13}C 代謝フラックス解析、および定量プロテオーム解析を行った。

【実験手順】*S. cerevisiae* S288C 株の *PFK1* および *ZWF1* 遺伝子を *KanMX* 遺伝子と置換した S288C*pfk1*Δ、S288C*zwf1*Δ 株を作成した。非標識または[U-^{13}C]グルコース含む SD 培地中 (100 mL)、30℃、150 rpm で回分培養した菌体を各分析に供した。コールドメタノール法でクエンチ後、クロロホルム - メタノール - 水法で抽出した代謝中間体を LC-MS/MS 分析 (AB SCIEX API3200, MRM モード) で測定した。^{13}C 代謝フラックス解析は、100% [1-^{13}C]グルコース含有 SD 培地で培養した菌体のタンパク由来アミノ酸を GC-MS (Agilent 5973) で分析し、^{13}C 濃縮度データから専用ソフトウェア (OpenMebius) を用いて代謝フラックス分布を推定した。定量プロテオーム解析では、菌体から抽出したタンパク質のトリプシン消化物を nanoLC-UFMS (Shimadzu LCMS-8040, MRM モード) で分析し、中心代謝酵素量を測定した。

【結果】酵母野生株 (S288C 株)、ホスホフルクトキナーゼおよびグルコース 6 リン酸デヒドロゲナーゼをコードする *PFK1* と *ZWF1* 遺伝子がそれぞれ欠損した 1 遺伝子破壊株を微好気条件下で回分培養し、得られた菌体の中心代謝中間体の絶対定量、代謝フラックスの推定、および中心代謝酵素量の測定を行った。S288C 株では取り込まれたグルコースの 80%以上が解糖系で代謝されており、さらにペントースリン酸経路中間体の含量 (0.08~0.001 μmol/g 湿菌体重量) は G6P や F6P などの解糖系中間体含量 (1.2~0.02 μmol/g 湿菌体重量) に比べて低い傾向があった。S288C*zwf1*Δ 株では酸化的ペントースリン酸経路に関わる Sol3p と Gnd1p の酵素量も減少しており、その結果、酸化的ペントースリン酸経路フラックスが減少していると考えられた。S288C*pfk1*Δ 株では機能ホモログである Pfk2p の発現量が増加しており、Pfk1p の欠損を補完していると考えられた。しかし補完が不十分なことから、上流の G6P, F6P の含量増加、および酸化的ペントースリン酸経路へ代謝フラックスの転流が起こり、その結果ペントースリン酸経路中間体の含量増加が起きていると推測された。一方、Pgi1p や Tpi1p の酵素量はいずれの 1 遺伝子破壊株でも変化しなかったことから、翻訳後修飾の関与が示唆された。本研究の一部は NEDO「先導的産業技術創出事業 (若手研究グラント)」の支援を受けたものである。

Saccharomyces cerevisiae, Central metabolism, Metabolic systems analysis

講演番号：3A37a10
講演日時、会場：3 月 28 日 10:49～ A 校舎 37 会場

グリセロール炭素源における大腸菌中枢代謝経路の ^{13}C フラックス解析
^{13}C Metabolic flux analysis of *Escherichia coli* central carbon metabolism grown on glycerol
大橋 秀伍、○戸谷 吉博、清水 浩（阪大院・情報・バイオ情報）
Shugo Ohashi, ○Yoshihiro TOYA, Hiroshi SHIMIZU (Dept. Bioinfo. Eng., Grad. Sch. IST, Osaka Univ.)

【背景と目的】グリセロールはバイオディーゼルの副産物として生産される余剰資源であり、微生物発酵を利用して様々な有用物質に変換する取り組みが注目されている。目的物質の生産性を合理的に向上させるには、細胞内の代謝状態に基づいて代謝システムを改変することが重要である。^{13}C 代謝フラックス解析は細胞内の代謝の流れを可視化する手法であり、その精度は実験に利用する基質の標識パターンに依存する。しかし、グリセロール炭素源おいては、どのような標識パターンの基質が有効か分かっていない。我々は利用可能な複数種類の ^{13}C 標識グリセロールを用いて、フラックス分布の推定に最適な標識条件を探索した。
【方法】野生株の大腸菌をグリセロール単一炭素源の合成培地で培養した。[1,3-^{13}C]、[2-^{13}C]、[U-^{13}C]グリセロールをそれぞれ天然標識のグリセロールと等量混合して培養実験に用いた。対数増殖期の細胞を構成するタンパク質を加水分解し、得られたアミノ酸をガスクロマトグラフ質量分析計で分析した。それぞれの標識実験について、測定したアミノ酸の ^{13}C 濃縮度を説明する代謝フラックス分布を最適化計算により推定した。
【結果】本解析に用いた大腸菌の中枢代謝経路モデルは、酸化的ペントースリン酸経路、エントナードゥドロフ経路、リンゴ酸経路、グリオキシル酸経路の 4 つの分岐点を含む。これら分岐経路のフラックスの 95%信頼区間を標識実験ごとに比較した。酸化的ペントースリン酸経路、エントナードゥドロフ経路、リンゴ酸経路のフラックスは[2-^{13}C]もしくは[U-^{13}C]グリセロールを利用した際には高精度に推定できたが、[1,3-^{13}C]グリセロールを用いた場合には推定精度が著しく低下した。また、グリオキシル酸経路のフラックスは[1,3-^{13}C]、[2-^{13}C]、[U-^{13}C]グリセロールのいずれを用いても高精度に推定できた。経路全体のフラックス分布の推定には、[2-^{13}C]グリセロールが有効であることを明らかにした。推定したグリセロール単一炭素源におけるフラックス分布からは、取り込まれたグリセロールの約 40%が糖新生経路とペントースリン酸経路を経由して代謝されることが明らかになった。そのため、増殖に必要な NADPH の大半が酸化的ペントースリン酸経路で補われたことが示唆された。
本研究で明らかにした ^{13}C 代謝フラックス解析のためのグリセロールの ^{13}C 標識方法は、グリセロール炭素源における代謝工学を実施するための有効なツールとなるだろう。

^{13}C Metabolic flux analysis, glycerol, *Escherichia coli*

講演番号：3A37a11
講演日時、会場：3 月 28 日 11:10～ A 校舎 37 会場

Penicillium purpurogenum IAM7104 株における PP-V (12-carboxyl-monascorubramine)生産時特異的窒素代謝関連タンパク質の探索

Search for the nitrogen metabolism-relation protein at PP-V production in *Penicillium purpurogenum* IAM7104

○安井 雅人[1]、加藤 順[2]、春見 隆文[1,2]、荻原 淳[1,2] ([1]日本大学大学院、[2]日本大学)
○Masato YASUI[1], Jun KATO[2], Takafumi KASUMI[1,2], Jun OGIHARA[1,2] ([1]Dept. Biores. Util. Sci., Grad. Sch. Biores. Sci., Nihon Univ., [2]Nihon Univ.)

目的）我々は *Penicillium purpurogenum* が *Monascus* 色素同族体を生産することを確認している。*Penicilium purpurogenum* による *Monascus* 色素生産能の特徴は *Monascus* 属糸状菌と比較して、側鎖のメチル基転移反応、カルボキシル化反応、アミノ基転移反応などが発現していることである。特にアミノ基転移反応には硝酸態窒素からアンモニア態窒素への還元反応系や、アンモニア態窒素から生合成されるグルタミン等のアミノ基が関与していることが予想されている。*Penicillium purpurogenum* IAM7104 株はその他の P. *purpurogenum* と比較して低窒素存在下の特定培養条件下にて PP-V(12-carboxyl-monascorubramine)を生産する。このため、本菌株は何か特別な色素生産に関連した窒素代謝系を獲得していることが予想された。本研究ではこの窒素代謝系を明らかにするために、IAM7104 株色素生産時特異的発現タンパク質のプロテオーム解析を行った。さらに色素生産時の菌体からトータル RNA を調製し次世代シークエンサーを用いた RNA seq によるトランスクリプトーム解析を行った。これにより IAM7104 株特異的窒素代謝関連タンパク質の探索を行った。
方法及び結果）供試菌株として *Penicillium purpurogenum* IAM15392、7104 株を用いた。これら 2 菌株を色素生産培地の窒素源である硝酸アンモニウムを含まない PP-O(12-carboxyl-monascorubrin)生産培地にて培養した。この結果 IAM7104 株特異的に PP-V を生産することを確認した。この時の両菌体からタンパク質及びトータル RNA を抽出した。抽出したタンパク質は定量、SDS-PAGE による分画、銀染色による確認、ゲル内での脱色、還元アルキル化、トリプシン消化、抽出した後、nanoLC-ESI-MS/MS システムを用いて発現タンパク質の網羅的な半定量解析を行った。トータル RNA は精製、逆転写反応による cDNA 合成、次世代シークエンサーによる RNA seq を行った。アライメントは IAM15392 株 PP-V 及び PP-O 生産条件、IAM7104 株 PP-O 生産条件の 3 条件下にて得られたシークエンス情報を用いて行い、各条件下にて得られたシークエンス解析結果を IAM15392 株のゲノムドラフトシークエンス解析結果を基にマッピングした。それぞれの解析結果のうち 10 倍以上の有意な発現差が認められたタンパク質および遺伝子のデータ抽出を行った。その結果、いくつかの特徴的な IAM7104 株特異的なタンパク質等の情報を確認した。

Penicillium, Monascus pigment, Omics analysis

講演番号：3A37a12
講演日時、会場：3 月 28 日 11:21～ A 校舎 37 会場

メタボロームデータを基にしたメタ 16S 解析に用いる系統分類階級の提案

The Classification Level of Intestinal Microbiome at The Meta 16S analysis by NGS

○脇田 義久[1]、下村 有美[2]、加戸 久生[1]、土屋 陽一[1]、松本 光晴[2] ([1]サッポロホールディングス・グループ研究戦略推進部、[2]協同乳業・技術開発)
○Yoshihisa Wakita[1], Yumi Shimomura[2], Hisao Kado[1], Youichi Tsuchiya[1], Mitsuharu Matsumoto[2] ([1]Sapporo Holdings Ltd., [2]Kyodo Milk Industry Co. Ltd.)

次世代シーケンサーによる腸内細菌解析（メタ 16S 解析）の登場により、網羅的な腸内細菌叢解析が可能となった。しかしながら、メタ 16S 解析の際は、門、綱、目、科、属、種という分類階級での解析結果が得られるが、どの分類階級を利用するかという明確な基準はなく、研究者により異なる状況である。我々は腸内細菌の代謝産物に着目し、それが宿主の健康に大きく影響していることを明らかにしてきた。本研究では生体と腸内細菌のクロストークの研究に適した分類階級を明らかにするため、代謝産物と相関性が高いメタ 16S 解析時の分類階級について検討したので報告する。

定着している腸内細菌が異なる同系統のマウスを用意するため、3 つのブリーダーから 8 週齢の雄性 C57BL/6 マウスを 26～28 匹導入した。導入直後に各ブリーダーのマウスを通常飼育群と抗生物質投与群とに分け、抗生物質投与群にはアンピシリン、ネオマイシン、メトロニダゾール、バンコマイシンを吸水により 3 日間投与した。通常飼育群は飼育開始 5 日後、抗生物質投与群は抗生物質投与終了 4 日後に糞便を回収し、CE-TOF-MS によるメタボローム解析と次世代シーケンサーによるメタ 16S 解析（V1-2 領域）に供試した。得られたシーケンスの解析には門～属レベルで解析が可能である RDP classifier を用いた。

代謝産物は 205 成分が検出され、主成分分析の結果、通常飼育群と抗生物質投与群とで明確なプロファイルの違いが確認された。腸内細菌の各分類階級での検出結果について主成分分析を行った結果、科、属レベルにおいて代謝産物解析時と同様に通常飼育群と抗生物質投与群とのプロファイルの違いが確認された。一方、門、綱、目レベルでは違いが認められなかった。

本研究の結果は、生体と腸内菌叢のクロストークに関わる研究を行う場合、腸内菌叢の系統学的分類階級は、門、綱、目での菌叢評価は好ましくなく、科あるいは属による分類階級での評価が適していることを示唆しており、メタ 16S 解析を行う際の重要な知見となると考えられる。

microbiome, metabolome, NGS

講演番号：3A37a13
講演日時、会場：3 月 28 日 11:32～ A 校舎 37 会場

メタゲノム中の生理代謝機能ポテンシャルを評価する新手法”MAPLE”システム

New evaluation system of metabolic and physiological potential harbored in genomes and metagnomes,"MAPLE".

○荒井 渉[1]、谷口 丈晃[2]、五斗 進[4]、守屋 勇樹[4]、竹本 和弘[3]、黄 鶴[1]、高見 英人[1] ([1]海洋研究開発機構、[2]三菱総研、[3]九工大、[4]京大化研)
○ Wataru ARAI[1], Takeaki TANIGUCHI[2], Susumu GOTO[4], Yuki MORIYA[4], Kazuhiro TAKEMOTO[3], He Huang[1], Hideto TAKAMI[1] ([1]JAMSTEC, [2]MRI, [3]Kyutech, [4]Kyouto Univ.)

【背景】 近年、ハイスループットシーケンサーの発展などにより、大量のゲノム配列の取得が容易となってきた。それに伴って、環境中の微生物叢全体を対象とした網羅的メタゲノム解析の研究報告例が急増している。我々もこれまで、深海底泥や熱水流路などの極限環境に形成された様々な微生物生態系の持つ機能の解明を目的として、メタゲノム解析を推進してきた。しかし、従来のメタゲノム解析では、16S rRNA や特定の遺伝子のみを用いて行う分類学的な多様性解析が主であり、微生物生態系全体の持つ機能やそれを担う微生物の特徴、生理・代謝機能の冗長性 (abundance) などの解明には至っておらず、新たな解析技術が求められていた。そこで我々は、様々な環境に形成された微生物生態系の機能的特徴を評価する **M**etabolic **A**nd **P**hysiological Potentia**L** **E**valuator (MAPLE) システムを開発、昨年末にゲノムネット (http://www.genome.jp/tools/maple/)から公開し、現在も開発を続けている。

【MAPLE システム】 KEGG モジュールは、KEGG パスウェイマップから反応単位ごとに切り出されたいわゆる小さなパスウェイで、各々複数のオーソログ遺伝子(KO：KEGG Orthology)によって構成されている。現在およそ 600 種類が定義され、パスウェイ、複合体、機能セット、特殊モジュールの 4 種類からなる大カテゴリーと、CO_2 固定, 窒素代謝など 56 種類の小機能カテゴリーに分類されている。MAPLE は、個別生物、環境メタゲノムなどの遺伝子セットを対象として、KAAS (KEGG Automatic Annotation Server) を用いた各 KO の ID (K 番号)のアサインを行い、K 番号遺伝子が付与された遺伝子群のモジュールへのマッピングパターンの可視化と、各モジュールに対する充足率 (MCR) の計算を行うツールである。 MAPLE は、これら充足率やマッピングパターンからの潜在的代謝機能評価を主機能としているが、各代謝機能を担う生物種の割合、充足されたモジュールの abundance の違いに基づく代謝機能バランスや環境間の機能的頑強性の違いについても評価可能なシステムである。本システムを用いることで、微生物コミュニティーを構成するバクテリアとアーキアの比率や phylum レベルの生物種分類をはじめとして、環境中にある生理・代謝機能ポテンシャルとそれを担う微生物種、各機能の abundance などをハイライトし、異なる環境間での比較を容易に行うことできる。したがって、複数地点間や同一地点の時系列なメタゲノムデータを用いた比較解析結果から、機能ポテンシャルの動態変化を容易に可視化することも可能である。また、未培養菌からシングルセルゲノミクスなどによって再構築されたゲノムデータについても、未培養菌と既知生物種との代謝機能のポテンシャルの比較から、未培養菌の生き様をも推測することができる。本発表では、MAPLE システムの概念と使用方法、解析例について報告する。

Metagenomics, MAPLE, comprehensive functions

講演番号：3A37a14
講演日時、会場：3 月 28 日 11:43～ A 校舎 37 会場

MAPLE ステムによる未培養アーキア *Ca.* ‘Caldiarchaeum subterraneum’ の生理・代謝ポテンシャル解析

Metabolic and physiological potential of uncultured *Ca.* 'Caldiarchaeum subterraneum' revealed by MAPLE system

○高見 英人[1]、荒井 渉[1]、内山 郁夫[2]、谷口 丈晃[3]（[1]海洋機構資源、[2]基生研、[3]三菱総研生活）
○Hideto Takami[1], Wataru Arai[1], Ikuo Uchiyama[2], Takeaki Taniguchi[3]（[1]JAMSTEC, [2]NIBB, [3]MRI）

［背景と目的］ 近年のハイスループットシーケンサーの目覚しい技術革新によって、メタゲノム配列から未培養のバクテリアやアーキアのゲノムを再構築し、ゲノム配列を手に入れることが可能になってきた。また、同様にシングルセルゲノミクスによる一細胞からのゲノム増幅、シーケンシングによるゲノム配列の取得も現実的なアプローチとなってきた。これにより、既存の phylum (門)以外にも candidate phylum に属する未培養のゲノム情報から生理・代謝機能解析を行うことで、これまでその実態が不明であったいわゆる“Microbial Dark Matter (MDM)”の生き様に迫ることができる時代となった。しかし、従来のゲノム解析では、ゲノム情報から生物種が有する幅広い生理・代謝ポテンシャルを網羅的に明らかにすることが難しく、新たな方法論の開発が求められていた。そこで我々は、小さなパスウェイとして反応単位で定義された KEGG 機能モジュールを用いた生理・代謝機能ポテンシャル評価システム(MAPLE)を新に構築した。そこで本研究では、この MAPLE システムを用いて、熱水環境に繁茂するバイオマットからメタゲノム的アプローチによって全ゲノムを再構築した *Aigarchaeota*(candidate phylum)に分類される未培養 *Ca.* ‘Caldiarchaeum subterraneum’の生理代謝機能ポテンシャルとこれまで分離された 78 種のアーキアの機能ポテンシャル比較と機能的特徴づけを目的とした。

［方法］ *Ca.* ‘C. subterraneum’を含むアーキア 79 生物種のゲノム配列から得られた全遺伝子のアミノ酸配列を MAPLE システムに投げ、約 600 種類の KEGG 機能モジュールに対する充足率(%)を計算し、各生物種のモジュールに対する充足率パターンに基づくクラスタリング解析、PCA 解析を行った。

［結果と考察］ モジュールの充足率に基づくクラスタリング解析の結果では、*Ca.* ‘C. subterraneum’は、系統関係と同様に *Thaumarchaeota* と全体的な生理・代謝機能ポテンシャルパターンが類似していた。PCA 解析でも同様に *Thaumarchaeota* の近傍に位置し、他の *Euryarchaeota* や *Crenarchaeota* とは異なっていた。また、*Ca.* ‘C. subterraneum’は好気ゾーンに位置し、好気性菌であることが示唆された。一方、*Thaumarchaeota* に特徴的なアンモニア酸化や HP-HB サイクルによる CO_2 固定に関するモジュールを充足しないこと、解糖系、TCA サイクル、グリオキシル酸サイクルをほぼ充足するなど、*Thaumarchaeota* とは明確に異なる点も見出された。これまでの解析では *Ca.* ‘C. subterraneum’が独立栄養的に生育する可能性が示唆されていたが、本研究によって、BCAA や糖の取り込みに必要な複合体モジュールを複数有していること、CO_2 固定に必要な既知の 6 種のモジュールを充足しないことなどから、本菌のゲノムが取得されたバイオマットでは従属栄養的に生育している可能性も強く示唆された。

MAPLE system, Archaea, *Ca.*'Caldiarchaeum subterraneum'

講演番号：3A37a15
講演日時、会場：3 月 28 日 11:54～ A 校舎 37 会場

好熱性アーキア *Vulcanisaeta* 属のゲノム情報にみた生物地理学的な特徴
Biogeographical characteristics revealed in the genome sequences of the hyperthermophilic archaeal genus *Vulcanisaeta*

○岩下 愛[1,2]、伊藤 隆[2]、大熊 盛也[2]、宇佐美 論[3]、吉田 泰彦[1]([1]東洋大院理工、[2]理研 BRC・JCM、[3]東洋大理工)
○Mana IWASHITA[1,2], Takashi ITOH[2], Moriya OHKUMA[2], Ron USAMI[3], Yasuhiko YOSHIDA[1]
([1]Toyo Univ. Grad. Sch., [2]RIKEN BRC, [3]Toyo Univ.)

【背景・目的】

我々はこれまで日本の火山性温泉から分離された超好熱性アーキア *Vulcanisaeta* 属菌株について 16S rRNA と *radA*、DEAD/DEAH box helicase の各遺伝子を用いた生物地理学的解析を行ってきた。この解析によって *V. distributa* とその関連株はおおよそ東北・北海道と関東、九州の 3 グループに分けられ、およそ生物地理学的な関係が成立しているものと思われた。しかし、東北・北海道の分離株は分離源の地理的距離に関わらず、玉川（秋田）と川湯（北海道)、蒸ノ湯（秋田）と和琴（北海道）の分離株がそれぞれ別のクラスターを形成した。この生物地理学的関係との矛盾は、分離環境である泉質の違いによる可能性があるものと推察している。

今日ではいくつかの *Vulcanisaeta* 属菌株のゲノム情報が利用可能となっている。本研究では、*Vulcanisaeta* 属菌株におけるゲノム情報を用いて、さらなる生物地理学的な解析を試みた。

【方法】

系統解析には既に完全ゲノムが解析された *V. distribute* IC-017^T 株とドラフトゲノム解析がされた 8 株を用いて、今回はリボソームタンパク質遺伝子に着目した。ゲノム中から BLAST によって 25 遺伝子について相同性検索を行い、これらのうち 13 遺伝子の塩基配列を用いて系統解析を行った。また、*V. distirbuta* と関連株に共通して遺伝子の並びが保存されているリボソームタンパク質遺伝子間の塩基配列についても比較を行った。

【結果】

リボソームタンパク質遺伝子塩基配列による系統解析では、16S rRNA 遺伝子による系統解析と同様に 3 グループに大別された。東北・北海道の分離株はこれまでと同様に地理的な分布と矛盾するクラスターを形成した。

隣接するリボソームタンパク質遺伝子の並びは、概ね *Vulcanisaeta* 属菌株間で保存されていた。リボソームタンパク質 L10p と L1p の遺伝子間塩基配列に最小で 119 bp、最大 2384 bp の幅が見られた。このうち和琴・蒸ノ湯から分離した *V. distributa* 関連株には、amidohydrolase 様のタンパク質遺伝子が介在していた。以上より、これらの株は玉川・川湯由来の分離株の系統と分岐した後に東北・北海道に伝播したものと推測している。今後は、東北・北海道の分離株が環境条件への適応によってどのような表現型を持つのか比較するべく、これら菌株の表現型についても検討を行う予定である。

Vulcanisaeta, biogeography, ribosomal protein gene

講演番号：3A37p03
講演日時、会場：3 月 28 日 14:22～ A 校舎 37 会場

GenomeMatcher のアノテーション支援機能
Annotation support tool of GenomeMatcher

○大坪 嘉行、永田 裕二、津田 雅孝（東北大院生命科）
○Yoshiyuki Ohtsubo, Yuji Nagata, Masataka Tsuda (Tohoku Univ.)

次世代シーケンサーの登場以来、微生物特に細菌のドラフトゲノム配列を決定することは以前と比べて格段に容易になった。また、我々はドラフトゲノム配列から完全配列を決定する過程すなわちフィニッシングを支援することを目的とするソフトウエア、GenoFinisher、AceFileViewer、ShortReadManager を作成・公開してきており、完全決定ももはやそれほど困難な物では無くなりつつある。
決定したゲノム配列を、有効に活用するためには DNA 配列に注釈付け(アノテーション)を行う必要がある。アノテーションを付与するには、MiGAP や PGAP 等の機械的な自動アノテーションを利用するのが便利ではある。しかしながら、利用するオートアノテーションシステムによって、異なる注釈が付与されるのが常である。特に、タンパク質をコードする遺伝子の開始コドン選択はシステムによる差異が大きく、人の目に頼った修正作業が必要であるが、これは非常に手間がかかる作業である。
本発表では公開しているソフトウエア GenomeMatcher のアノテーション支援機能について紹介する。本機能は、開始コドン選択に特化した機能であり、(1) 時間のかかる処理をまとめて実行することで数秒単位の待ち時間を発生させない仕様であること、(2) 通常開始コドンの選択に用いられる以下のデータを(クリックして辿るのではなく)一括して俯瞰できる仕様であること、により開始コドン位置の決定のみに集中して取り組むことができる。参照できるデータは以下の通りである。(i)開始コドン候補とその直上流配列 (SD 配列の有無を検討できる)、(ii)近傍に存在している遺伝子の開始コドンおよび終止コドンとの相対的位置関係、(iii)類縁ゲノム中で最も相同な遺伝子での開始コドンの取り方(類縁ゲノムでの開始コドン選択の妥当性が判定できる)、(iv)どの部分がデータベース中のアミノ酸配列と相同性を示すか、(v)各トリプレットがどれほど稀であるかどうかの指標値、(vi)膜貫通ドメインやシグナル配列の存在を知る手がかりとなる疎水性の指標値。
また本支援機能では、2 つの異なる注釈結果を比較して、開始コドンが異なるもののみを見直す対象として自動的に抽出する機能がある。また、開始コドン位置を修正後、データを 1 行あたり 1 遺伝子となる表計算シートに適合する形式で出力することができる。表計算シート上で編集したデータは、付属のコンバーターツールを使用することで、DDBJ への登録に必要な形式、あるいは、NCBI の専用ツール Sequin が受け付ける tbl 形式へと一括変換することができる。
GenomeMatcher ホームページ:
http://www.ige.tohoku.ac.jp/joho/gmProject/gmhomeJP.html

annotation, GenomeMatcher, software

講演番号：3A37p04
講演日時、会場：3 月 28 日 14:33～ A 校舎 37 会場

抗真菌剤 FR901469 生産菌 No.11243 株の変異解析

Mutational Analysis of Fungus Strain No.11243, Producing Antifungal Antibiotic FR901469

○松井 真[1,2]、横山 達也[1,2]、根本 薫[2]、熊谷 俊高[2,3]、寺井 悟朗[2,4]、有田 正規[2,5]、油谷 幸代[2,6]、浅井 潔[2,6]、町田 雅之[2,6]、柴田 孝[1,2] ([1]アステラス製薬株式会社、[2]高機能遺伝子デザイン技術研究組合、[3](株)ファームラボ、[4](株)インテック、[5]国立遺伝研、[6]産総研)

○Makoto MATSUI[1,2], Tatsuya YOKOYAMA[1,2], Kaoru NEMOTO[2], Toshitaka KUMAGAI[2,3], Goro TERAI[2,4], Masanori ARITA[2,5], Sachiyo ABURATANI[2,6], Kiyoshi ASAI[2,6], Masayuki MACHIDA[2,6], Takashi SHIBATA[1,2] ([1]Astellas Pharma Inc., [2]TRAHED, [3]Fermlab Inc., [4]INTEC Inc., [5]Natl. Inst. Genet., [6]AIST)

微生物を工業的に利用する際には、目的物質の生産性の高い株や各種ストレスに耐性を持つ株など工業的製造時に有利な形質をもつ菌株を得ることを目的として様々な育種が行われる。育種方法の一つとして、紫外線処理等により微生物の突然変異を誘発し、目的の有用な形質を持った変異株をスクリーニングするという方法がある。しかし突然変異を用いた方法では遺伝子上に多数の変異がランダムに入るため、実際にどのような遺伝子変異が有用な形質に繋がっているのかについては不明なことが多い。

近年、次世代シークエンサーの登場などによる遺伝子解析技術の向上により、短期間で安価に微生物のゲノムをシークエンスすることが可能となった。ゲノムシークエンスにより変異株のゲノムの変異解析を行うことで、生産性の向上など有意な形質を発現させる遺伝子変異を特定することができれば、育種期間の短縮や有用な形質を組み合わせた株の創出など、ランダム変異に比べて育種の効率を大幅に向上させることができると予測される。

No,11243 株はスクリーニングによって見出された、抗真菌剤である FR901469 を生産する糸状菌である。本菌は FR901469 の生産性の向上を目的として紫外線を用いた突然変異による育種が行われており、複数の生産性向上変異株が得られている。本研究では、生産性の向上につながる遺伝子変異の特定や遺伝子解析手法の向上を目的として、No.11243 株の変異解析を行った。現在までに、No.11243 株の野生株及びその生産性向上変異株について次世代シークエンサーを用いてシークエンスを行ない、全ゲノム配列とアノテーション予測、ゲノム上の変異点の決定を行った。またその解析過程で、本菌は二倍体であり、また変異株育種の過程で一部の染色体の異数化が起こった可能性が示唆された。今後は特定された変異遺伝子群をエンリッチメント解析等を用いて解析し、生産性の向上に関わる遺伝子の推定を進めていく予定である。

mutational analysis, bioinformatics, natural products

講演番号：3A37p05
講演日時、会場：3 月 28 日 14:44～ A 校舎 37 会場

枯草菌における栄養状態に応じた新規 GTP 制御機構の解析

Analysis of New Regulation of GTP to Respond Nutrient State in Bacillus subtilis

○大坂 夏木[1]、多喜乃 雄太[1]、高田 啓[1]、兼崎 友[2]、吉川 博文[1] ([1]東京農業大学、[2]東京農大・ゲノム解析センター)

○NATSUKI OSAKA[1], YUTA TAKINO[1], HIRAKU TAKADA[1], YU KANESAKI[2], HIROHUMI YOSHIKAWA[1] ([1]Tokyo University of Agriculture, [2]Tokyo University of Agriculture Genome Analysis Center)

細胞内 GTP 濃度は栄養状態に応じて厳密に制御されており、特に栄養飢餓時には、GTP 濃度を低下させることが生存するための代謝の切り替えに重要な役割を担っている。その切り替えに関与する主要な機構として、微生物一般に保存されている緊縮応答がある。緊縮応答はアミノ酸欠乏などのストレスによって誘導され、その結果、警告物質 ppGpp が GTP から合成・蓄積される。ppGpp は GTP 生合成関連酵素を直接的に阻害するため、ppGpp の蓄積により細胞内 GTP 濃度が低下し、GTP 結合性転写制御因子のレギュロンなど多くのアミノ酸合成関連遺伝子の発現が促進される。

枯草菌において ppGpp 合成酵素遺伝子を欠失させた株（ppGpp^{0}株）は栄養飢餓時に GTP 濃度低下による代謝の切り替えが出来ず、最少培地において生育が阻害される。 また、富栄養培地における対数増殖期の生育は野生株と同等である一方で、定常期移行時期には顕著な生育阻害を示す。この生育阻害は GTP 合成を直接阻害する抗生物質 Decoyinine を添加することで抑圧されることから、正常な定常期移行には GTP 濃度の低下が必須であることが分かった。そこで本研究では ppGpp^{0}株を用いた栄養状態に応じた GTP 制御機構の解析を目的とした。

ppGpp^{0}株が最少培地で生育するための既知の抑圧変異は、*de novo* GTP 生合成に直接関与する遺伝子 *guaAB, gmk, codY*にのみこれまで報告されていた。(1)しかし、これらの抑圧変異株はメチオニン要求性を示す変異（*metB10*）を持つ ppGpp^{0}株から取得されており、単離にはメチオニンを加えた最少培地が用いられていた。そこでメチオニン要求性を持たない ppGpp^{0}株を用いて抑圧変異株を多数取得した。それらの中には冨栄養培地の定常期移行時期における生育阻害を抑圧する株としない株が存在し、栄養状態に応じた GTP 制御のメカニズムは複数存在することが分かった。これら 2 タイプの株において mapping 解析により変異箇所を同定したところ、ほとんどの株において既知の抑圧遺伝子以外に変異が見つかった。これら一連の抑圧変異株を、最少培地においてメチオニン添加の有無による生育を比較したところ、既知の抑圧変異株ではメチオニンの有無による生育の差が見られなかったのに対し、新規の抑圧変異株はメチオニン添加によって生育遅延、または再度生育阻害を示した。このことから、これまで *guaAB, gmk, codY* にのみ ppGpp^{0}株の抑圧変異が見つかった原因がメチオニンの影響にあることが考えられ、メチオニンの細胞内 GTP 濃度の制御における重要性が示唆された。

(1)Molecular Cell 48(2):231-41

metabolism

講演番号：3A37p06
講演日時、会場：3 月 28 日 15:05～ A 校舎 37 会場

ゲノム解析から見た乳酸菌の D-アミノ酸高生産機構

Genomic analysis of D-amino acids production mechanism of lactic acid bacteria

○加藤 志郎[1]、高橋 俊成[2]、老川 典夫[1,3] ([1]関大・先端機構、[2]菊正宗酒造、[3]関大・化学生命工)
○ Shiro KATO[1], Toshinari TAKAHASHI[2], Tadao OIKAWA[1,3] ([1]HRC, Kansai Univ., [2]Kiku-Masamune Sake Brewing Co., Ltd, [3]Fac. of Chem., Mat. and Bioeng., Kansai Univ.)

今日、原核生物のみならず哺乳動物を含む真核生物においても D-アミノ酸が多様な生理機能を担うことが明らかにされ、D-アミノ酸は広範な生命体における重要な構成要素であると考えられている。また、経口摂取した D-アミノ酸が生理作用を示す可能性も示唆されており、食品中の D-アミノ酸にも興味が持たれる。日頃私たちが摂る食品は様々な生物由来原料から成り、多様な D-アミノ酸を含有している。これらの D-アミノ酸は、1）原料となる生物に由来するもの、2）食品製造工程における加熱処理等により L-アミノ酸からの非酵素的ラセミ化により生じるもの、および 3）食品製造に用いられる微生物に由来するもの、等がある。これまでの研究から、日本酒等の食品発酵過程において乳酸菌が D-アミノ酸生産に大きく寄与することが明らかとなってきた。一方で、これらの乳酸菌における D-アミノ酸生産能は属間、種間のみならず株間においても大きく異なることが判明し、本研究では乳酸菌による D-アミノ酸高生産機構の解明を目標として、全ゲノム配列の解読を行っている。

本研究で対象とする乳酸菌は、酒造会社の酒蔵より単離された乳酸桿菌 *Lactobacillus sakei* であり、D-アミノ酸高生産株（LK-145 株）およびその対象となるコントロール株（D-アミノ酸低生産株、LT-13 株）の 2 株である。両株を MRS 液体培地で培養し、得られた菌体から抽出・精製したゲノム DNA をゲノム解析に供した。ゲノム解析には、Roche 社製の GS junior 454 および Life Technologies 社製の Ion PGM の 2 台の次世代シーケンサーを用いた。ショットガン解析および 8 kb span でのペアエンド解析を行い両株ゲノムのドラフト配列を構築した結果、両者のゲノム DNA は 1 つの scaffold に収束し、その推定ゲノムサイズはそれぞれ 1.95 Mbp（LK-145 株）および 1.94 Mbp（LT-13 株）であった。また、*L .sakei* LK-145 および *L .sakei* LT-13 はそれぞれ少なくとも 3 つ（33.4、6.2、4.2 kbp）または 1 つ（6.2 kbp）のプラスミドを保持することも明らかとなった。構築した両株ゲノム DNA のドラフト配列には 40~55 kbp 程度のギャップ領域（塩基配列未決定の領域）が残ったため、キャピラリーシーケンサーを用いてギャップ領域の解読を進めるとともに、ゲノムおよびプラスミド上にコードされる ORF の解析を進めている。本大会では、D-アミノ酸高生産株およびコントロール株のゲノム及びプラスミド上にコードされた遺伝子群のうち、推定 D-アミノ酸代謝関連酵素遺伝子を中心とした比較解析結果について報告する。

D-amino acid, lactic acid bacteria, genome analysis

講演番号：3A37p07
講演日時、会場：3 月 28 日 15:16～ A 校舎 37 会場

放線菌 *Streptomyces incarnatus* NRRL8089 のドラフトゲノムシーケンス

Draft genome sequence of *Streptomyces incarnatus* NRRL8089

○清水 瞳[1]、大島 健志朗[2]、服部 正平[2]、稲垣 賢二[1]、田村 隆[1] ([1]岡山大院・環境生命、[2]東大新領域)
○Hitomi SHIMIZU[1], Kenshirou OOSHIMA[2], Masahira HATTORI[2], Kenji INAGAKI[1], Takashi TAMURA[1] ([1]Grad. Sch., Okayama Univ., [2]Univ. Tokyo)

【目的】核酸系抗生物質は，抗ウイルス，抗マラリア，抗原虫活性を持つ有用な二次代謝産物であるが，その多くは生産性が低いために社会で活用されていない。核酸系抗生物質の工業的生産のために核酸系に特化したプラットホーム宿主の構築が望まれる。本研究では，核酸系構成物質シネフンギン生産菌 *Streptomyces incarnatus* NRRL8089 のゲノムシーケンス解析を行った。
【方法･結果】*S. incarnatus* から抽出した DNA よりイルミナ 454 用ライブラリを作成して, GS FLX+ でシーケンスを行った。715,821 断片の DNA を解読して 460,270,476 塩基の出力を得た。アセンブルソフト Newbler v2.8 による編集を行った結果, 解読した全配列を 76 contig からなる 8,878,066 bp ゲノムシーケンスに収束させることができた。ソフトウエア MetaGenomeAnnotator を用いてゲノム中に 8,266 個の ORF の存在を予測した。ORF から導かれたアミノ酸配列を BlastKOALA を用いて網羅的に相同性検索を行い, 全 ORF の約 3 割を KEGG 代謝マップ上にアサインすることが出来た。解糖系，TCA 回路，核酸代謝やアミノ酸代謝など一次代謝には大きな欠失は認められなかった。二次代謝に関わる遺伝子群として A 型インフルエンザ(N1H1)に有効なインドール系アルカロイド paspaline の生合成遺伝子群が同定された。シネフンギンはアデノシンとオルニチンが C-C 結合した構造であるが，尿素回路を構成するアルギナーゼの遺伝子が欠失しており，蓄積するアルギニンがシネフンギン生合成前駆体となることを示唆していた。

genome sequence, *Streptomyces incarnatus*, nucleoside antibiotics

講演番号：3A37p08
講演日時、会場：3 月 28 日 15:27～ A 校舎 37 会場

酸性河川より分離された鉄酸化細菌 *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* NE106G のゲノム構造

Genome structure of iron-oxidizing bacterium *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* NE106G isolated from acidic river

○福島 淳、東條 ふゆみ、浅野 亮樹、小林 弥生、志村 洋一郎、岡野 邦宏、宮田 直幸（秋田県立大学生資科）
○Jun FUKUSHIMA, Fuyumi Tojo, Ryoki Asano, Yayoi Kobayashi, Yoichiro Shimura, Kunihiro Okanoq, Naoyuki Miyata (Akita Prefectural University)

鉱山酸性排水や硫酸土壌、温泉などの硫酸酸性環境には一般的に鉄酸化細菌が存在し、環境での鉄の移動性に関与している。このような鉄酸化細菌のなかでは Proteobacteria (Acidithiobacillia 綱)に属する *Acidithiobacillus ferrooxidans* がよく研究され、金属の生物精錬等に使用されている。またこの反応はプリント基板などの産業廃棄物からの金属回収にも応用されようとしている。現在まで鉄酸化細菌は Nitrospira、Firmicutes、Actinobacteria や Proteobacteria に属するものが知られ、非常に多様な分類群に存在している。しかし実際に種として報告されているものは *A. ferrooxidans* 以外に *A. ferrivorans*、*Acidiferrobacter thiooxydans*、 *Thiobacillus prosperu*、 *Ferrovum myxofaciens* などと少数であるため、新規の鉄酸化細菌の探索と分離を行ってきている。その結果、既に Burkholderiales bacterium GJ-E10 を分離して、その完全ゲノム構造を報告した（昨年度大会）。今回は、より金属耐性の高い鉄酸化細菌である *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* NE106G を酸性環境より分離し、そのゲノム構造を解析した。ゲノム DNA はイルミナ社 MiSeq により 300 塩基 のペアエンド解析を行った。その後クオリティースクリーニングを行い、Hash-length を 201 として Velvet でアッセンブルを行った結果、contig 数は 74、N50 は 87,540、総塩基数は 3,688,575 という結果を得た。アノテーションの結果から推定される代謝経路、既に報告した Burkholderiales bacterium GJ-E10 ゲノムとの比較等についても報告する。

なお、本研究は平成 26 年度環境研究総合推進費補助金（3K133012、代表宮田直幸）の助成を受けて行った。

genome, bioleaching, Tamagawa river

講演番号：3A37p09
講演日時、会場：3 月 28 日 15:38～ A 校舎 37 会場

世界で最初に単離された塩化芳香族化合物分解菌 *Pseudomonas knackmussii* B13 のゲノム解析

Genome analysis of *Pseudomonas knackmussii* B13, the first bacterium known to degrade chloroaromatic compounds

○宮崎 亮（産総研）
○Ryo MIYAZAKI (AIST)

1974 年、グラム陰性細菌の *Pseudomonas knackmussii* B13（旧 *Pseudomonas* sp. B13）は、塩化芳香族化合物を唯一の炭素源として分解資化する細菌として世界で初めて単離された。この発見をきっかけに、世界中で様々な環境微生物による難分解性化合物代謝の研究が幕を開け、遺伝学から生化学、さらには分解菌を利用したバイオレメディエーション技術の研究が進められるようになった。我々は B13 株の発見から 40 年を機に、次世代シーケンサーと Optical Map を用いて本株の全ゲノム配列を de novo で決定した。ゲノム解析の結果、B13 株はクロロ安息香酸やアミノフェノールを始めとする様々な芳香族化合物の代謝経路を有することや、近縁の *Pseudomonas* 属細菌ゲノムには存在しない 20-100 kb 長の外来遺伝子領域を少なくとも 8 種有することなどが明らかとなった。また、B13 株由来の突然変異株 2 株を同時にリシーケンスして比較したところ、いくつかの一塩基置換とプロファージ領域の欠損が見つかり、これらが原因で B13 株の代謝能や生存性がドラスティックに変化することが判明した。

Pseudomonas, genomics, chloroaromatic compounds

講演番号：3A37p10
講演日時、会場：3 月 28 日 15:49～ A 校舎 37 会場

石油分解菌 Gordonia 属および Rhodococcus 属における alk 遺伝子系統解析

Phylogenetic analysis of alk genes in hydrocarbon degrading Gordonia spp. and Rhodococcus spp.

○堀口 悠、向 真樹、Dinesh Adhikari、荒木 希和子、久保 幹（立命館大）
○Yuu HORIGUCHI, Masaki MUKAI, Adhikari Dinesh, Kiwako ARAKI S., Motoki KUBO (Ritsumeikan Univ.)

【背景・目的】

現在、土壌の石油バイオレメディエーションには石油分解菌として *Gordonia* 属や *Rhodococcus* 属などの好気性菌が主に用いられている。石油分解菌の多くは炭化水素の初発酸化に関わるアルカンヒドロキシラーゼをコードする *alk* 遺伝子を有しており、土壌や海洋に幅広く存在することが知られている。特に *Gordonia* 属や *Rhodococcus* 属は、難分解性のシクロアルカンの分解も可能であり、特異的な *alk* 遺伝子配列（*alkB* GT, *alkB* R2）を有していることが確認されている。今後、土壌環境への負荷の少ない石油汚染浄化技術としてバイオレメディエーションがより重要視されるにあたり、*alk* 遺伝子による系統的理解は技術の発展に不可欠なものとなると考えられる。

そこで今回、菌種による遺伝子変異について着目し、石油分解菌の保有する *alk* 遺伝子について系統解析を行った。

【方法・結果】

alk 遺伝子を保有している *Gordonia* 属、*Rhodococcus* 属を含めた好気性石油分解菌、通性嫌気性石油分解菌として *Pseudomonas* 属、コントロールとして *Gordonia* 属に対して 16S rRNA 遺伝子のシーケンス解析を行い系統樹を作成した。また、*alk* 遺伝子の塩基配列情報を取得し、相同性を解析して系統樹を作製した。その結果、16s rRNA 遺伝子, *alk* 遺伝子で *Gordonia* 属、*Rhodococcus* 属、*Pseudomonas* 属はそれぞれ独立したクラスターを形成し、種の違いにより *alk* 遺伝子が異なっていた。

alkane hydroxylase, *Gordonia* spp., *Rhodococcus* spp.

講演番号：3A37p11
講演日時、会場：3 月 28 日 16:10～ A 校舎 37 会場

高温メタン発酵微生物群集のメタゲノム解析

Metagenomic analysis of thermophilic methanogenic microflora

○堤 万穂[1]、石井 俊一[2]、高妻 篤史[1]、上野 嘉之[3]、渡邉 一哉[1] ([1]東京薬科大学、[2]J. Craig Venter Institute、[3]鹿島技術研究所)
○ Maho TSUTSUMI[1], Shunichi ISHII[2], Atushi KOUDUMA[1], Yoshiyuki UENO[3], Kazuya WATANABE[1] ([1]Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences, [2]J. Craig Venter Institute, [3]KAJIMA technical research institute)

（目的）メタン発酵では、加水分解，酸発酵，メタン生成などを担う微生物から構成される微生物群集により有機物が分解され、メタンが生成される。これまでに、16SrRNA 遺伝子や一部の機能遺伝子をターゲットとした分子生態解析が行われ、メタン発酵微生物群集を構成する微生物種が明らかにされてきた。しかしながら，個々の微生物の代謝や機能については依然として不明な部分が多い。本研究では，連続式メタン発酵槽で機能している高温メタン発酵菌群を構成する微生物の機能やメタン生成メカニズムを明らかにすることを目的に、ショットガンメタゲノム解析を行った。
（方法）高温固定床式メタン発酵槽（55℃）に嫌気性消化汚泥を植菌し、人工培地（酢酸が主要な炭素／エネルギー源）を連続的に流入させ，メタン発酵菌群を集積した。発酵槽には固定床として炭素繊維不織布を充填し、バイオフィルムを形成させた。酢酸の分解とメタンガス生成が安定した状態で固定床上のバイオフィルムおよび発酵液中の浮遊微生物から DNA および RNA を抽出し、Illumina 社の Hiseq2000 を使用してショットガンシーケンスを行った。得られたリードをもとにコンティグを作成し、GC 含量とゲノム重複度をもとにして個々の微生物のポピュレーションゲノム（bin-genome）を構築した。この bin-genome に，mRNA 由来のリードをマッピングすることにより，主要な代謝系遺伝子の相対発現量を算出した。
（結果および考察）有機物負荷速度(OLR)の異なる 2 条件（D122: 6 g-COD/L/d ; D200; 32 g-COD/L/d）で菌体を採取した。DNA の配列情報をもとに、D122 サンプルから 39 種類の bin-genome が構築された。これらの bin-genome は、バイオフィルムにおける総ポピュレーションの約 98%を構成していた。メタン生成菌は，1 種類の酢酸資化性メタン菌(*Methanosarcina*)と 3 種類の水素資化性メタン菌(*Methanothermobacter*)と同定され，主にバイオフィルムに存在していた。バクテリアでは *Coprothermobacter*，*Anaerobaculum*，*Clostridium* が主要であった。一方，D200 においては構築される bin-genome の数とその割合が変化しており，OLR によって菌叢が変化することが示された。また、バイオフィルムにおいてメタン生成に関わる遺伝子群が高発現していることが確認され，メタンは主にバイオフィルムにおいて生成しているものと考えられた。さらに、バクテリアの鞭毛や機能未知タンパクをコードすると思われる遺伝子群も高発現しており、これらがどのようにメタン発酵に関与するかについて興味が持たれた。現在、さらに詳細な発現遺伝子解析を進めている。

Metagenomics, Metatranscriptomics, Methanogenesis

講演番号：3A37p12
講演日時、会場：3 月 28 日 16:21～ A 校舎 37 会場

洗濯槽の臭気の実態解析

Laundry drum odor analysis

○森 圭輔[1]、大石 真嘉[1]、中川 未紗[1]、城 隆太郎[2]、海老 敬行[2]、神藤 宏明[1]、岡本 貴弘[1] ([1]ライオン（株）ファブリックケア研究所、[2]ライオン（株）分析技術センター)
○Keisuke MORI[1], Masayoshi OISHI[1], Misa NAKAGAWA[1], Ryutaro JO[2], Takayuki EBI[2], Hiroaki SHINDO[1], Takahiro OKAMOTO[1] ([1]Fabric Care Reserch Laboratories, Lion Corporation, [2]Analytical Technology Reserch Center, Lion Corporation)

【背景・目的】

近年の衛生意識の高まりから、生活者は、洗濯をする際に「目に見える汚れを落とす」だけでなく、「ニオイや菌まで落としたい」と感じている。我々は、専業主婦(n=1113)を対象とした洗濯行動に関する調査を行い、家の中で不快な臭気が発生する場所の一つとして洗濯槽が挙げられたこと、また「洗濯槽が汚れていることが洗濯物のニオイのもとになる」など、洗濯槽の臭気に不満を持つ生活者が多いことを明らかとした。一方で、新品の洗濯機を生活者に供与、毎月訪問し、洗濯槽裏を観察したところ、菌増殖に伴いバイオフィルムが発生していることを突き止めている。さらに一般家庭の洗濯機 10 台を回収後解体したところ、洗濯槽裏には菌及び多糖等を含んだバイオフィルムが形成されていることを明らかにしてきた。

そこで、洗濯槽の臭気とバイオフィルムの関連性に着目し、まず臭気の実態を把握することを目的とし解析を行った。

【方法・結果】

洗濯槽の臭気の実態を把握するために、使用年数 2～15 年の洗濯機 13 台を選定し、各家庭の洗濯槽の気相成分サンプリングを行った。洗濯槽中の臭気を捕集するために、固相マイクロ抽出(Solid Phase Micro Extraction：SPME)を用いた。SPME ファイバーは DVB/CAR/PDMS を選択した。洗濯機底部に 6 時間静置し、臭気を捕集後、GC-MS 法(カラム：InertCap for Amines (0.32 mmI.D. × 60 m), イオン化：電子イオン化法, 検出範囲：m/z=29～300)により、気相成分の解析を行った。その結果、使用年数、洗濯機型、使用履歴にかかわらず、ジメチルスルフィド(m/z=62,47)、ジメチルジスルフィド(m/z=94,79)といった成分を検出した。

さらに専門パネラーによる洗濯槽の臭気の官能評価より、その臭気は野菜の腐敗臭が主であり、ジメチルスルフィド・ジメチルジスルフィド等の硫黄化合物が支配的であった。ジメチルスルフィド等の気相成分は GC-MS 法の解析と相関する結果であり、バイオフィルム中の細菌が臭気発生の一因となっていると考えられる。

washing mashine, laundry drum, odor analysis

講演番号：3A37p13
講演日時、会場：3 月 28 日 16:32～ A 校舎 37 会場

次世代シークエンサーを用いた洗濯槽バイオフィルムの細菌叢解析

Analysis of bacterial flora in laundry drum biofilm by Next-generation sequencer

○城 隆太郎[1]、海老 敬行[1]、森 圭輔[2]、大石 真嘉[2]、埴原 鉱行[1]、須田 亙[3]、服部 正平[3]、岩崎 英明[1] ([1]ライオン（株） 分析技術センター、[2]ライオン（株） ファブリックケア研究所、[3]東京大学大学院 新領域創生科学研究科)

○Ryutaro JO[1], Takayuki EBI[1], Keisuke MORI[2], Masayoshi OISHI[2], Hiroyuki HANIHARA[1], Wataru SUDA[3], Masahira HATTORI[3], Hideaki IWASAKI[1] ([1]Analytical Technology Research Center, Lion Corporation, [2]Fabric Care Research Laboratories, Lion Corporation, [3]University of Tokyo, Graduate School of Frontier Sciences)

【目的】

前報で述べたように、多くの生活者に不快感を与える洗濯槽から発生する臭気原因物質の一つが、ジメチルスルフィド等の硫黄化合物であることを当社研究を通じて明らかにした。長年使用した洗濯槽の裏面側面には、菌及び多糖等を含んだバイオフィルム様の物質が付着することが知られており、このことから、洗濯槽から発生する臭気の一部は、このバイオフィルムからの放出の寄与が高いことが推測される。特に硫黄化合物や窒素化合物はバイオフィルム中の細菌の関与が大きいと考えられるが、これまで洗濯槽バイオフィルムに存在する細菌を明らかにした報告は少ない。

そこで、我々は洗濯槽バイオフィルムと不快臭との関連の解明を目指し、手始めに、洗濯槽バイオフィルムに存在する細菌の実態を把握すべく、次世代シークエンサーを用いた細菌叢解析を行った。

【方法】

洗濯機 23 台（使用年数 1～15 年）より洗濯槽裏側側面に付着したバイオフィルムを採取し、ビーズ破砕によりバイオフィルム中の菌叢の DNA を抽出した後、16S rDNA v1-2 領域を PCR 増幅し、454 GS FLX プラットフォームによるシークエンシングに供し、洗濯槽バイオフィルムの細菌叢解析を行った。

【結果および考察】

23 台の洗濯機から回収したバイオフィルムに対し上記の DNA 抽出操作を行った結果、15 サンプルより 16S rDNA v1-2 領域の増幅が確認された。

これらのサンプルから得られた DNA 配列情報を、1 サンプル当たり 2,300 リードの 16S 配列を用いた OTU 解析に供した結果、全 15 サンプルから *Mycobacterium* 属の菌が検出され、そのうち 6 サンプルで同属が最優勢であることを確認した。先行研究により、*Mycobacterium* 属は水周りに多く存在することが知られている。さらに、*Sphingomonas* 属、*Brevundimonas* 属、*Methylobacterium* 属などの菌も高頻度に検出されたが、これら菌も水周りに存在することが周知であることから、洗濯槽中に存在する菌の大半は、衣類に付着したヒト由来の菌ではなく環境由来であることが示唆された。

Bacterial flora, Next-generation sequencer, Laundry drum

講演番号：3A37p14
講演日時、会場：3 月 28 日 16:43～ A 校舎 37 会場

圃場環境下でのダイズ根圏微生物叢及び微生物活性の変動
Changes in the bacterial community of soybean rhizosphere in a field
○杉山 暁史[1]、上田 義勝[1]、高瀬 尚文[2]、矢崎 一史[1] ([1]京都大生存研、[2]京都学園大バイオ環境)
○Akifumi SUGIYAMA[1], Yoshikatsu UEDA[1], Hisabumi TAKASE[2], Kazufumi YAZAKI[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Kyoto Gakuen Univ.)

植物と根圏微生物は密接な関係を持っており、植物側からのシグナルとして根分泌物が重要な役割を担うと考えられている。生育過程を通した植物と根圏微生物の相互作用を解析するため、京都府亀岡市の京都学園大学実験圃場にてダイズ（Glycine max cv. Fukujishi）を栽培し、開花前、種子成熟期前の根圏土壌及びバルク土壌を採取した。採取した土壌は植物根や小石等を篩により除去した後、1)DNA 抽出、2)Biolog ECO Plate による Community level physiological property の測定、3)土壌窒素固定活性の測定に用いた。Biolog Plate において、土壌微生物による炭素源資化性の指標となる AWCD（Average well color development）は生長段階を通じてバルク土壌よりも根圏土壌の方が高い値が得られた。しかし、Winogradsky 培地で 1 週間培養したバルク土壌及び根圏土壌中の窒素固定細菌の窒素固定活性をアセチレン還元法により測定したところ、窒素固定活性は栄養生長期から生殖生長期（R6 期）にかけて根圏土壌よりもバルク土壌の方が高いことが示された。

抽出した DNA を用いて 16S rRNA をターゲットした微生物叢の解析を行った。GS junior により得られた 62,828 配列を Mothur を用いて解析したところ、バルク土壌とは異なり、根圏では生育過程により微生物叢が大きく変化することが示された。門レベルでも根圏微生物叢の変動が認められ、Proteobacteria は成熟期にかけて相対存在度が高まること、Acidobacteria や Firmicutes は逆に相対存在度が低下することが示された。さらに、属レベルでの解析では特に Bacillus 属、Bradyrhizobium 属、Rhizobium 属の細菌が生育過程依存的に増加し、Bacillus 属は栄養生長期から生殖生長期にかけて根圏での相対存在度が最も高いことが示された。バルク土壌とは異なり、根圏土壌において生育過程を通じて多くの細菌類の存在割合が大きく変動していたことは土壌の環境要因や気象条件の変化のみならず、植物根からの影響が根圏微生物に与える影響が大きいことが示唆される。さらに、18s rRNA をターゲットとして土壌の菌類の解析も行ったところ、生育ステージを通した菌類の変動は Phylum レベルでは生じないことが示された。OTU（operational taxonomic unit）レベルでは 280TU がバルク土壌と根圏土壌での相対存在度に有意差が認められ、40TU が生育段階により変動することが示された。以上の結果から、圃場環境で生育させたダイズの根圏微生物叢は特に細菌類の変動が大きいことが明らかになった。現在、圃場環境下でのダイズの代謝物と遺伝子発現の変動を解析している。

rhizosphere, soybean, amplicon sequence

講演番号：3A37p15
講演日時、会場：3 月 28 日 16:54～ A 校舎 37 会場

農産物からの効率的な糸状菌検出に向けた研究

Development of the efficient extraction for filamentous fungi from the agricultural products.

○鈴木 忠宏、岩橋 由美子（農研機構食総研）
○Tadahiro SUZUKI, Yumiko IWAHASHI (NARO NFRI)

背景･目的：農産物中には様々なカビが菌糸及び胞子などの形態で混入している。カビの中には人畜に有害な二次代謝産物であるマイコトキシンを産生する菌も存在するが、その存在を確認するためには単離培養を行うか特異的な遺伝子増幅を行う必要がある。特に遺伝子増幅手法は培養を経ないため、培地成分の影響を受けず、検出に要する時間も短いため有用な手法となっている。しかし、遺伝子増幅を実施するには DNA 試料の調製工程を経る。この工程でカビの遺伝子抽出に問題がある場合には、遺伝子増幅による検出が出来ない。そのため、一連の試験において標的となるカビの混入実態を捉える決定的なデータは得られない。本研究ではマイコトキシン産生菌の検出に際してこうした問題が起こる可能性の有無を検討するため、メタゲノム解析を用いて各種試料より抽出した DNA より菌叢を明らかにした。

結果･考察：籾米、玄米、糠等にそれぞれ *Aspergillus oryzae* RIB40 の胞子溶液を加え、酵素反応とガラスビーズによる細胞破砕を行い簡易抽出した試料溶液をサンプルとし、真菌を始めとする生物全般の検出に利用可能な rDNA 近傍の ITS プライマーセットにより遺伝子増幅産物を獲得した。これを基に菌叢解析を実施した結果、総検出数に占める *Aspergillus* 属菌の割合は最大でも 40%程度となった。RIB40 のみから調製した試料と解析結果を比較すると、籾米以外のサンプルでは *Aspergillus* 属菌の検出数が抑えられた。特に糠試料では検出率が 1%を下回り、検出数も極めて低くなった。このことから、試料の状態が混入するカビの検出数及び検出率に大きな影響を及ぼしている事が示唆された。また、菌叢解析ではコメの品種や糠試料の数が限定されていたため、品種間差の影響も考えられた。そこで複数のコメ品種を用意して、それぞれの玄米から白米、糠を調製して同様の DNA 調製を実施した。ITS プライマーを利用した遺伝子増幅の結果、ある程度の品種間差が認められた。同時に RIB40 株も有しているマイコトキシンの 1 種であるアフラトキシンの産生遺伝子 aflR のプライマーセットを用いて遺伝子増幅を実施した結果、白米及び糠試料では著しく検出効率が低下した。これらの結果から、コメに関連する試料から真菌 DNA を検出する際には試料の状態及び品種が影響しており、正確な検出結果を得るためには十分な試料調製が必要であることが示唆された。

metagenome analysis, filamentous fungi, rice

講演番号：3A37p16
講演日時、会場：3 月 28 日 17:15～ A 校舎 37 会場

シロアリ腸内原生生物に細胞表面共生する *Symbiothrix dinenymphae* の 1 細胞ゲノム解析
Single-cell genome sequencing of *Symbiothrix dinenymphae*, an ectosymbiont of termite gut protist

○雪 真弘[1]、桑原 宏和[2]、新谷 政己[3,4]、伊澤 和輝[2]、本郷 裕一[2,4]、大熊 盛也[1,4]（[1]理研 CSRS、[2]東工大・院生命理工、[3]静大・院工、[4]理研 BRC・JCM）
○Masahiro YUKI[1], Hirokazu KUWAHARA[2], Masaki SHINTANI[3,4], Kazuki IZAWA[2], Yuichi HONGOH[2,4], Moriya OHKUMA[1,4] ([1]RIKEN, CSRS, [2]Tokyo Inst. Tech, [3]Shizuoka Univ, Fac. Eng, [4]RIKEN, BRC-JCM)

【目的】シロアリの腸内には多種多様な原生生物（単細胞真核生物）と細菌が共生している。さらに、原生生物の細胞内、細胞表面にも細菌が共生し、多重共生系を構築している。しかし、これらの共生細菌の多くは難培養性であるため、一部の種を除き機能はほとんど解明されていない。本研究では、シロアリ腸内で数的優占種の一つでありながら未培養で機能未知であった、原生生物 *Dinenympha* の細胞表面に共生する Bacteroidales 目細菌 *Candidatus* Symbiothrix dinenymphae を 1 細胞ゲノム解析し、共生系における役割を解明することを目的とした。
【方法】ヤマトシロアリの腸内細菌をセルソーターで 1 細胞毎に分離した。分離した細菌を Phi29 DNA ポリメラーゼで全ゲノム増幅し、これを鋳型に 16S rRNA 遺伝子を PCR によって増幅した。16S rRNA 遺伝子のシークエンス結果を Phred スコアで評価し、1 細胞から増幅された可能性が高いサンプルを選択した。得られた 1 細胞の全ゲノム増幅サンプルについて、ペアエンドとメイトペアライブラリーを作製し、MiSeq によりゲノムシーケンスを行った。アッセブルは SPAdes で行い、得られたコンティグは Blast 解析、GC 含量、4 塩基頻度の主成分分析を行い選別した。Blast、RAST、InterProScan を組み合わせてアノテーションを行った。
【結果と考察】1 細胞の *S. dinenymphae* から全ゲノム増幅したサンプルを用いてゲノム解析した結果、総塩基長約 3.5Mb となる 346 本のコンティグが得られ、ゲノムカバー率は 82%と推定された。アノテーションの結果、ほぼ全てのアミノ酸、核酸、細胞壁成分の合成経路を保持しており、代謝経路としては解糖系、TCA 回路、ペントースリン酸経路を有し、最終発酵産物として酢酸を作ることが示された。また、木質バイオマス分解に関係する酵素としてセルロースを分解するエンドグルカナーゼ遺伝子を有しており、キシラナーゼ、ガラクトシダーゼ、マンノシダーゼ、アラビノフラノシダーゼ等のヘミセルロース分解酵素遺伝子を多数有していた。さらに、典型的なヒドロゲナーゼはないものの、古細菌の heterodisulfide reductase に相同的なタンパク質を保持していることから、水素消費の可能性が示された。これらの結果から、*S. dinenymphae* が糖質加水分解酵素群により木質バイオマスを前処理し、さらに原生生物の発酵で生じる水素を消費することによって、原生生物による木質バイオマスの分解利用の促進に寄与しているという共生系が推察された。

single-cell, symbiosis, termite

講演番号：3A37p17
講演日時、会場：3 月 28 日 17:26～ A 校舎 37 会場

梅ポリフェノールの経口投与によるマウス腸内細菌叢改善効果

Effects of polyphenols from Prunus mume on gut microbiota in mice

○島田 良美、香川 昴雅、晋家 崇史、堀西 朝子、尾崎 嘉彦、芦田 久（近畿大生物理工）
○Yoshimi Shimada, Takamasa Kagawa, Takafumi Fuke, Asako Horinishi, Yoshihiko Ozaki, Hisashi Ashida (Fac. of Biology-Oriented Science and Technology, Kinki Univ.)

【背景】

梅干し加工の際に生成する梅酢は高濃度の食塩を含むため用途が限定され、高度な利用はおこなわれていないのが現状である。梅酢から吸着樹脂を用いて脱塩精製された梅酢ポリフェノール原末（UP）には、クマル酸、カフェ酸、フェルラ酸およびその糖誘導体や、多糖・オリゴ糖などが含まれており、新たな機能性食品素材として注目されている。これまでに UP にはいくつかの悪玉菌に対して生育抑制効果があることが報告されている。そこで、演者らが日和見菌および善玉菌の生育に対する効果を調べたところ、日和見菌に対しては生育抑制効果が、また一部の善玉菌に対しては生育促進効果が認められた。*in vivo* で同様の効果が発揮されれば腸内細菌叢の改善につながると考え、マウスへ経口投与したのち腸内細菌叢を解析した。

【方法】

BALB/c マウス（メス、9 週齢）13 頭を 3 群に分け、AIN-93M（コントロール飼料）、あるいはこれに 4%UP または 2%ラフィノースを添加したものを自由摂取させ、2 週間飼育した。飼育期間中の体重変化および食餌量を計測し、最終日に盲腸を採取した。盲腸内容物から全 DNA を抽出し、16S rRNA 遺伝子の V4 領域を次世代シーケンサーMiSeq で配列決定して、腸内細菌叢解析を行った。

【結果と考察】

各群の最終日における体重に有意差は認められなかったが、食餌量と盲腸重量はコントロール群と比べて UP 群で有意に増加していた（$p<0.05$）。腸内細菌叢については、UP、ラフィノース両群で、未分類 Lachnospiraceae 科、未分類 Bacteria、*Anaerotruncus* 属の割合が低下していた。UP 群では、*Oscillospira* 属、未分類 Ruminococcaceae 科の割合も低下しており、Clostridiales 目、*Ruminococcus* 属、Mogibacteriaceae 目の割合が増加していた。すなわち、インドールや硫化水素など腐敗臭生成菌の減少と酢酸生成菌の増加が顕著に認められたことから、UP 摂取により腸内発酵が促進されて酸性度が高まり、善玉菌の生育に有利になることが示唆された。

【謝辞】

本研究は地域イノベーション戦略支援プログラム事業の支援を受けた。

polyphenol, prebiotics, gut microbiota

講演番号：3A37p18
講演日時、会場：3 月 28 日 17:37～ A 校舎 37 会場

Asian Microbiome Project phase 2: アジア人の腸内細菌叢の加齢に伴う変化
Asian Microbiome Project phase 2: Age-related changes in gut microbiota in Asian population

○山本 麻寿紗[1]、東 佳那子[1]、百田 理恵[1]、本田 倫子[1]、渡辺 幸一[2]、Shirchin Demberel[3]、Sunee Nitisinprasert[4]、Park Yong Ha[5]、Endang S. Rahayu[6]、Fa-Zheng Ren[7]、Yuan Kun Lee[8]、園元 謙二[1]、中山 二郎[1] ([1]九州大学、[2]ヤクルト中央研究所、[3]モンゴル州立農業大学、[4]カセサート大学、[5]嶺南大学、[6]ガジャ・マダ大学、[7]中国農業大学、[8]シンガポール国立大学)
○ Azusa YAMAMOTO[1], Kanako HIGASHI[1], Rie MOMODA[1], Noriko HONDA[1], Kouichi WATANABE[2], Demberel Shirchin[3], Nitisinprasert Sunee[4], Yong Ha Park[5], Rahayu Endang S.[6], Ren Fa-Zheng[7], Lee Yuan Kun[8], Kenji SONOMOTO[1], Jiro NAKAYAMA[1] ([1]Kyushu Univ., [2]Yakult Central Institute, [3]Mongolian State University of Agriculture, [4]Kasetsart Univ., [5]Yeungnam Univ., [6]Gadjah Mada Univ., [7]China Agric. Univ., [8]National Univ.of Singapore)

【目的】ヒトの腸内細菌叢は食と健康を繋ぐ重要なインターフェースであり、多様な食文化の根付くアジア人の腸内細菌叢とその健康に及ぼす影響は大変興味深いと思われる。そこで、アジアにおける食と腸内細菌と健康の関係を明らかにすべく、Asian Microbiome Project (AMP)が設立され、アジアの国々を対象として研究が行われている。本研究では、被験者の年齢に着目し、アジア人の腸内細菌叢の加齢に伴う変化について解析を行った。
【方法・結果】対象としたのは中国、インドネシア、韓国、モンゴル、タイの 5 カ国の、2 歳から 90 歳の児童、成人、高齢者（計 488 名）である。被験者から糞便を採取し、全細菌のゲノム DNA を抽出した。16S rRNA 遺伝子配列の V6-V8 領域を、バーコードタグ付きユニバーサルプライマーを用いて網羅的に増幅させ、得られた産物を次世代シーケンサー(454 FLX titanium)による配列解析に供した。得られた配列に対して、解析ソフトウェア QIIME を用いて、キメラチェック及び 97%以上の配列相同性で Operational Taxonomic Units (OTUs)の作成を行ったところ、合わせて 4,228,180 本、サンプルあたり平均 8,636 本の配列が得られた。さらに系統解析を行い、各サンプルの細菌組成データを得た。続いて加齢に伴う各細菌群の変化について明らかにすべく、スペアマンの順位相関解析を行った。門レベルでは Proteobacteria が加齢に伴い増加し、Actinobacteriea が減少する傾向が見られた。科レベルでは、Enterobacteriaceae($\rho = 0.2254^{**}$)、Clostridiaceae($\rho = 0.1257^{**}$)、Peptostreptococcaceae($\rho = 0.1066^{*}$)は加齢に伴い有意に増加するのに対し、Bifidobacteriaceae($\rho = -0.3349^{**}$)、Coriobacteriaceae($\rho = -0.1289^{**}$)は有意に減少することが明らかとなった($^{**}p < 0.05$, $^{*}p < 0.01$)。また Prevotellaceae、Veillonellaceae も減少する傾向が見られた。続いて多様度解析を行った。Observed species と年齢との相関を調べたところ、児童から成人にかけては多様性が増加するのに対し、成人から高齢者にかけては減少する傾向が見られた。主成分分析及びクラスタリングを行ったところ、アジア人の腸内細菌叢は Bifidobacteriaceae と Bacteroidaceae を多く持つ BB-type と、Prevotellaceae を多く持つ P-type に分けられることが分かった。しかしこれらのクラスターは高齢者でははっきりとは見られず、クラスターの確かさを表す Prediction strength は 児童 0.94、成人 0.89、高齢者 0.75 と減少する傾向が見られた。これらの変化の原因及び影響は大変興味深く、より詳細な解析が望まれる。

gut microbiota, 16S rRNA, aging

講演番号：3A41a01
講演日時、会場：3 月 28 日 09:00～ A 校舎 41 会場

生体膜の流動性
Fluidity of biomembrane

○正木 良和、西川 ちひろ、楠部 真崇、西本 真琴（和高専）
○Yoshikazu Masaki, Chihiro Nishikawa, Masataka Kusube, Makoto Nishimoto (NIT,Wakayama College)

1. 諸言
   生体膜は周囲の温度や圧力の影響を大きく受けることが知られており、それらの環境に合わせた生体膜流動性を保つことで生物の生命維持をはかっている。生体膜流動性は含まれる脂質の種類によって異なることから、本研究では疎水鎖長と親水基の構造が異なる脂質二分子膜流動性を調査するため Dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC), Distearoylphosphatidylcholine (DSPC) 及び Dipalmitoylphosphoethanolamine (DPPE) 二分子膜について時間分解蛍光異方性測定を行った。
2. 実験
   1.0 mmol kg^{-1} の脂質水溶液に蛍光プローブとして 1-[4-(trimethylamino)phenyl]-6-phenyl-1,3,5-hexatriene (TMA-DPH)を所定の濃度となるように添加し、Bangham 法によりリポソーム溶液を調製した。脂質には、DPPC, DSPC 及び DPPE を使用した。HORIBA 社製の FluoroMax-4 Spectrofluorometer を用いて、λ_c=370 nm, λ_{em}=430 nm, 温度範囲 20－95 ˚C で時間分解蛍光偏光解消測定を行った。
3. 結果と考察
   DPPC, DSPC 及び DPPE での蛍光異方性値の温度依存性の結果は、DPPC, DSPC 及び DPPE の異方性値が 42.7°C, 54.7°C 及び 62.7°C で急激に減少した。これらの温度は各脂質の主転移温度に相当し、これらの温度で脂質がゲル相から液晶相に相転移を起こしたと考えられる。これらの結果から、液晶相での各脂質のオーダーパラメーター及び回転拡散係数を算出した。各脂質のオーダーパラメーターの値は温度依存的に減少した。オーダーパラメーターは蛍光プローブの傾き具合を示すパラメーターであり、脂質膜の相状態の秩序性を表す。このパラメーターは値が大きいほど秩序立っており、小さいほど無秩序だと言える。また、各脂質の回転拡散係数は温度依存的に上昇した。回転拡散係数は蛍光プローブの回転の速さを示す値であり、脂質膜の運動性を表す。この値は大きいほど回転速度が速く、膜の運動が激しいことを示し、値が小さいほど回転速度は遅く、膜の運動は緩やかであることを示す。従って各脂質の相状態は温度依存的に運動性が高くなり、無秩序になっていると言える。さらに脂質の種類によって、これらの結果に差が出た。オーダーパラメーターでは、DPPE が DPPC, DSPC に比べ温度依存性が低く、回転拡散係数では、DSPC が DPPC, DPPE に比べ温度依存性が高くなる傾向が見られた。

time-resolved fluorometry, lipid membrane, TMA-DPH

講演番号：3A41a02
講演日時、会場：3 月 28 日 09:11～ A 校舎 41 会場

好冷菌の生体膜流動性
Fluidity of psychrophile biomembrane
○岩本 直樹、西川 ちひろ、西本 真琴、楠部 真崇 (和高専)
○Naoki Iwamoto, Chihiro Nishikawa, Makoto Nishimoto, Masataka Kusube (NIT, Wakayama College)

1. 緒言

生体膜は生育環境に適した組成を持ち、生体膜流動性を保つことで生命を維持している。例えば一般に低温下で生息している生物は多価不飽和脂肪酸を多く有することで生体膜流動性を保ち低温下での生息が可能となると考えられている。しかし、多価不飽和脂肪酸と生体膜流動性の関係についての詳細は明らかになっていない。そこで本研究では、常温下で生息する*Escherichai coli* DH5α (*E.coli*) 及び好冷菌である*Colwellia psychrotropica* 34H (34H)の生体膜流動性を時間分解蛍光測定により調査した。得られた異方性値より、オーダーパラメーター *S*及び回転拡散係数 D_wを算出することで、生体膜組成と生体膜流動性との関係を比較・検討した。

2. 実験

試料には 14−40 °C で培養した *E.coli* 及び 34H よりリン脂質を抽出し、バンガム法により脂質二分子膜を調製したものを用いた。蛍光プローブには 1, 6-diohenyl-1, 3, 5-hexatriene (DPH)を使用した。時間分解蛍光測定には HORIBA 社製の FluoroMax- 4Spectrofuluorometer を用いた。λ_c=370 nm, λ_{em}=430 nm, 10−80 °C の温度範囲で時間分解蛍光測定を行った。

3. 結果

各温度で培養したバクテリア由来の脂質二分子膜の異方性値から*S*及びD_wを算出した。ここで、*S*及びD_wはそれぞれ蛍光分子の傾きと回転速度の指標である。*E.coli*の*S*値は温度の上昇と共に低下した。一方、D_w値は増加する傾向が見られた。これは、蛍光分子が大きく傾き、さらに回転速度が増していることを意味する。従って、温度が高くなるとリン脂質間の距離が広がり、さらに、アシル鎖の回転速度が速くなり結果として膜秩序の低下が起こったと考えられる。さらに、*S*およびD_wは培養温度に依存しており培養温度が高くなるにつれ各値も高温にシフトする傾向が見られた。これは、培養温度が異なることでリン脂質組成が変化したためだと考えられる。34H由来の生体膜も同様の傾向が得られた。また、*E.coli*の*S*及びD_w値は培養した温度でみてみると、ほぼ同様の値を示し、*E.coli*において*S*値は0.5, D_w値は220 μs^{-1}である。つまり、*E.coli*由来二分子膜の適度な流動状態ではこれらの値をとる可能性がある。一方、34Hにおいては*E.coli*と異なる値をとることが分かった。

time-resolved fluorometry, biomembrane, Unsaturated fatty acid

講演番号：3A41a03
講演日時、会場：3 月 28 日 09:22～ A 校舎 41 会場

生体膜流動性に与える DHA および EPA の影響

Effects of DHA and EPA to fluidity of biomembrane

○西川 ちひろ、正木 良和、岩本 直樹、西本 真琴（和高専）
○Chihiro Nishikawa, Yoshikazu Masaki, Naoki Iwamoto, Makoto Nishimoto (NIT, Wakayama College)

1. 諸言

生物は生命維持のために、その環境に合った生体膜組成を持ち、最適な膜流動性を保つことが知られている。中でも、深海中の生物は低温下での生命維持のため Docosahexaenoic acid (DHA) および Eicosapentaenoic acid (EPA) を多く含み、生体膜流動性を増加させると言われている。しかし、多価不飽和脂肪酸が生体膜流動性に与える影響についての詳細な情報は少ない。そこで、本研究ではモデル二分子膜である Dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) 二分子膜流動性の多価不飽和脂肪酸の影響を時間分解蛍光偏光解消測定により影響を調査した。

2. 実験

試料溶液は 1 mmol kg^{-1} の DPPC 水溶液に DHA, EPA を所定の濃度となるように添加し調製した。また、蛍光プローブには 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH) をいた。HORIBA 社製の FluoroMax-4 Spectrofluorometer を用いて、λ_c=370 nm, λ_{em}=430 nm, 温度範囲 20－70 ˚C で時間分解蛍光偏光解消測定を行い、蛍光異方性を測定した。

3. 結果と考察

DPPC 二分子膜の異方性(r)値の温度依存性を調査すると、DPPC 純粋系では 42 ˚C で r 値の急激な変化が見られた。これは、DPPC 二分子膜のゲル相から液晶相への相転移である。42 ˚C で見られた純粋系の相転移温度は DHA, EPA 添加により低下した。DHA を添加すると DPPC 純粋系と比べすべての温度範囲で r 値が大きくなった。一方、EPA を添加するとゲル相での r 値は濃度依存的に小さくなり、液晶相ではわずかに大きくなった。これらの異方性値の結果からオーダーパラメーター (S) および回転拡散係数 (D_w) を算出した。S は蛍光プローブである DPH の傾き具合を、D_w は回転運動の激しさを表す。DPPC 純粋系の S は温度依存的に低下し、D_w は増加する傾向が見られた。この結果は、温度が上昇するにつれ、蛍光プローブである DPH が大きく傾き、回転の激しさが増すことで生体膜流動性が増加したことを意味する。DHA および EPA 添加では S および D_w 値は DPPC 純粋系と同様の傾向が見られた。また DHA を添加すると、液晶相において DPPC 純粋系よりも S 値は低く、D_w 値は大きくなった。EPA 添加では液晶相において EPA 濃度が小さいほど S 値は小さくなり、D_w 値は濃度依存が見られなかった。

time-resolved fluorometry, DPPC, Unsaturated fatty acid

講演番号：3A41a04
講演日時、会場：3 月 28 日 09:33～ A 校舎 41 会場

好熱性細菌 *Meiothermus ruber* H328 株由来ケラチン分解性プロテアーゼ巨大分子複合体の主要構成成分 2 タンパク質の機能と遺伝子発現に関する研究
Investigation of two key proteins included in the macromolecular keratinolytic protease complex produced by *Meiothermus ruber* H328 with respect to protein function and gene expression.
○俣野 明日香[1]、山岡 昂太[1]、片岡 真亜知[1]、増村 威宏[1]、川崎 一則[2]、茂里 康[2]、渡部 邦彦[1] ([1]京都府立大学、[2]産総研・健康工学)
○Asuka MATANO[1], Akito YAMAOKA[1], Maachi KATAOKA[1], Takehiro MASUMURA[1], Kazunori KAWASAKI[2], Yasushi SHIGERI[2], Kunihiko WATANABE[1] ([1]Kyoto Prefectural Univ., [2]AIST)

[背景・目的]
好熱性細菌 *Meiothermus ruber* H328 株は菌体外にケラチン分解性プロテアーゼを生産し、トリ羽毛ケラチンを強力に分解する。このプロテアーゼは巨大分子複合体を形成し、プロテオームとゲノムデータを用いた構成タンパク質の同定解析から、2 つの主要な機能未知タンパク質 Protein A (MrH_0843:2,025 bp, 674 a.a., 71 kDa)と、その 4 bp 下流に位置するセリンプロテアーゼ Protein B (MrH_0844:2,094 bp, 697 a.a., 74 kDa)の存在が明らかとなっている。Protein A は Protein B 活性の発現・維持に深く関与することが示唆されており、本研究では、オペロン形成の有無の解析及び Western Blot 解析による Protein B に対する Protein A タンパク質の機能解明を行った。
[方法・結果]
RT-PCR 法を用いて、Protein A、B のオペロン形成の有無の解析を試みた。H328 株本培養 5 時間後（対数増殖期中期)の細胞から抽出した RNA に対して cDNA を合成後、両遺伝子に特異的な primer を用いて PCR 解析を行った。その結果、Protein A、B の 2 つの遺伝子をカバーする約 4 kbp の位置にのみバンド増幅が見られ、2 つの遺伝子がオペロンを形成することが判った。Protein A、B が機能の上でも密接に関わることが示唆された。別途、ケラチン分解性プロテアーゼの調製は、培養上清（羽毛含有 YS 培地、55℃、72 時間培養)を限外濾過濃縮（排除分子量 5×10^5)からゲル濾過クロマトグラフィー（分画分子量 1×10^8)に供し、得られる 2 つの画分（Peak 1 画分、Peak 2 画分)のうち、高分子側 Peak 1 画分をショ糖密度勾配遠心にかけ、超遠心活性画分を得て行った。抗 Protein A、B 抗体を用いた Western Blot 解析より、全精製画分に両タンパク質を確認した。続いて、Protein A、B の遺伝子全長を、単独あるいは *cis* 形式で pUC119 ベクター/大腸菌 BL21 (DE3)株にて *lac* promoter 下で発現させた無細胞抽出液（CFE)について活性と発現解析を行った。その結果、Protein B は単独株、*cis* 発現株において成熟型（60 kDa)で発現したが、*cis* 発現株のみ活性を有した。一方 Protein A は、成熟型（31 kDa)で発現した *cis* 発現株とは異なり、単独株では高分子側（66 kDa、47 kDa)に強く発現し、完全な成熟化は起こらなかった。更に、その未成熟 Protein A は活性を有する *cis* 発現株の CFE との熱処理（60℃、30 min)により成熟化することから、minor な活性型 Protein B により Protein A が成熟化することでシャペロン機能を発揮し、カスケード式に活性型 Protein B が多く発現すると示唆された。

keratinolytic protease, outer membrane vesicle, gene expression

講演番号：3A41a05
講演日時、会場：3 月 28 日 09:44～ A 校舎 41 会場

遺伝子破壊株を用いた好熱性細菌 *Meiothermus ruber* H328 株が産生するケラチン分解性プロテアーゼに関する研究

Study of keratinolytic protease(s) produced by thermophilic bacterium *Meiothermus ruber* H328 employing the gene disruption method.

○西 海斗、渡部 邦彦（京都府立大学）
○Kaito NISHI, Kunihiko WATANABE (Kyoto Prefectural Univ.)

【背景・目的】

好熱性細菌 *Meiothermus ruber* H328 株はケラチン分解性プロテアーゼを分泌し、トリ羽毛を強力に分解する。このケラチン分解性プロテアーゼは巨大分子複合体を形成し、耐熱性に加え驚異的な変性剤耐性をもつ[1)]。また H328 株のゲノム解析およびこの巨大分子複合体に対する MALDI/TOF/MS 解析からケラチン分解に関与する遺伝子としてセリンプロテアーゼ Protein B (MrH_0844)およびこの遺伝子とオペロンを形成していると考えられる機能未知タンパク質 Protein A (MrH_0843)が同定されている[2)]。そこで選択マーカーとしてカナマイシン耐性を用いてこれらの遺伝子破壊株を作成し、トリ羽毛分解も含めケラチン分解活性への影響について研究を行った。

【方法・結果】

1 ステップの相同組換えにより *protein B* 遺伝子を破壊するため、*protein B* の上流および下流領域各 1 kb、そしてカナマイシン (Km)耐性遺伝子を含むプラスミドを構築した。相同組換えのため、H328 株を対数増殖期前期まで培養し、その培養液 (~10^8 cells)とプラスミド (2 μg)を混合した後 55℃で 2 h 培養した。この培養液を 100 μg/ml Km 含有固体培地にプレーティングし、72 h 培養したところ 10^{-5} の効率でコロニー形成が見られ、PCR により⊿*protein B* 株の獲得を確認した。

次に野生株と得られた⊿*protein B* 株のケラチン分解活性を測定した。培養 24 h 後の培養上清を用いて活性測定を行ったところ、⊿*protein B* 株は野生株の約 30%まで活性が減少した。さらにこのサンプルに対して抗 Protein B 抗体、および抗 Protein A 抗体を用いた Western Blotting 解析を行ったところ、野生株と異なり⊿*protein B* 株は Protein B だけでなく Protein A のバンドも検出されなかった。

現在 *protein A* 遺伝子破壊株を作成しており、野生株とこれら二つの遺伝子破壊株のケラチン分解活性の比較、および Protein A と Protein B 間の相互作用について解析を行っている。

1) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98:2973–2980 (2014)
2) *Genome Announc.* 1: e00176–13 (2013)

keratinolytic protease, gene disruption, outer membrane vesicle

講演番号：3A41a06
講演日時、会場：3 月 28 日 10:05～ A 校舎 41 会場

糖脂質酵素 MPIase と タンパク質膜透過チャネル SecYEG に依存したタンパク質膜挿入反応の再構成

In vitro the integration depend on glycolipozyme MPIase and SecYEG translocon

○佐々木 優[1]、Moser Michael[1]、永野 孝典[1]、松林 英明[2]、車 ゆうてつ[3]、上田 卓也[2]、西山 賢一[1] ([1]岩手大寒冷バイオ、[2]東大新領域メディカルゲノム、[3]東工大地球生命研究所)
○Masaru SASAKI[1], Michael Moser[1], Takanori NAGANO[1], Hideaki MATSUBAYASHI[2], Yutetsu KURUMA[3], Takuya UEDA[2], Ken-ichi NISHIYAMA[1] ([1]Iwate Univ. CRC, [2]Tokyo Univ. MGS, [3]Tokyo Tech Univ. ELSI)

大腸菌の内膜では、膜タンパク質はその合成に共役して膜挿入する。膜挿入は、大きく分けて SRP（シグナル認識粒子）やタンパク質膜透過チャネル SecYEG に依存する経路と依存しない経路の 2 種類が知られている。膜を 6 回貫通する Mannitol Permease (MtlA)は、SRP や SecYEG に依存して膜挿入することが知られている。このことは SecYEG 変異株や SRP 変異株から調製した反転膜小胞を用いた *in vitro* 解析により明らかにされている。MtlA の膜挿入機構の詳細を明らかにするため、MtlA 膜挿入を必要な因子のみで再構成する試みがいくつか報告されている。以前我々は、MtlA 膜挿入には SRP、SecYEG に加え、タンパク質膜挿入に関与する糖脂質酵素 MPIase が必要であることを報告した。しかし MtlA 膜挿入には SecYEG のみ、もしくは膜挿入反応に関与すると考えられている YidC のみでも十分であるという報告もあり、統一した見解は得られていない。その大きな理由が、MtlA はリン脂質だけで調製したリポソームに無秩序な自発的膜挿入を起こすことであると考えた。MtlA の自発的膜挿入は生理的濃度のジアシルグリセロール（DAG）をリポソームに組み込むことにより完全に抑制できる。しかし、DAG は界面活性剤ドデシルマルトシド（DDM）と不溶性の沈殿を形成するため、プロテオリポソームを再構成する際に DDM で可溶化した SecYEG や YidC 使うと、DAG がプロテオリポソームから脱離し、自発的膜挿入が復活した可能性が高い。今回、SecYEG の界面活性剤を DDM からオクチルグルコシド（OG）にゲルろ過により交換してプロテオリポソームを再構成した。その結果、SecYEG のみでは MtlA の膜挿入活性は全く検出されなかった。一方、OG で可溶化した SecYEG と MPIase を混合してプロテオリポソームを再構成したとき、MtlA の膜挿入を再現することができた。SecYEG、MPIase 依存の膜挿入は、SRP に対しても依存性が観察された。これらの結果は、今回調製した再構成プロテオリポソームにより *in vivo* の反応を忠実に反映した MtlA の膜挿入が再現できたことを示している。SecYEG、MPIase 依存の MtlA 膜挿入に YidC が影響を及ぼすかどうかについても報告する。

SecYEG, MPIase, membrane protein integration

講演番号：3A41a07
講演日時、会場：3 月 28 日 10:16～ A 校舎 41 会場

生細胞蛍光イメージングを用いた磁性細菌のアクチン様細胞骨格 MamK の機能解析

Functional analysis of magnetotactic bacterial actin-like cytoskeleton MamK using florescence live-cell imaging

○田岡 東[1,2]、清河 文子[1]、上杉 知佳[3]、福森 義宏[1,2]（[1]金沢大・理工・自然システム、[2]金沢大・理工・バイオ AFM、[3]金沢大・院・自然科学）

○Azuma TAOKA[1,2], Ayako Kiyokawa[1], Chika Uesugi[3], Yoshihiro Fukumori[1,2] ([1]Sch. of Nat. Sys., Col. of Sci, and Eng., Kanazawa Univ., [2]Bio-AFM FRC, Col. of Sci, and Eng., Kanazawa Univ., [3]Grad. Sch. of Nat. Sci. and Tech., Kanazawa Univ.)

磁性細菌は、マグネトソームとよばれる原核細胞オルガネラをもち、これを磁気センサーとして用いて、地磁気を感知し、磁場に沿って移動する走磁性とよばれる細胞運動を行う。マグネトソームは、大きさ約 50 nm の磁鉄鉱結晶（磁石）を含む膜小胞であり、細胞の中央に直鎖状に配置される。マグネトソームの細胞内配置は MamK とよばれるアクチン様蛋白質から成る細胞骨格とマグネトソームとの相互作用により保たれていると考えられている。しかし、MamK 細胞骨格がどのようにマグネトソームを配置し、磁気センサーをしての機能させるのか具体的なメカニズムは不明である。

我々は、マグネトソーム膜局在蛋白質 MamC と GFP を用いてマグネトソームの生細胞蛍光イメージング法を開発し、細胞周期を通じたマグネトソームの細胞内動態観察に成功した（上杉ら、日本農芸化学会大会 2014）。本研究では、本法を用いて、MamK 細胞骨格とマグネトソームの細胞内動態との関連を調べた。蛍光イメージングには、MamC と MamI を標的蛋白質として用いた。これらの蛋白質はいずれも２つの膜貫通領域をもち、マグネトソーム膜に特異的に局在する。MamC は磁鉄鉱結晶形の調節に関わる蛋白質であり、MamI は膜小胞形成に必須の蛋白質である。広宿主域プラスミドを用いて、磁性細菌 *Magnetospirillum magneticum* AMB-1 において MamC-GFP 及び MamI-GFP 発現系を構築した。GFP 融合蛋白質を発現させた細胞をカバーグラスに固定し、液体培地中で培養を行ないつつ、24 時間以上にわたりタイムラプス観察を行った。その結果、MamC-GFP は細胞長軸方向に沿ったスポット状に、MamI-GFP は長軸方向に沿った線状に観察され、細胞内局在に違いがみられた。その局在パターンから MamI は細胞内のすべてのマグネトソーム小胞に、MamC は磁鉄鉱結晶を含む成熟したマグネトソーム小胞にのみ局在することが示唆された。また、タイムラプス観察の結果、MamC-GFP および MamI-GFP の蛍光シグナルは、細胞が成長し伸長しても、細胞の長軸に沿って安定に保持され、細胞分裂時には娘細胞へ安定に分配される様子が観察された。次に、*mamK* 欠損株において、MamC と MamI の細胞内動態を調べた。*mamK* 欠損株では、蛍光シグナルは細胞内をランダムに移動または凝集体を形成しており、細胞分裂の際には娘細胞に不均等に受け渡されていた。一方、*mamK* 欠損株にプラスミド上から MamK を発現させたレスキュー株では、蛍光シグナルは細胞周期を通じて安定な直鎖状構造をとっていた。このことから、MamK 細胞骨格は、マグネトソーム鎖状構造を細胞中央に安定に保持し、マグネトソームの分散や凝集を防いでいる。また、細胞分裂の際には、マグネトソームを娘細胞へ確実に分配することに役立っていることが明らかになった。

magnetotactic bacteria, live-cell imaging, cytoskeleton

講演番号：3A41a08
講演日時、会場：3 月 28 日 10:27～ A 校舎 41 会場

植物病原性糸状菌 *Ustilago maydis* の感染時における初期エンドソーム動態の生理学的意義
Physiological role of early endosome motility in infection of the plant pathogen *Ustilago maydis*
○樋口 裕次郎[1]、Gero Steinberg[2]、竹川 薫[1] ([1]九大院農、[2]エクセター大生命科)
○Yujiro HIGUCHI[1], Gero STEINBERG[2], Kaoru TAKEGAWA[1] ([1]Kyushu Univ., [2]Exeter Univ.)

【目的】初期エンドソームは、細胞膜から取り込まれたカーゴを選別し、細胞膜へと再びリサイクリングするもしくはリソソーム/液胞への分解へ導くためのエンドサイトーシス経路におけるオルガネラである。本研究で用いた植物病原性糸状菌 *Ustilago maydis* を含む真核細胞では、初期エンドソームの動態の分子メカニズムは比較的良く研究されてきたが、動態を示す必然性といった生理学的意義に関してはあまり理解が進んでいなかった。我々は最近、栄養生長中の *U. maydis* 菌糸において、蛍光タンパク質でラベルしたリボソームを FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching; 光退色後蛍光回復) 顕微鏡解析することにより、初期エンドソームの動態がリボソームと mRNA の翻訳複合体であるポリソームを細胞内に均一に分布させるのに重要であることを明らかにした [1)]。本発表では、植物感染時の *U. maydis* における初期エンドソーム動態の寄与に関する結果を報告する [2)]。
【方法および結果】植物病原菌は、エフェクターと呼ばれるタンパク質を感染時特異的に発現して分泌することにより、植物の免疫システムを抑制する。*U. maydis* の植物感染時には、エフェクター遺伝子の発現調節のため、菌糸先端と核との間で情報伝達が行われていることが推測され、動態を示す初期エンドソームがその情報伝達を担っていると我々は予想した。そこでまず、実際に感染時に菌糸先端から核へと初期エンドソームが動態を示すことを顕微鏡解析によって確認した。そして、感染時における初期エンドソームの動態の寄与を調べるために、他の細胞内輸送経路に影響を及ぼさずに、初期エンドソームの動態のみを特異的に阻害すると、エフェクター遺伝子の発現が抑制され、またそれに対応してエフェクタータンパク質の植物細胞への分泌量の低下が確認された。その結果、初期エンドソームの動態を阻害した *U. maydis* 細胞を感染させた植物体において、病原性の低下が見られた。さらに我々は、MAPK のひとつである Crk1 が初期エンドソーム上に局在し、共動態を示すことを見出した。*crk1* の破壊株では、エフェクター遺伝子の発現量およびそのタンパク質分泌量の亢進が見られ、Crk1 が初期エンドソームの動態を介してエフェクター遺伝子の発現を負に制御していることが示唆された。以上から、*U. maydis* が植物感染する際に、初期エンドソームの動態がエフェクター遺伝子の発現レベルにおいて重要であることが示唆された [2)]。

1) Higuchi Y. *et al*., 2014. *J Cell Biol* 204, 343-357.
2) Bielska E., Higuchi Y., Schuster M. *et al*., 2014. *Nat Commun* 5, 5097.

early endosome, effector, *Ustilago maydis*

講演番号：3A41a09
講演日時、会場：3 月 28 日 10:38～ A 校舎 41 会場

FIB-SEM を用いた糸状菌 *Trichoderma reesei* の菌体内構造の解析
Analysis of intracellular structures of *Trichoderma reesei* by FIB-SEM.
○藤原 南帆[1]、田原 伸悟[1]、志田 洋介[1]、森川 晃成[2]、多持 隆一郎[2]、南郷 脩史[3]、岡田 仁[4]、大隅 正子[4]、小笠原 渉[1] ([1]長岡技科大 生物、[2]日立ハイテクノロジーズ、[3]ラトックシステムエンジニアリング、[4]綜合画像研究支援)
○Minaho FUJIWARA[1], Shingo TAHARA[1], Yosuke SHIDA[1], Akinari MORIKAWA[2], Ryuichiro TAMOCHI[2], Nobuhito NANGO[3], Hitoshi OKADA[4], Masako OSUMI[4], Wataru OGASAWARA[1] ([1]Dept. of Bioeng., Nagaoka Univ. of Tech., [2]Hitachi High-Technologies, [3]Ratoc System Engineering, [4]IIRS)

【目的】

糸状菌 *Trichoderma reesei* はセルロースを唯一の炭素源としたとき，多量のセルラーゼを誘導生産することが知られている．これまでに工業用セルラーゼ生産菌を造成するために世界標準株 QM9414 株に突然変異導入を行い，セルラーゼ高生産変異株 PC-3-7 株が取得されてきた．これらの株をセルラーゼ生産条件下で培養し，光学顕微鏡を用いて観察したところ PC-3-7 株においてのみ菌糸の膨張が観察された．そこで，電子顕微鏡を用いて菌体の詳細な解析を行った結果，透過型電子顕微鏡(TEM)による観察では，PC-3-7 株はセルラーゼ生産条件下において液胞が肥大化していることが明らかとなった．また，低加速電圧走査型電子顕微鏡(LV-SEM)による観察によって、*T. reesei* の菌糸表面に繊維状物質が生産されていることも明らかになっている[1]．しかし，*T. reesei* は細胞が連なる長い菌糸を有しているため，これらの方法では菌糸の一部分しか観察できず，細胞内の詳細な解析が不可能である．そこで本研究では，集束イオンビーム走査型顕微鏡(FIB-SEM)を用いて *T. reesei* の連続断面画像を取得し，3D 画像を再構築することで，広範囲にわたる菌糸の形状および細胞内の構造を解析することを目的とした．

【方法と結果】

QM9414 株と PC-3-7 株をセルラーゼ生産条件および非生産条件で培養した．各培養菌糸をグルタルアルデヒドによって前固定し，過マンガン酸カリウムによって後固定した．固定した菌糸は樹脂で包埋し，FIB-SEM を用いて奥行き 50μm 分の包埋試料を 100 nm ごとに切削しながら 500 枚の SEM 画像（横 40μm，縦 30μm）を連続で取得した．これらの画像中のオルガネラ(細胞核，液胞およびミトコンドリア)および細胞壁を種類ごとに全てトレースし，3D 画像構築ソフト (TRI/3D-SRFⅢ-FCS) を用いて菌糸の 3D 画像を構築した．その結果，PC-3-7 株のセルラーゼ生産条件下では非生産条件下と比較して，液胞の肥大化および細胞核の数が減少することが示唆された．現在、セルラーゼ生産とオルガネラの挙動の関連について精査を行うため，3 次元画像の高精度化を行っている．

[1] Nitta et al. J. Electron Microsc., 2012

Trichoderma reesei, FIB-SEM, organelle

講演番号：3A41a10
講演日時、会場：3 月 28 日 10:49～ A 校舎 41 会場

マイコウイルスが宿主糸状菌の細胞壁構造におよぼす影響
Effects of mycovirus infection on host fungal cell wall structure.
○望月 翔子[1]、鈴木 信弘[2]、笠原 紳[1] ([1]宮城大・食産業・環境、[2]岡山大・植物研)
○Shoko MOCHIZUKI[1], Nobuhiro SUZUKI[2], Shin KASAHARA[1] ([1]Miyagi Univ., [2]Okayama Univ.)

糸状菌 *Cryphonectria parasitica*（旧 *Endothia parasitica*）は，凝乳活性をもつ酸性プロテアーゼを高産生し，わが国でも古くから研究対象とされてきた糸状菌であるが，クリなどの果樹に対して胴枯病を引き起こす植物病原菌でもある。100 年余り前に日本から米国東部にもたらされた本菌が，感受性の高いアメリカグリ（American Chestnut）を山野からほぼ一掃したことは植物病理学史上，特に有名である。*C. parasitica* はウイルス（マイコウイルス）感染により菌糸成長速度や胞子形成能が低下し，病原性もほぼ消失することが知られている。また，ウイルス感染により細胞壁溶解酵素への感受性が増大することより，細胞壁の構造に影響を及ぼしているとの予備的知見もあり，非ウイルス感染株とウイルス感染株のそれぞれの細胞壁に着目して細胞壁構成多糖の分画と定量，構成糖分析および結合様式の解析を行った。

キチン結合性の蛍光色素 Calcofluor White による *C. parasitaca* 細胞壁中キチンの局在観察では，非ウイルス感染株である EP155 株，ウイルス感染株である EP713 株，CHV2/EP155 株，MyRV1/EP155 株でそれぞれ蛍光強度が変化しており，特に CHV2/EP155 株において強い蛍光が観察された。この理由として，ウイルス感染によりキチンの合成量が増加しα-1,3-グルカンで被覆できなくなった可能性，またはウイルス感染によりα-1,3-グルカンが分解またはその合成が阻害され，キチンが細胞壁表面に露出している可能性，さらには細胞壁の層構造の中におけるキチンの存在部位が変化している可能性も考えられ，それぞれについて検証を進めている。

細胞壁多糖の分画実験では，各株間で，キチンを含むとされる AI 画分（アルカリ不溶画分）の質量に有意差は見られなかった。一方で，CHV2/EP155 株および MyRV1/EP155 株では，α-1,3-グルカンを含むとされる AS2 画分（アルカリ可溶画分 2）の重量が，EP155 株のものと比較して減少していた。この結果は，キチンの蛍光染色観察の結果と一致していた。また，細胞壁多糖の構成糖分析の結果からは，非ウイルス感染株とウイルス感染株では，構成糖比率に大きな違いは見られなかった。メチル化分析の結果より，本菌の細胞壁中には 1,6 結合によるグルコース残基は認められず，すべてが 1,3 結合によるグルコース残基，1,4 結合によるグルコサミン（*N*-アセチルグルコサミン）残基であることが示された。^{13}C-NMR によるアノマー解析では，AS2 画分中の 1,3 グルカンは，α型の結合様式を示すものであることが確認された。これらの結果より，ウイルス感染により細胞壁中のα-1,3-グルカン量が有意に減少し，このことが病原性と関連している可能性が示唆された。

mycovirus, cell wall, polysaccharide

講演番号：3A41a11
講演日時、会場：3 月 28 日 11:10～ A 校舎 41 会場

麹菌 *A. oryzae* におけるオートファジー関連タンパク質 AoAtg9 の推定リン酸化部位変異体の解析

Analysis of putative phosphorylation site mutants of autophagy-related protein AoAtg9 in *Aspergillus oryzae*

藤木 耕平、○菊間 隆志、北本 勝ひこ（東大院　農生科　応生工）
Kohei FUJIKI, ○Takashi KIKUMA, Katsuhiko KITAMOTO (Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo)

【目的】

オートファジーは二重膜構造を持つオートファゴソームを介して細胞内成分をリソソーム/液胞で分解する機構である。近年，オートファゴソーム形成機構について活発に研究が行われており，Atg9 が重要な役割を果たしていることが示唆されている。Atg9 は Atg タンパク質の中で唯一の複数回膜貫通ドメインを持つタンパク質であり，オートファゴソーム形成の核として初期段階に機能していると考えられている。しかし，糸状菌においてオートファゴソーム形成における Atg9 の詳細な機能は分かっていない。そこで本研究では，糸状菌におけるオートファゴソーム形成の分子機構を明らかにするため，麹菌 *Aspergillus oryzae* における AoAtg9 の解析を行った。

【方法と結果】

他の AoAtg タンパク質との関与を調べるため，様々な *Aoatg* 遺伝子破壊株（Δ*Aoatg1*，Δ*Aoatg4*，Δ*Aoatg8*，Δ*Aoatg15*）において AoAtg9 の局在を調べたところ，オートファジー誘導に関わる *Aoatg1* 破壊株のみにおいて AoAtg9 の凝集が観察された。この結果より, AoAtg9 の局在が AoAtg1 によって制御されていることが予想された。Atg1 はセリン/スレオニンキナーゼであり，*Saccharomyces cerevisiae* において，Atg9 の Atg1 によるリン酸化がオートファゴソーム形成に必須であることが報告されている。そこで, *Aoatg9* 破壊株において AoAtg9 の 6 箇所の推定リン酸化部位（セリン・スレオニン残基）に対しアラニン置換変異を導入した AoAtg9-EGFP を発現する株（S8A, T578A, S726A, T727A, T786A, S894A),および 6 箇所全ての部位をアラニンに置換した AoAtg9-EGFP を発現する株（6A）をそれぞれ作製し, 表現型観察と局在観察を行った。PD 寒天培地における生育を観察したところ，AoAtg9 の T578A および 6A 変異株において, 気中菌糸形成が抑制され，分生子数が減少した。さらに, DPY 寒天培地における生育を観察したところ，T578A 変異株においては野生株よりも分生子数が増加し, 菌核数が減少している傾向が見られた。また, 6A 変異株においては *Aoatg9* 破壊株と同様に白いコロニーを形成し, 分生子数が減少した。一方で局在観察を行ったところ, 局在に変化は見られず, *Aoatg1* 破壊株において見られた AoAtg9 の凝集は観察されなかった。この結果より, 変異を入れた部位は AoAtg9 の機能には重要であるが, 局在には影響しないことが示唆された。現在, T578A 変異株における菌核数の評価, および T578A, 6A 変異株におけるオートファジーの活性レベルの評価を行っている。

Aspergillus oryzae, autophagy, Atg9

講演番号：3A41a12
講演日時、会場：3 月 28 日 11:21～ A 校舎 41 会場

麹菌 *A. oryzae* におけるオートファジーによる核の分解の誘導条件探索

Exploration of the conditions needed to induce degradation of nuclei by autophagy in *Aspergillus oryzae*

○三谷 隆宏、菊間 隆志、北本 勝ひこ（東大院・農生科・応生工）
○Takahiro MITANI, Takashi KIKUMA, Katsuhiko KITAMOTO (Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo)

【目的】　オートファジーは細胞質成分を液胞/リソソームに運びこみ、分解する真核生物によく保存された機構である。オートファジーによる核の分解（ヌクレオファジー）は酵母、哺乳類、糸状菌、繊毛虫で知られている。酵母においては液胞膜が陥入して核の一部を直接液胞に取り込むミクロオートファジーによるヌクレオファジーが代表例である。また、哺乳類細胞では核から分離した一部がオートファゴソームと呼ばれる二重膜小胞によって囲まれ液胞に取り込まれるマクロオートファジーによるヌクレオファジーが報告されている。

一方で、麹菌 *Aspergillus oryzae* は核全体をオートファゴソーム膜で取り囲み、液胞に取り込み分解するマクロオートファジーによるヌクレオファジーを行う。核全体を分解することは、*A. oryzae* が細胞内に複数の核を持つからこそ可能である。このマクロオートファジーによる核全体の分解は、いままでのところ *A. oryzae* のみで報告されている。また、その生理学的意義や機構などには未解明な部分が多い。

本研究は、*A. oryzae* のヌクレオファジーの誘導機構の解明を目的として、ヌクレオファジーの評価法の確立とそれを用いた誘導条件の探索を行った。

【方法と結果】　GFP 融合タンパク質がオートファジーによって液胞に取り込まれると、タンパク質分解酵素により分解を受けるが、GFP は液胞内での分解に対して耐性があるために GFP のみが残存する。この GFP のバンドをウェスタンブロットで検出することで、オートファジーによる目的タンパク質の取り込みを評価する方法が酵母などで多く用いられている（Cleavage assay)。核質に局在するヒストン H2B-EGFP に対して Cleavage assay を行ったところ、Cleavage assay で検出される EGFP 量と、蛍光顕微鏡で観察された液胞内の EGFP 蛍光が同様の傾向を示した。また、オートファジー欠損株Δ*Aoatg8* において Cleavage assay を行い、EGFP のバンドの検出がオートファジー依存的であることを確認した。この評価法を用いて各種の栄養欠乏条件について検討したところ、炭素源・窒素源飢餓においてヌクレオファジーが誘導されるが、リン酸、カリウム、マグネシウムの欠乏では誘導されないことが示された。また、培養時間が 24 時間を超える液体培養では、培養時間の経過に従ってヌクレオファジーの誘導が増加した。現在、Cleavage assay を用いて栄養枯渇条件以外でヌクレオファジーを誘導する条件を探索している。

Autophagy, *Aspergillus oryzae*, Nucleophagy

講演番号：3A41a13
講演日時、会場：3 月 28 日 11:32～ A 校舎 41 会場

麹菌 *A. oryzae* における Acyl-CoA binding protein の機能及び特殊な分泌経路の解析

Analysis of functions of Acyl-CoA binding proteins and unconventional secretion pathway in *Aspergillus oryzae*

○川口 航平、菊間 隆志、北本 勝ひこ（東大院・農生科・応生工）
○Kouhei Kawaguchi, Takashi Kikuma, Katsuhiko Kitamoto (Dept. Biotechnol., Grad. Sch. Agric. Life Sci., The Univ. of Tokyo)

【目的】

酵母における Acyl-CoA-binding protein (Acb1)は分泌シグナル配列を持たないタンパク質であるにも関わらず、栄養飢餓条件で細胞外へ分泌される。その分泌機構は、通常の小胞体–ゴルジ体を経由しない特殊な分泌経路によるものであり、オートファジー関連タンパク質などを必要とする。また、酵母の Acb1 は細胞性粘菌の胞子形成を誘導することが示されており、精製した酵母の培養上清を細胞性粘菌に供することで Acb1 の分泌を確認するという、異種間のバイオアッセイ系が構築されている。これまで酵母では特殊分泌経路の研究が行われているが、糸状菌においてはほとんど報告がなされていない。さらに、酵母などでは ACBP (Acyl-CoA Binding Protein)モチーフを有するタンパク質は 1 つだけであるが、糸状菌の多くでは ACBP モチーフを持つタンパク質が 2 つ存在する。そこで本研究では、*Aspergillus oryzae* が有する 2 つの Acyl-CoA-binding protein の機能を明らかにするとともに、糸状菌における特殊分泌経路を発見することを目的とした。

【方法・結果】

Saccharomyces cerevisiae の Acb1 のホモログタンパク質 AoAcb1 と AoAcb2 の局在観察により我々は、AoAcb1 が細胞内でドット状構造を形成し微小管依存的に移動すること、その正常な局在にはオートファゴソーム形成に関与するタンパク質が必要であること、また AoAcb2 が酵母 Acb1 と同様に細胞質中に拡散することを示した。AoAcb1 が有する ACBP モチーフと TraP モチーフをそれぞれ欠損させた AoAcb1 の局在を観察したところ、ACBP モチーフが欠損した AoAcb1 はドット状構造の移動が起こらなくなり、TraP モチーフが欠損した AoAcb1 は細胞質中に拡散していた。また我々は、*Aoacb1* 破壊株の取得に成功したが、通常の方法では *Aoacb2* 破壊株を得ることができなかった。そこで *thiA* プロモーター制御下で *Aoacb2* を発現させ、培地中にチアミンを添加して発現を抑制し、生育比較を行った。その結果、*Aoacb1* 破壊株は野生株と同様の生育を示し、*Aoacb2* 条件発現株は野生株と比べて生育の遅れが観察された。また、ウエスタンブロット法により、HA タグを融合させた AoAcb2 が培養上清に検出された。一方、HA タグ融合 AoAcb1 は培養上清から検出されなかった。このことから、AoAcb2 のみが特殊分泌経路により細胞外へ分泌されていることが示唆された。現在、AoAcb2 の分泌がオートファジー関連タンパク質依存的であるかどうかの解析を進めるとともに、AoAcb1 と AoAcb2 が酵母の Acb1 と同様に細胞性粘菌の胞子形成を誘導するかを検討している。

Aspergillus oryzae, unconventional secretion pathway, Acyl-CoA binding protein

講演番号：3A41a14
講演日時、会場：3 月 28 日 11:43～ A 校舎 41 会場

Analysis of the septal association mechanism of Leashin protein in *Aspergillus oryzae*

○PEI HAN, JUN-ICHI MARUYAMA, KATSUHIKO KITAMOTO (Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo)

[Purpose] Woronin body, a Pezizomycotina-specific organelle, is tethered to the septum in normal growth condition, and it plugs the septal pore in response to cellular wounding, preventing the excessive loss of cytoplasm. Recently, we identified a Woronin body tethering protein AoLAH in *Aspergillus oryzae*[1]. AoLAH is a single polypeptide with 5,727 amino acids; it is composed of a conserved N- and C-terminal regions and a long non-conserved middle region. We found that AoLAH N-terminal and C-terminal regions function for Woronin body association and tethering to the septum, respectively. AoLAH middle region confers positional flexibility to the tethered Woronin bodies. AoLAH C-terminal region fused with EGFP was closely associated with the septum, and its deletion led to the failure of Woronin body tethering to the septum. However, how the AoLAH C-terminal region associates specifically with the septum is not known. The aim of this study is to investigate the mechanism for septal association of AoLAH.

[Methods and Results] Deletion analysis of the AoLAH C-terminal region was performed to identify a part responsible for septal association. AoLAH C-terminal region is conserved among Aspergilli, consisting of 1,018 amino acids. According to secondary structure prediction analysis, the former 505 amino acids of this region is mostly structurally disordered while in the latter 513 amino acids several secondary structures such as α-helix and β-sheet were predicted. This structure prediction is similar to those of the C-terminal region of LAH proteins from other *Aspergillus* species. AoLAH C-terminal region fused with EGFP associated with the septum and hyphal tip, and it was also observed as tubular structures moving in a microtubule-like manner along hyphae. After deleting the former 505 amino acids with predicted disordered feature, no motile tubular structures were observed, indicating that this part is needed for tubular structure formation and movement along hyphae. However, the localization associated at the septum and hyphal tip was still detected, suggesting that the latter 513 amino acids with α-helix and β-sheet structures are sufficient to function for association to the septum and hyphal tip. Complementation analysis of the deletion fragment for Woronin body tethering will be performed, and whether the movement of tubular structures of the C-terminal region is dependent on microtubule will be evaluated in the following research.

1) Han *et al*. (2014) *Eukaryot. Cell* 13: 866-77.

Aspergillus oryzae, Woronin body, septum

講演番号：3A41a15
講演日時、会場：3 月 28 日 11:54～ A 校舎 41 会場

麹菌 *Aspergillus oryzae* における AoFus3 相互作用タンパク質 FipB の作用解析
Functional analysis of FipB, an AoFus3-interacting protein in *Aspergillus oryzae*
○原田 堅伍、矢萩 大貴、丸山 潤一、北本 勝ひこ（東大院・農生科・応生工）
○Kengo HARATA, Daiki YAHAGI, Jun-ichi MARUYAMA, Katsuhiko KITAMOTO (Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo)

【目的】麹菌 *Aspergillus oryzae* は多細胞生物であり、隔壁には隔壁孔という小さな穴があいており、隣接する細胞はこれを介して連絡している。この細胞間連絡は、菌糸が損傷すると隣接する細胞に溶菌が伝播する危険をはらんでいる。糸状菌特異的なオルガネラ Woronin body が隔壁孔をふさぎ溶菌の伝播を防ぐが、この機能における Woronin body 以外の因子の関与については解析が進んでいない。当研究室では以前、MAP キナーゼのひとつである AoFus3 が隔壁孔を囲むような局在を示し、溶菌の伝播を防ぐ機能に関与することを報告している。さらに、AoFus3 の作用機序を調べるため、これと相互作用するタンパク質 FipB を同定した [1)]。FipB は、Rho GTPase を不活性型（GDP 結合型）にする RhoGAP (guanine nucleotide activated protein)ドメインをもつ。最近、*Magnaporthe oryzae* の FipB 相同タンパク質が Cdc42 と Rac1 の 2 つの Rho GTPase を標的とする可能性が示唆された [2)]。本研究では、*A. oryzae* において FipB が AoCdc42、AoRac1 に対し RhoGAP として作用するのかを解析した。
【方法と結果】まず、FipB と AoCdc42 および AoRac1 との相互作用を酵母ツーハイブリッド法によって解析した。RhoGAP ドメインをもつタンパク質は標的 Rho GTPase の活性型との結合親和性が高いことから、本実験では AoCdc42、AoRac1 それぞれに、恒常的に活性型になる変異を導入した。その結果、AoCdc42 の活性型変異体は FipB と強く相互作用したが、AoRac1 の活性型変異体は FipB と相互作用を示さなかった。よって、*A. oryzae* では FipB が AoCdc42 に対し特異的に RhoGAP として作用することが示唆された。

また、野生型株、*fipB* 破壊株、*Aofus3* 破壊株において、EGFP-AoCdc42 および EGFP-AoRac1 の隔壁における局在を観察し、比較した。EGFP-AoCdc42 は、野生型株において隔壁に薄く沿うような局在を示すが、*fipB* 破壊株、*Aofus3* 破壊株においては隔壁孔を囲む強い局在が観察された。EGFP-AoRac1 の場合、野生型株では隔壁に薄く沿うような局在を示したが、*fipB* 破壊株、*Aofus3* 破壊株でも同様の局在を示した。局在観察の結果から、FipB は AoRac1 よりも AoCdc42 に対し特異的に作用している可能性が示唆され、これは酵母ツーハイブリッド解析の結果を支持するものであった。

現在、*fipB* 破壊株および *Aofus3* 破壊株において、AoCdc42 と AoRac1 の GTP 結合活性型の量を定量的に測定することを検討している。

1) 矢萩大貴ら、2013 年度日本農芸化学会大会講演要旨 4B13a07
2) Wenyu et al. (2014) Fungal Genet. Biol. 67:37-50.

Aspergillus oryzae, MAP kinase, Rho GTPase

講演番号：3A41p01
講演日時、会場：3 月 28 日 14:00～ A 校舎 41 会場

二価カチオンで駆動する新奇べん毛モーターの発見

The discovery of a novel divalent cation-driven flagellar motor.

○今澤 陸[1]、高橋 優嘉[1,2]、青木 航[3]、佐野 元彦[1]、伊藤 政博[1,2,3] ([1]東洋大院・生命科学、[2]東洋大・バイオナノ、[3]東洋大・生命科学)
○Riku Imazawa[1], Yuka Takahashi[1,2], Wataru Aoki[3], Motohiko Sano[1], Masahiro Ito[1,2,3] ([1]Graduate School of Life Sciences, Toyo Univ., [2]Bio-nano, Toyo Univ., [3]Faculty of Life Sciences, Toyo Univ.)

【研究背景・目的】 多くの細菌は螺旋状のべん毛と呼ばれる運動器官を回転させることで、より良好な環境に移動する。べん毛のモーター部分である基部体は回転子と固定子から構成され、固定子内にH^+やNa^+といった一価のカチオンが流入することによりべん毛が回転すると考えられている。つまり、流入するイオンの駆動力がモーターの回転エネルギーとなっている。現在、べん毛モーター固定子の共役イオンの種類として H^+、Li^+、Na^+、K^+、Rb^+が報告されている。本研究では、これまで報告例のない二価カチオンで駆動する新奇べん毛モーター固定子の探索とその機能解析を目的とした。

【方法・結果】 最近、我々は Mg^{2+}や Ca^{2+}といった二価のアルカリ土類金属イオンを生育に要求する *Paenibacillus* sp. TCA20 株を自然界より分離した。TCA20 株は、二価のアルカリ土類金属イオンの濃度に依存した運動性を示した。次世代シークエンサーを用いた本菌のドラフトゲノム配列解析の結果、2 種類のべん毛モーター固定子遺伝子(TCA-*motAB1* と TCA-*motAB2*)が同定された。次に、2 種類の固定子の機能を解析するために遺伝子工学的手法が容易な枯草菌の系を用いた。まず、枯草菌固定子欠損株（運動性なし）に固定子（TCA-MotAB1 又は TCA-MotAB2）を発現する株（AB1 株と AB2 株）を作製し、運動性解析を行った結果、両菌株とも運動性の回復が見られた。更に、AB1 株はMg^{2+}やCa^{2+}濃度に依存した運動性を示した。これを更に検証するため、AB1 株に対してH^+駆動型モーターの阻害剤 CCCP とNa^+駆動型モーターの阻害剤 EIPA による遊泳阻害実験を行った結果、AB1 株の運動性は、どちらの阻害剤に対しても非感受性であった。この結果は、H^+や Na^+は、固定子 TCA-MotAB1 の共役イオンではないことを示していた。一方で、AB2 株の遊泳が CCCP に感受性を示したことより固定子 TCA-MotAB2 は、H^+型固定子であることが示された。AB1 株が実際に細胞内へ Mg^{2+}が輸送しているかを確認するため、次の実験を行った。枯草菌の主要な Mg^{2+}取り込み系を欠損させた株(ΔykoKΔyfjQ 株)は、枯草菌野生株が生育可能な 5mM Mg^{2+}条件下で生育できない。そこで、AB1 株から*ykoK* と*yfjQ* を欠損させた株（AB1ΔKQ）を構築し、5mM Mg^{2+}条件下での生育と運動性を観察した。その結果、AB1ΔKQ 株は、運動性を有し、野生株と同様の生育を示した。更に、細胞内 Mg^{2+}濃度を測定した結果、AB1ΔKQ 株の細胞内 Mg^{2+}濃度は、野生株と同程度であった。このことは、TCA-MotAB1 が Mg^{2+}を細胞内へ輸送していることが示された。

【結論・考察】 今回、TCA20 株由来の固定子 TCA-MotAB1 が二価のアルカリ土類金属イオンを共役イオンとして利用する新奇固定子であることを明らかにした。本研究成果は、ナノマシンとして注目される細菌べん毛モーターのイオン選択透過機構や回転機構の解明に寄与することが期待される。

flagellar motor, divalent cations, Paenibacillus

講演番号：3A41p02
講演日時、会場：3 月 28 日 14:11～ A 校舎 41 会場

黄麹菌 *Aspergillus oryzae* CPase の分泌に及ぼす N 末端 5 アミノ酸配列の影響

The effect of the N-terminal 5 amino acids on the secretion of *Aspergillus oryzae*

○榊原 史子、佐野 和紀、前田 浩、山形 洋平、竹内 道雄（東農工大院・応生化）
○ Fumiko SAKAKIBARA, Kazunori SANO, Hiroshi MAEDA, Youhei YAMAGATA, Michio TAKEUCHI (Tokyo Univ. of Agriculture and Technology)

【目的】*Aspergillus oryzae* のゲノムには、serine-type carboxypeptidase (CPase) をコードする遺伝子が 12 種存在する。そのうち菌体外分泌型は 10 種で、4 つは菌体外に多量に生産される高分泌型、6 つは少量しか生産されない低分泌型に分類することができる。本研究では、タンパク質の分泌に影響を与える因子として、N 末端の分泌シグナル配列に着目した。各 CPase の N 末端 5 アミノ酸配列を比較したところ、高分泌型 CPase は開始 Met から 2 番目と 3 番目アミノ酸残基が疎水性である傾向が見られた。これを基に、低分泌型 CPase である TA13 の N 末端 5 アミノ酸を高分泌型 CPase である TA4 のものと置換した TA4-13 キメラタンパク質は、aureobasidine A 耐性遺伝子をコードする *aurA* を選択マーカーとし、*A. nidulans* を宿主として発現させることで高分泌化することを報告した (1)。本研究では、*A. oryzae* を宿主として TA4-13 を発現させた場合にも同様の高分泌化が起きるのかを検証する。また、*A. nidulans* を宿主として発現させた場合に TA4-13 が高分泌化された原因についてさらに詳しく解明することを目的とする。

【方法】*A. oryzae* を宿主とし、高分泌型 CPase TA4、低分泌型 CPase TA13、上記の TA4-13、TA4 の N 末端 5 アミノ酸を TA13 のものと置換した TA13-4 を発現する形質転換体を作製した。選択マーカーには、硝酸還元酵素をコードする *niaD* を用いた。サザンブロット解析により、発現カセットの挿入された locus と挿入コピー数の確認を行った。得られた形質転換体を、starch による誘導条件下で液体培養し、培養上清の SDS-PAGE、ウエスタンブロット解析、および CPase 活性測定によってタンパク質分泌量を評価した。*A. nidulans* においても、条件を揃えるため新たに形質転換体を作製し、解析を行った。

【結果】*A. oryzae* を宿主として TA4-13 を発現させた場合、分泌量は低分泌型 CPase TA13 と同程度となり、高分泌化されなかった。したがって、高分泌化された *A. nidulans* と *A. oryzae* とは、タンパク質の高分泌化メカニズムに違いがある可能性が示唆された。また、*aurA* を選択マーカーとした *A. nidulans* 形質転換体では、ゲノム中でのマルチコピー化が示唆された。現在、*A. nidulans* 形質転換体については、より定量的なタンパク質分泌量の比較を行うため、*niaD* locus にシングルコピーで発現カセットが挿入された株での解析を試みている。

なお、本研究の一部は生研センター基礎推進事業の一環として行われたものである。

(1) 佐野ら, 2012 年度 農芸化学会要旨 3C22a05

Aspergillus oryzae, signal peptide, secretion

講演番号：3A41p03
講演日時、会場：3 月 28 日 14:22～ A 校舎 41 会場

黄麹菌 *A. oryzae* における分生子特異的に発現する推定 reductase 遺伝子（*cspA*）とその natural antisense transcripts の機能解析

Functional analysis of a putative reductase gene (*cspA*) and its natural antisense transcripts in *A. oryzae*

○辻井 雅、奥田 聡、竹内 道雄、山形 洋平（東京農工大・応生科）
○Masaru TSUJII, Satoshi OKUDA, Michio TAKEUCHI, Youhei YAMAGATA (Dept. of Applied Biological Science, Tokyo Univ. of Agriculture and Technology)

【背景と目的】黄麹菌における分生子の EST 解析の結果、分生子の EST の中では 331-25 遺伝子領域から転写された antisense RNA 由来の EST が最も多く、528 EST のうち 43 を占めていた。一方、酒類総合研究所によって公開されている CAoGD (Comprehensive *Aspergillus oryzae* Genome Database) では、331-25 遺伝子領域からは sense RNA (sn RNA)、antisense RNA (as RNA) の両方が転写されることが示されている。また、我々の以前の研究において、定量 PCR による sn RNA と as RNA の存在量の検討を行い、sn RNA、 as RNA ともに分生子に多量に存在していることを報告した (1)。この結果から、我々は 331-25 遺伝子を *cspA* (conidia specific protein) 遺伝子と命名した。さらに、as RNA は sn RNA と比較して分生子内で多量に存在していることも報告した (1)。本発表では、sn RNA と as RNA のシークエンス解析、 niaD300 株をホスト株とした sn RNA 過剰発現株 (snRNAoe1 株)、 as RNA 過剰発現株 (asRNAoe1 株)、*cspA* 欠損株をホスト株とした sn RNA 過剰発現株 (snRNAoe2 株)、as RNA 過剰発現株 (asRNAoe2 株)の表現型について報告する。
【方法及び結果】はじめに、RIB40 株から抽出した RNA を用いて、as RNA のシークエンス解析を行った。その結果、as RNA は 60 アミノ酸残基以上のペプチドをコードできないことが明らかとなった。次に、snRNAoe1 株を作製し、sn RNA 配列の解析を行った結果、sn RNA は 444 アミノ酸残基のタンパク質をコードしており、SDRs (Short-chain dehydrogenases/reductases)に保存された触媒ドメインと、菌類が保有している reductase に保存された NAD 結合ドメインも保存されていることが示されたがその機能は明らかではない。次に、snRNAoe1 株、asRNAoe1 株を作製し、表現型観察を行ったところ、snRNAoe1 株では分生子形成能の低下が見られたのに対して、asRNAoe1 株では表現型に変化は見られなかった。さらに、snRNAoe1 株における分生子形成能の低下に sn RNA と as RNA の相互作用が影響する可能性を排除するため、snRNAoe2 株を作製し、表現型の観察を行った結果、 snRNAoe1 株同様、分生子形成能の低下が確認された。これらの結果から、分生子で多量に存在している as RNA よりも野生株で存在量の少ない sn RNA は分生子形成に与える影響が大きいことが確認された。*A. oryzae* における natural antisense transcript に着目した研究は本研究が初めてである。
1) 辻井ら、日本農芸化学会 2012 年度大会要旨集 p. 630

Aspergillus oryzae, conidiation, natural antisense transcripts

講演番号：3A41p04
講演日時、会場：3 月 28 日 14:33～ A 校舎 41 会場

対峙培養における黄麹菌 *A. oryzae* の菌糸塊形成の検討

The study on mycelial pellet formation of *Aspergillus oryzae* under paired culture

○加藤 朝子[1]、倉科 瑛衣[1]、庄野 友理[2]、竹内 道雄[2]、山形 洋平[2]([1]農工大院・応生化、[2]東京農工大・応生科)
○Asako KATO[1], Akie KURASHINA[1], Yuri SHONO[2], Michio TAKEUCHI[2], Youhei YAMAGATA[2]
([1]Division of Applied Biological Chemistry, Tokyo Univ. of Agriculture and Technology, [2]Dept.of Applied Biological Science, Tokyo Univ. of Agriculture and Technology)

【背景と目的】
黄麹菌 *Aspergillus oryzae* は現在まで有性世代が発見されていないが、2005 年の全ゲノム配列の解析により、*A. oryzae* RIB40 株には子嚢菌の接合型決定因子である *MAT1-1* 遺伝子が存在することが明らかとなった。自然界では、*MAT1-1* 遺伝子の対となる *MAT1-2* 遺伝子を保有する株も明らかとなっており、同一株で両遺伝子を保有する株が発見されていないことから、*A. oryzae* はヘテロタリック型交配を行う可能性が示唆されている。又、既に有性世代の存在が報告されている近縁種 *A. flavus* の *MAT* 遺伝子と *A. oryzae* の *MAT* 遺伝子を比較すると、塩基配列は高度に保存されている。有性世代を発見出来れば、優良な形質を持った株を交配による育種が可能となる。
本研究では、有性生殖のマスターレギュレーターである *MAT* 遺伝子に着目し、有性生殖を誘引する最適な培養条件、有性生殖必須因子を明らかにし、*A. oryzae* が有性世代を有する可能性を探索することを目的とする。今回の報告では、野生株を対峙培養した際に見られた菌糸塊構造について、組み合わせ、培地条件、電子顕微鏡で観察した結果を報告する。
【方法及び結果】
当研究室の所持する *A. oryzae MAT1-1* 保有株および *MAT1-2* 保有株それぞれ 10 株以上を用い、一つのシャーレに 4 つの菌株を播種する対峙培養を行った。組み合わせは計 11 通り、培地は麦芽抽出物 Malt 培地、暗条件、シャーレをシールで密閉した嫌気性条件下で培養を行った。
培養 2 週間目で観察を行った所、菌糸が絡み合った菌糸塊構造が見られた。培養開始から 6 か月目まで観察したが、生じる菌糸塊構造の数や色素沈着の様子に大きな変化は見られなかった。11 通りの組み合わせのうち、分類上 *A. flavus* により近い *A. oryzae* 野生株が含まれる組み合わせにおいては、特に菌糸塊を生じることが分かった。生じる菌糸塊の形態にはバリエーションが見られ、菌糸が絡み合った構造を作るものと、硬い殻の様な構造を作るものとが存在した。硬い殻状構造の色は、白、黒、茶と様々であったが、今回の培養結果では色素沈着が進むような結果は特に見られていない。
殻状構造ついては、切断を行い、現在電子顕微鏡での観察を行っている。

Aspergillus oryzae, sexual cycle, mycelial pellet

講演番号：3A41p05
講演日時、会場：3 月 28 日 14:44～ A 校舎 41 会場

分裂酵母の細胞核サイズ制御機構に重要な遺伝子の探索

A screen for genes required for nuclear size control in fission yeast

○久米 一規[1]、Nurse Paul[2,3] ([1]広島大院・先端研、[2]英国癌研究所、[3]ロックフェラー大学)
○Kazunori KUME[1], Paul Nurse[2,3] ([1]Hiroshima Univ., [2]Cancer Research UK, [3]Rockefeller Univ.)

【目的】膜で包まれた細胞小器官である細胞核は、異なる生物種により、様々な核サイズをとることが知られているが、核サイズ制御機構の詳細については不明な点が多い。これまでに出芽・分裂の両酵母の研究から、核サイズは、細胞サイズに比例して増加し、核サイズと細胞サイズの体積比率（Ｎ／Ｃ ｒａｔｉｏ：ａ ｒａｔｉｏ ｂｅｔｗｅｅｎ ｎｕｃｌｅａｒ ｖｏｌｕｍｅ ａｎｄ ｃｅｌｌｕｌａｒ ｖｏｌｕｍｅ）は、細胞周期を通して、一定に保たれていることが明らかとなった[(1、2)]。さらに、興味深いことに、分裂酵母において、核サイズは、自身の細胞のもつＤＮＡ含量に依存せず、様々な細胞サイズ変異体において、ほぼ同じＮ／Ｃ ｒａｔｉｏを示すことがわかった[(1)]。しかしながら、細胞がいかにして核サイズを決定し、そのサイズを制御しているかについては不明である。そこで、本研究では、細胞核サイズの決定因子を同定するために、分裂酵母の非必須遺伝子破壊株（約３０００株）を用い、細胞核サイズ（Ｎ／Ｃ ｒａｔｉｏ）に異常を示す変異体のスクリーニングを行った。

【方法・結果】分裂酵母の非必須遺伝子破壊株を用い、３段階のスクリーニングをへて、核サイズに異常を示す変異体を選抜した。まず、第１次スクリーニングとして、核膜を含む脂質膜の染色剤を用い、寒天培地上で生育したそれぞれの破壊株の核サイズを観察し、核サイズ変異体（３６６株）を選抜した。次に、第２次スクリーニングでは、液体培養により、対数増殖期まで増殖した核サイズ変異体の核サイズを同様の染色法により観察し、９６株の核サイズ変異体を確認した。最後に、核膜マーカー・Ｃｕｔ１１−ＧＦＰを用い、選抜した核サイズ変異体のＮ／Ｃ ｒａｔｉｏを調べ、野生株と比較した。その結果、核サイズが、野生株よりも有意に変化する核サイズ変異体として、１２株を選抜した。現在、選抜した核サイズ変異体の原因遺伝子の機能と核サイズ制御との関連性を明らかにするために、解析をすすめている。

１）Ｎｅｕｍａｎｎ，ＦＲ，ａｎｄ Ｎｕｒｓｅ，Ｐ，ＪＣＢ，１２：５９３−６００，２００７．
２）Ｊｏｒｇｅｎｓｅｎ，Ｐ，ｅｔ ａｌ．ＭＢＣ，１８：３５２３−３５３２，２００７．

Nuclear size, Genome-wide screen, Fission yeast

講演番号：3A41p06
講演日時、会場：3 月 28 日 15:05～ A 校舎 41 会場

in vitro と *in vivo* で調べる分裂酵母の細胞質分裂の仕組み
in vitro and *in vivo* study of cytokinesis in fission yeast
○柏崎 隼、馬渕 一誠（学習院大理）
○Jun KASHIWAZAKI, Issei MABUCHI (Gakushuin Univ.)

細胞分裂は単細胞生物では増殖に、多細胞生物では発生、成長、個体の維持に必須の生命現象である。細胞分裂は核分裂と細胞質分裂の連続した二つのステップからなり、動物や菌類の細胞では、アクチンとミオシン II を主成分とした収縮環が分裂面の細胞表層に形成され、収縮環の収縮に伴って細胞膜がくびれ込むことで細胞質分裂が起こる。この時、収縮環が細胞膜を引っ張るだけでは大きな力が必要となるが、細胞表面積の増大、つまり細胞膜の伸展を起こすことで、その力を減少させることができると考えられる。細胞膜の伸展には、細胞膜の凹凸構造（微絨毛や突起、陥入構造など）の引き伸ばしと、細胞内からの膜小胞の融合が考えられる。多くの生物種で分裂部位に膜小胞が輸送されていることが知られており、動物細胞では細胞接着タンパク質など、菌類の細胞では隔壁（細胞壁、主にグルカンやキチンから成る）の合成に必要なタンパク質が輸送される。一方で、小胞輸送による膜そのものの供給について、詳しく解析された例はない。その原因として、分裂溝の進行が①収縮環の収縮、②細胞外基質の蓄積、③細胞膜の伸展の３つが協調することで起こるため、これらを分離して調べることが困難なためであろう。また、分裂溝ではエンドサイトーシスも起こっており、非常に複雑な現象といえる。本研究は、モデル生物である分裂酵母を用い、これらをうまく分離して研究する系の構築・解析を通してそれぞれの重要性について明らかにすることを目的としている。分裂酵母においても、隔壁の形成を阻害すると収縮環の収縮が起こらずに停止してしまうことが知られている。酵素処理により細胞壁を除去した球状のスフェロプラストでは、細胞外基質の蓄積、つまりグルカン合成を阻害すると収縮環形成もされない。一方で、我々は分裂酵母収縮環の *in vitro* 収縮系を構築したところ、細胞内での収縮よりも 20 倍以上速く収縮できることがわかった。つまり細胞壁、細胞膜からはずれた収縮環は速く収縮することができるのである。そこで、固い細胞壁のないスフェロプラストにおいても、最適な条件を整えることができればグルカン合成が抑えられているにも関わらず収縮環の収縮に伴って細胞膜をくびれ込ませることができると考えた。グルカン合成を抑えた状態でも酵母スフェロプラストはまるでウニの卵割のように細胞質分裂を完了し、収縮環の収縮速度についても顕著な低下はみられなかった。これらの系を用いることで、細胞質分裂において収縮環の収縮、細胞外基質の蓄積、細胞膜の伸展がそれぞれどの程度寄与しているのかを明らかにできると考えている。

cytokinesis, fission yeast

講演番号：3A41p07
講演日時、会場：3 月 28 日 15:16～ A 校舎 41 会場

分裂酵母のゴルジ体膜表在性タンパク質複合体 Gmp ファミリーの解析

Analysis of Golgi surface protein complex Gmp family in fission yeast

○大山 拓朗、中山 紗季、児子 隆英、田淵 光昭、田中 直孝（香川大・農・応用生物）
○Takuro Oyama, Saki Nakayama, Takahide Nigo, Mitsuaki Tabuchi, Naotaka Tanaka (Fac. Agr., Kagawa Univ.)

ゴルジ体は真核生物に見られるオルガネラの一つで、一定の間隔で袋状の膜構造を形成し、ER 側からシス、メディアル、トランス層板と呼ばれている。また、タンパク質の糖鎖修飾や目的地への選別輸送を行う機能を有している。ゴルジ体の層板間にはゴルジマトリックスタンパク質と呼ばれるその配列内に Coiled-Coil 領域を含んだタンパク質が存在し、ゴルジ体の構造保持や小胞の係留、層板の分裂や融合に関与していることが明らかになっているが、それらの詳しい機構に関しては不明な部分が多い。分裂酵母のゴルジ体は動物細胞のように明確な層板構造として観察され、ガラクトース修飾機構を有することから、形態だけでなく、機能的にも高等動物に近いと考えられる。

ゴルジ体形成に関与しているタンパク質を同定する目的で、ゴルジ体画分の TOF-MS 解析によって同定されたタンパク質群の中から機能未知の Coiled-Coil タンパク質 Gmp1 と Gmp2 を取得した。さらに、Gmp1 のホモロジー解析により、Gmp1 と比べて C 末端が 76 aa 短い Gmp3、Gmp1 より内部を 18 aa 欠失した Gmp4 を取得した。Gmp ファミリーはシグナルペプチドや膜貫通領域を持たず、他起源の生物と比較しても高いホモロジーを示すタンパク質はない。また、構造上の特徴として Gmp1、3、4 は Coiled-Coil を 3 箇所有している。*gmp1*Δ、*gmp3*Δ、*gmp4*Δ、*gmp1*Δ*gmp3*Δを取得し、表現型の解析を行った。その結果、各 *gmp* 破壊株は分泌糖タンパク質である酸性ホスファターゼやインベルターゼの糖鎖修飾異常を引き起こしていることが明らかになった。各 Gmp に GFP を付加し過剰発現させるとゴルジ体が凝集したような大きなドットが観察された。さらに、GFP を付加していない Gmp を過剰発現させたところゴルジ体マーカーである UDPーガラクトース輸送体 Gms1 を凝集させたことから Gmp ファミリーは過剰発現時にメディアルからトランス層板を凝集させていることが示唆された。各 *gmp* 破壊株にて Gmp ファミリーを過剰発現したところ、細胞質中へと拡散するものや、凝集が起こらないものなど局在の変化が見られ、複合体を形成していることが示唆された。また、ゴルジマトリックスタンパク質は Coiled-Coil を介して他のタンパク質と相互作用していることが知られている。各 Gmp の Coiled-Coil 欠損体を作製し、各 *gmp* 破壊株で過剰発現した結果、局在の変化が見られた。

これらのことから、Gmp ファミリーは過剰発現により特定のゴルジ層板を過剰リクルートすること、Coiled-Coil を介してゴルジ体への局在や複合体の形成、小胞の係留を行っていることが推定された。

S. pombe, Golgi, secretory pathway

講演番号：3A41p08
講演日時、会場：3 月 28 日 15:27～ A 校舎 41 会場

分泌経路で機能するレクチン様タンパク質 Emp43 の解析

Functional analysis of lectin like protain Emp43 in secretory pathway

○神谷 勇輝、川口 宗馬、梨子木 健人、鈴木 章太郎、田淵 光昭、田中 直孝（香川大・農・応用生物）
○Yuki Kamiya, Soma Kawaguchi, kento Nashiki, Shotaro Suzuki, Mitsuaki Tabuchi, Naotaka Tanaka (Fac. Agr., Kagawa Univ.)

分泌タンパクなどの多くの糖タンパク質は、粗面小胞体内腔において糖鎖を付加されると共に糖鎖を介した品質管理が行われる。正しい立体構造となった糖タンパク質はゴルジ体へ輸送された後、糖鎖のさらなるプロセシングが行われ、成熟した糖タンパク質となり細胞膜や液胞等へ選別輸送される。このようなタンパク質の分泌で重要な小胞体とゴルジ体の間には、ERGIC（ER-Golgi intermediate compartment）という区画が見られ、これはヒトを含む動物や植物に存在することが確認されている。ERGIC は分泌の中間区画であり、哺乳類において ERGIC に局在する ERGIC-53 は特定のカーゴのレセプターとして機能している。このタンパク質はカーゴタンパク質が正しくフォールディングされたことを、レクチンドメイン（糖結合部位）によって認識し、小胞体から ERGIC への小胞輸送に関わっていることが報告されている。しかし ERGIC のオルガネラとしての機能については詳細な解析が進んでいない。

分裂酵母においてヒト ERGIC-53 のホモログ *emp43*を取得し局在を観察したところ、ERES（ER Exit Site）やゴルジ体とも異なるドット状区画が見られたため、分裂酵母に置いて ERGIC が存在するかどうかを確認するため解析を行った。Emp43 は Brefeldin A 処理をしても、局在がドット状のままであることが確認された。Emp43 の機能に重要であると考えられた、C 末端細胞質領域に存在する局在モチーフ（KYL）をそれぞれアラニンに置換した株、C 末端細胞質領域の長さを伸長した株、および内腔に存在する Coiled-Coil 領域を欠損させた株では、著しい局在の変化が見られ、*emp43*Δ が示す $Mg2^{+}$ 感受性を相補できないことがわかった。また BN-PAGE で複合体解析をしたところ、Emp43 は未知の巨大な複合体を形成することが示唆されたほか、局在変化が確認された Emp43 は複合体を形成できないことが示唆された。以上の結果から、Emp43 の機能には、正しい局在と複合体形成が必要であることが考えられた。

ER to Golgi, secretory pathway, S. pombe

講演番号：3A41p09
講演日時、会場：3 月 28 日 15:38～ A 校舎 41 会場

分裂酵母の胞子細胞膜形成開始に関わる新規の遺伝子の取得と解析

Isolation and molecular dissection of novel genes involved in the initiation of spore membrane formation in fission yeast

○新美 柊子、中村 太郎（大阪市大院理）
○Toko NIIMI, Taro NAKAMURA (Osaka City Univ.)

【目的】

分裂酵母は、栄養が不十分な環境下では、減数分裂を行い、胞子を形成する。胞子形成時には、細胞内に新たな細胞膜として胞子細胞膜を形成する。このとき、SPB（スピンドル極体）の細胞質側に層状の構造が形成され、そこに膜小胞が集まる。そして、それらが融合することにより胞子細胞膜が形成され、伸長していく。この胞子細胞膜形成の開始において、SPB に局在するカルモジュリン，Spo2, Spo13, Spo15 というタンパク質が関わっているということが明らかになっている。しかしながら、胞子細胞膜形成の分子メカニズムについてはいまだ不明な点が多い。本研究は、胞子細胞膜形成に関わる新規の遺伝子を取得し、解析することを目的とする。

【方法・結果】

胞子形成に欠損が見られた 13 の変異株に、胞子細胞膜マーカーである GFP-Psy1 を組み込み、蛍光観察を行った。結果として、胞子細胞膜開始に関わると思われる遺伝子を 1 つ同定し、*spo45*⁺と命名した。Spo45 は膜貫通ドメインを持つタンパク質であったが、その詳細な機能は明らかになっていない。

Spo45 タンパク質の細胞内局在について調べたところ、主として SPB に局在していた。したがって、Spo45 は胞子細胞膜形成開始に関わる新たな SPB 因子である可能性が示唆された。次に、*spo45Δ*における既存の SPB 因子の局在を調べたところ、Spo2，Spo15 は SPB に局在できなかった。また、胞子細胞膜形成を生細胞で経時的に観察した結果、ほとんどの細胞で胞子細胞膜は形成されなかった。以上のことから、Spo45 は Spo15 や Spo2 を SPB にリクルートし、そこで胞子細胞膜形成開始を制御するはたらきを持つことが示唆された。現在、Spo45 との既存の SPB 因子との物理的相互作用を調べている。

fission yeast, spore membrane, spindle pole body

講演番号：3A41p10
講演日時、会場：3 月 28 日 15:49～ A 校舎 41 会場

出芽酵母前胞子膜形成における PI4P および PI 4-kinase Stt4 の役割
Roles of PI4P and PI 4-kinase Stt4 in prospore membrane formation of budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*
○中村 毅、奥村 祐哉、舘川 宏之（東大院・農生科・応生化）
○Tsuyoshi NAKAMURA, Yuya OKUMURA, Hiroyuki TACHIKAWA (Dep. Appl. Biol. Chem., Grad. Sch. of Agric. and Life Sci., The Univ. of Tokyo)

【背景・目的】 出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) の二倍体は、 栄養飢餓条件になると細胞内に 4 つの胞子を形成する。この胞子形成の過程において、前胞子膜と呼ばれる新規二重膜構造が形成され、ダイナミックに形態を変化させながら核やオルガネラを包み込む。出芽酵母の前胞子膜形成を「膜形成のモデル」 として捉えた研究は、真核生物に共通する生体膜の形成・形態変化メカニズムの解明に寄与することが期待される。我々は前胞子膜の伸長不全および胞子形成不全を示す変異株として *SPO73* の遺伝子破壊株を取得した。Spo73 は胞子形成時特異的に発現し前胞子膜上に局在するタンパク質で、Dysferlin domain という機能未知のドメインのみからなるが、膜形成に寄与する分子機構は不明である。この *spo73* 破壊株のマルチコピーサプレッサーとして PI 4-kinase である Stt4 の断片 (Stt4frag、kinase domain を含まない) をコードする遺伝子領域と、Stt4 とともに PI 4-kinase 複合体を構成する Efr3 の遺伝子を取得している。本研究では、取得された *spo73* 破壊株のマルチコピーサプレッサーが胞子形成能を回復する分子機構を解明するとともに、脂質、特に phosphoinositide の膜形成に対する寄与を明らかにすることを目指している。
【結果】1) マルチコピーサプレッサーのドメイン解析の結果、Stt4frag および Efr3 が *spo73* 破壊株の胞子形成能を回復するために必要な領域は Ypp1 と相互作用するために必要な領域と一致することがわかった。また、Stt4 全長の過剰発現はサプレッサーとして機能しないが、kinase dead 型 Stt4 の過剰発現はサプレッサーとして機能した。 2) PI 4-kinase の細胞内局在を観察したところ、Stt4 と Efr3 はどちらも前胞子膜上に局在することが判明した。3) PI4P 量と前胞子膜形成の関連が予測されたため、前胞子膜マーカーと脂質代謝酵素のキメラタンパク質による前胞子膜上の PI4P 操作を行った。Stt4 の kinase domain を融合したキメラタンパク質は *spo73* 破壊株の胞子形成能を回復しなかった。一方で、PI4P 4-phosphatase である Sac1 の phosphatase domain を融合したキメラタンパク質は *spo73* 破壊株の胞子形成能を部分的に回復した。4) AID (auxin-inducible degron) による Stt4 の conditional mutant を用いた実験から、*spo73* 破壊株において前胞子膜形成時に Stt4 を分解することにより胞子形成能が部分的に回復することが判明した。
【考察・展望】以上より、前胞子膜上の PI4P 代謝が膜伸長と関係することが強く示唆された。現在は phosphoinositide の膜形成に対する寄与に迫るために、脂質代謝酵素の AID conditional mutant を用いた網羅的解析を進めるとともに、脂質量の変化で影響を受ける因子の同定を目指している。

Saccharomyces cerevisiae, sporulation, PI4P

講演番号：3A41p11
講演日時、会場：3 月 28 日 16:10～ A 校舎 41 会場

出芽酵母におけるミトコンドリアへのホスファチジルエタノールアミンのオルガネラ間輸送における Sfh1p の機能

Characterization of Sfh1p Implicated in Phosphatidylethanolamine Influx into Mitochondria in *Saccharomyces cerevisiae*

○水池 彩[1]、小林 新吾[1]、太田 明徳[2]、堀内 裕之[1]、福田 良一[1] ([1]東大院・農生科・応生工、[2]中部大・応生・応生化)
○Aya MIZUIKE[1], Shingo KOBAYASHI[1], Akinori OHTA[2], Hiroyuki HORIUCHI[1], Ryouichi FUKUDA[1] ([1]Univ. Tokyo, [2]Chubu Univ.)

生体膜の主要構成成分であるリン脂質の一種、ホスファチジルエタノールアミン(PtdEtn)はミトコンドリアが機能を保つうえで極めて重要な脂質である。出芽酵母において、ミトコンドリアに局在する PtdEtn 合成酵素をコードする *PSD1* を破壊した株は、ミトコンドリア内の PtdEtn 量の低下のため呼吸機能欠損となり、乳酸などの非発酵性炭素源を資化できない。しかしながら、培地中にエタノールアミンを添加することにより、ケネディ経路を介した小胞体膜上での PtdEtn 合成が増強され、ミトコンドリア内 PtdEtn 量が回復し、呼吸機能欠損は抑圧される。このことから、他のオルガネラで合成された PtdEtn をミトコンドリアに輸送する機構が存在すると予想されるが、オルガネラ間の PtdEtn 輸送に関する知見は乏しい。

我々は、高発現により *psd1*Δ株のミトコンドリアの PtdEtn 量を増加させ、呼吸機能欠損を抑圧する因子として、*SEC14* ホモログの１つである *SFH1* を取得し、解析してきた。Sfh1p は細胞内で PtdEtn と結合していること、試験管内で人工膜より PtdEtn を引き抜くことができることなどから、Sfh1p がエンドソームの PtdEtn 合成酵素 Psd2p によって合成された PtdEtn のミトコンドリアへの輸送に関わる可能性が考えられた。本研究では、エンドソームで合成された PtdEtn のミトコンドリアへ輸送経路に関する知見を得るため、Sfh1p の細胞内局在や、ミトコンドリアと他のオルガネラのコンタクトサイトを構成する因子をコードする遺伝子と *SFH1* の遺伝学的相互作用について解析を行なったので報告する。

phosphatidylethanolamine, mitochondria, membrane contact site

講演番号：3A41p12
講演日時、会場：3 月 28 日 16:21～ A 校舎 41 会場

出芽酵母細胞壁β-1,6-グルカンの合成に関与する Kre9 と Kre6 の機能解析
Functions of Kre9 and Kre6 required for biosynthesis of fungal β-1,6-glucan
林田 光弘、○野田 陽一、依田 幸司（東大院・農生科・応生工）
Mitsuhiro HAYASHIDA, ○Yoichi NODA, Koji YODA (Univ. of Tokyo)

【目的】細胞壁は真菌の生育に必須であり、その合成機構の研究は新規抗真菌剤の開発に役立つことが強く期待される。出芽酵母の細胞壁はマンナンタンパク質、β-1,3-グルカン、β-1,6-グルカン、キチンから成る。β-1,6-グルカンの合成機構についてはそのほとんどが未解明である。*KRE9* と *KRE6* は，共にキラートキシン耐性を指標に取得され，その遺伝子産物はβ-1,6-グルカン合成経路で機能すると考えられる． *KRE9* にコードされる Kre9 蛋白質は、O 糖鎖修飾を受けること，過剰発現株において培地に分泌されることなどが Bussey らにより明らかにされているが、その機能については未解明である。一方、Kre6 は、Ⅱ型の膜貫通タンパク質で、UDP-グルコースの結合配列、グリコシダーゼと相同性を示す配列を持ち、ホモログの *SKN1* との二重破壊株では致死になることなどが報告されている。Kre6 に関しては，当研究室の栗田らによりその局在などの解析が行われ過去の大会で報告している。本研究では、Kre6 についてさらなる機能の解析を進めるとともに、Kre9 がどのようにβ-1,6-グルカン合成に関与しているか明らかにすることを目的とした.
【方法と結果】我々は，前回の本大会で、Kre9-3HA の局在解析の結果と，Kre6 がウエスタンにより二本のバンドとして検出され，泳動度の遅いフォームがリン酸化を受けた分子種であることを報告した。今回は，まず Kre6 のリン酸化酵素を探索するための実験を行った．EUROSCARF の遺伝子破壊株コレクションを用いて，非必須遺伝子にコードされるリン酸化酵素の遺伝子欠損株のライセートを調製し，Kre6 のリン酸化の有無を調べた。その結果、非必須のリン酸化酵素欠損株では，すべて Kre6 は野生型株と同程度のリン酸化を受けていることを見いだした．すなわちおそらく Kre6 は必須遺伝子にコードされるリン酸化酵素，もしくは重複した機能を持つ複数の酵素によりリン酸化されていると予想された。現在、それらの知見をもとにしたリン酸化酵素の絞り込み，ならびに質量分析による Kre6 のリン酸化部位の特定を進めている。また Kre9 に関しては以下の解析を行った．Kre9-6xHis を過剰に発現させた場合、以前に報告されている様に，Kre9 は培地中へも分泌されることを，今回新たに調製した抗体により検出した。また、培地中から検出される Kre9 は菌体内から検出される Kre9 に比べ、泳動度の遅い分子種が多く見られた。さらに、予備的な結果ではあるが，他のβ-1,6-グルカン合成関連タンパク質の遺伝子欠損株において Kre9-6xHis を過剰に発現させると、培地中の Kre9 の SDS-PAGE の際の泳動度や存在量が，野生株と比較して変化していることを見いだした．Kre9 の修飾や，局在化，輸送過程にこれらのタンパク質が関与している可能性が示唆された.

yeast, cell wall, membrane traffic

講演番号：3A41p13
講演日時、会場：3 月 28 日 16:32～ A 校舎 41 会場

出芽酵母の機能未知必須膜タンパク質 Pga2 の解析
Analysis of function unknown integral membrane protein Pga2 of *Saccharomyces cerevisiae*
高橋 竜一[1,2]、○鵜口 尚人[1,2]、野田 陽一[1,2]、依田 幸司[1,2] ([1]東大院農生科、[2]応生工)
Ryuichi Takahashi[1,2], ○Naoto Unokuchi[1,2], Yoichi Noda[1,2], Koji Yoda[1,2] ([1]Tokyo Univ., [2]Dept. of Biotech)

【目的】Pga2 は真菌類にのみホモログを持つ, ER に局在する機能未知の必須膜貫通型タンパク質である. 複数の研究グループによる網羅的解析の結果, *PGA2* の発現を抑制することで細胞壁合成に関わる GPI アンカー膜タンパク質である Gas1 および液胞アルカリホスファターゼ ALP のプロセシングに異常が生じること, ミトコンドリアが断片化すること, NPC のコンパートメントである Nic96 が誤局在することなどが報告されている. このように, Pga2 は様々な場所で重要な生理現象に関与していると考えられるが, その機能の本質に迫る報告は未だなされていない. 本研究では, *PGA2* の温度感受性変異株を作製し, この株を解析することで Pga2 の機能を明らかにすることを目的とした.
【方法】Pga2 は 129 アミノ酸からなり, N 末付近に膜貫通領域を一箇所持つ. *PGA2* の C 末端を段階的にトランケートし, C 末端から 80 アミノ酸削ることで著しい生育速度の低下を示した *pga2*$^{\Delta C80}$ を *pga2-1* と名付けた. このように作製した温度感受性変異株の表現型を解析するとともに, 間接蛍光抗体法やショ糖密度勾配遠心により細胞内のタンパク質の局在を解析した. さらに, 免疫沈降により Pga2 結合タンパク質の同定を試みた.
【結果】Pga2 の機能に重要な領域の特定も視野に入れ, C 末端から段階的にトランケートした結果, 80 アミノ酸削ると生育速度が著しく低下し(*pga2-1* 株), 85 アミノ酸削ると致死になることを見出した. *pga2-1* 株は 16℃で致死となる低温感受性の生育を示した.
野生型遺伝子にコードされる Pga2 と変異遺伝子にコードされる Pga2-1 について, C 末にタグを導入することにより, 間接蛍光抗体法で局在を観察した結果, いずれも小胞体への局在が観察された. また, *pga2-1* の表現型を解析したところ, *PGA2* の発現抑制株で報告されているのと同様に, ミトコンドリアの断片化及び ALP のプロセシング異常が観察された.
次に, 細胞破砕液をショ糖密度勾配遠心にかけ, ウエスタンブロットで *pga2-1* 株におけるタンパク質の局在を調べたところ, 小胞体トランスロコンである Sec61 および細胞質膜に局在する Pma1 のショ糖勾配中での分布パターン異常が見出された. この結果は, Pga2 が膜蛋白質や脂質の輸送, 局在に関与する可能性を示唆する.
また, 抗 myc 抗体による Pga2-6myc の免疫沈降結果から, Pga2-6myc 特異的に共沈するバンドが銀染色により 2 本検出され, 質量分析によりそのうちの一本に関しては候補蛋白質を得た. 現在もう一つの蛋白に関しても同定を進めている.

function unknown protein, membrane protein, protein localization

講演番号：3A41p14
講演日時、会場：3 月 28 日 16:43～ A 校舎 41 会場

出芽酵母におけるオートファゴソーム分解が脂質代謝に及ぼす影響

The influence of the degradation of autophagosomes for lipid metabolism in budding yeast

○前田 佑一郎、奥 公秀、阪井 康能（京大院農）
○Yuichiro MAEDA, Masahide OKU, Yasuyoshi SAKAI (Kyoto Univ.)

[目的]脂肪滴はトリアシルグリセロール(TAG)及びステロールエステル(SE)を主成分としており、真核生物に普遍的に存在する細胞小器官である。脂肪滴はエネルギー貯蔵だけでなく、ストレス耐性やタンパク質輸送という面においても重要な機能を果たしている。一方、脂肪滴の形成や分解については未だ不明な点も多い。近年、オートファジーが脂肪滴の分解に関わっていることが明らかになった。我々はオートファジーと脂質代謝の関連性を明らかにすることを目的としてモデル生物である *Saccharomyces cerevisiae* を用いて研究を行っている。前回大会で diauxic phase 以降に液胞内でオートファゴソームを分解することができない *atg15Δ*株において脂肪滴が顕著に減少することを報告した。しかしながら、*atg15Δ*株における脂肪滴が減少する原因は不明であった。そこで本研究では、*atg15Δ*株において脂肪滴が減少する原因を特定し、オートファジーと脂質代謝の関連性を明らかにすることを目的とした。
[方法・結果]*atg15Δ*株に脂肪滴に局在するリパーゼ遺伝子 *TGL3* 及び *TGL4* を欠損させた株を作成した。蛍光顕微鏡観察及び TAG・SE 測定により *atg15Δtgl3Δ*株、*atg15Δtgl4Δ*株、*atg15Δtgl3Δtgl4Δ*株において *atg15Δ*株でみられた脂肪滴の減少がうちけされた。この結果から、*atg15Δ*株では diauxic shift 以降に Tgl3, Tgl4 が活性化されていることが示唆された。野生株と *atg15Δ*株では Tgl 3 のタンパク質量は同程度であった。Tgl4 は野生株において diauxic shift 以降徐々にタンパク質量が減少していくのに対し、*atg15Δ*株では Tgl4 の減少が遅延していた。次に、*atg15Δ*株における脂肪滴分解が細胞内の脂質代謝にどのような影響を与えているかを調べるために細胞内の遊離脂肪酸及び、リン脂質、ジアシルグリセロール(DAG)量を測定したところ、*atg15Δ*株では野生株と比較していずれの脂質も増加していた。このことから、脂肪滴中の中性脂質が分解されることで、リン脂質合成が促進されていることが分かった。以上の結果より、オートファジーと脂質代謝に密接な関連があることが示唆された。

Lipid droplet, Autophagy, Lipolysis

講演番号：3A41p15
講演日時、会場：3 月 28 日 16:54～ A 校舎 41 会場

出芽酵母モノカルボン酸輸送体 Jen1 のグルコース不活性化に必要なアレスチン様タンパク質 Art4 による Jen1 認識領域の探索

Search for domains of monocarboxylic acid transporter Jen1 required for recognition by arrestin-like protein Art4 in glucose inactivation of Jen1 in Saccharomyces cerevisiae

○藤田 翔貴、五味 勝也、新谷 尚弘（東北大院農・生物産業創成）
○Shoki Fujita, Katsuya Gomi, Takahiro Shintani (Tohoku Univ.)

細胞の原形質膜上には核酸やアミノ酸、各炭素源など多様な栄養源を取り込む輸送体が存在している。細胞は刻々と変化する外界環境に対して、これら輸送体やレセプターの種類と量を最適化することで栄養源の取り込みやシグナル受容の調節を行っている。そして、この最適化は各タンパク質の合成及び分解の協調的な制御によって行われている。出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* のモノカルボン酸輸送体である Jen1 は、細胞内外のグルコースなど発酵性炭素源が枯渇した状況において遺伝子発現が脱抑制され、その遺伝子産物(Jen1)は原形質膜上へと輸送される。そして、原形質膜上に輸送された Jen1 は膜上で乳酸やピルビン酸の取り込みに貢献している。その一方で、発酵性炭素源存在下ではその遺伝子発現は抑制され、原形質膜上の Jen1 は直ちに分解される。一般的に、輸送体の膜からの取り込みはアダプタータンパク質を介した HECT 型 E3 ユビキチンリガーゼ Rsp5 によるユビキチン化が引き金となり起こる。また、細胞内に存在する複数のアダプタータンパク質によって、状況に応じた輸送体の分解が行えるよう選択性が生み出されていることも明らかになってきた。グルコースの存在での Jen1 の分解においては、膜上からの取り込みはアレスチン様タンパク質 Art4 が主要なアダプタータンパク質として機能している。それゆえ、Art4 が欠失してしまうと Jen1 の膜上からの取り込みは大幅に遅延する。このように、外界環境に応じた細胞膜上の品質管理においてアダプタータンパク質の働きは重要なものであるといえる。しかし、Art4 による Jen1 の認識機構は未だ不明であることから、その詳細な機構の解明を目指し本研究に着手した。

Jen1 は 12 回膜貫通ドメインを持ち、N 末端と C 末端領域はともに細胞質側に存在すると予想されている。本研究ではこれらの領域に着目し、N 末端と C 末端領域の部分欠損体やアミノ酸置換体を使用することで Jen1 分解における両領域の必要性を解析した。まず、蛍光顕微鏡観察やウェスタンブロット法を用いて、Jen1 の N または C 末端領域部分欠損体のグルコース刺激に応答した局在変化や分解を経時的に解析した。その結果、これらの変異体において膜上からの分解に遅延が生じた。さらに、それぞれの領域のアミノ酸置換体を用いた同解析においても、いくつかの変異体では原形質膜上からの取り込みが抑制された。次に、二分子蛍光相補試験(BiFC 法)により Jen1 と Art4 間の相互作用を解析したところ、両者の原形質膜上での相互作用が観察された。そこで、分解抑制が観察された変異体と Art4 間の相互作用を解析したところ、Jen1－Art4 間の相互作用の低下が見られた。これらの結果より、Jen1 の N 末端及び C 末端領域は Jen1 が細胞膜上から取り込まれる際に重要な領域であり、Art4 との結合やそれに引き続くユビキチン化に影響を及ぼしていることが推察された。

Saccharomyces cerevisiae, endocytosis, transporter

講演番号：3A41p16
講演日時、会場：3 月 28 日 17:15～ A 校舎 41 会場

リジン添加による出芽酵母アミノ酸トランスポーターのエンドサイトーシスを介した生育阻害

Growth inhibition by lysine-induced endocytosis of amino acid transporter in *Saccharomyces cerevisiae*

○山口 翔吾[1]、村尾 奈美[1]、河田 美幸[1,2]、関藤 孝之[1]、柿沼 喜己[1,2]（[1]愛媛大農、[2]愛媛大総合科学研究支援センター）
○Shougo YAMAGUCHI[1], Nami MURAO[1], Miyuki KAWANO-KAWADA[1,2], Takayuki SEKITO[1], Yosimi KAKINUMA[1,2] ([1]Ehime Univ., [2]INCS, Ehime Univ.)

【目的】出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の生育は、プロリンを唯一の窒素源とした培地（SD+Pro 培地）へのリジン添加により阻害される。我々は液胞内塩基性アミノ酸をサイトゾルへと排出するトランスポーターAvt4 を欠損するとリジンへの感受性が増すことを見出した。本研究では、液胞アミノ酸プールの生理機能を明らかにする目的で、リジン添加に伴う生育阻害の分子機構解明を目指した。
【方法】SD+Cas 培地（0.17% Yeast nitrogen base w/o amino acids and ammonium sulfate (YNB), 0.5% casamino acids, 0.5% ammonium sulfate, 2% glucose, 20 mg/L tryptophan）で対数増殖初期（$O.D._{660}$ =1.0）まで培養した細胞を SD+Pro 培地（0.17% YNB, 2% glucose, 10 mM proline）もしくは SD+Pro 培地にリジンを添加した SD+Pro+Lys 培地（リジン濃度: 固形培地 0.2 mM、液体培地 0.4 mM）に移し 30˚C で培養した。細胞内／液胞内アミノ酸含量はアミノ酸自動分析計により解析した。
【結果と考察】SD+Pro+Lys 培地において野生株、*avt4*Δ株ともに生育が低下したが、長時間培養すると野生株の生育が回復したのに対し、*avt4*Δ株は全く生育しなかった。SD+Pro+Lys 培地での培養 6 時間後では両株とも細胞内および液胞内のリジン含量が増加した一方、他のアミノ酸含量は低く抑えられた。特にプロリン含量は SD+Pro 培地での培養に比べ顕著に低下した。さらに培養を続けると、野生株のリジン含量は時間経過とともに減少し、プロリンをはじめその他のアミノ酸含量は増加した。一方、*avt4*Δ株ではリジン含量が比較的高く維持され、他のアミノ酸含量は低いままであった。プロリンを細胞内に取り込むトランスポーターPut4 は両株において SD+Pro 培地では細胞膜に局在したのに対し、SD+Pro+Lys 培地で培養 6 時間後には液胞内腔へと移行した。さらに細胞膜に恒常的に局在する変異型 Put4 を発現すると両株とも SD+Pro+Lys 培地での細胞内プロリン含量が増加し、生育が回復した。これらより SD+Pro+Lys 培地での生育阻害は、Put4 のエンドサイトーシスによるプロリン取込みの低下が原因であることが示唆された。Put4 のエンドサイトーシスにはユビキチンリガーゼ Rsp5 によるユビキチン化が必要である。Rsp5 による他のアミノ酸トランスポーターのユビキチン化は Torkcomplex 1（TORC1）の活性化により誘導される。*avt4*Δ株において TORC1 活性に必須な Tco89 を欠損すると SD+Pro+Lys 培地での生育が回復したことから、リジン添加による Put4 のエンドサイトーシスには TORC1 の活性化が関与することが示唆された。現在、Avt4 欠損の TORC1 活性への影響について検討中である。

Saccharomyces cerevisiae, Vacuole, Amino acid transporter

講演番号：3A41p17
講演日時、会場：3 月 28 日 17:26～ A 校舎 41 会場

出芽酵母 Ypq1、Ypq2、Ypq3 は液胞塩基性アミノ酸輸送に関与する
Saccharomyces cerevisiae Ypq1, Ypq2, Ypq3 are involved in vacuolar transport of basic amino acids

○真鍋 邦男[1]、村尾 奈美[1]、中村 恭輔[1]、河田 美幸[1,2]、関藤 孝之[1]、柿沼 喜己[1,2] ([1]愛媛大農、[2]愛媛大総合科学研究支援センター)
○Kunio MANABE[1], Nami MURAO[1], Kyosuke NAKAMURA[1], Miyuki KAWANO-KAWADA[1,2], Takayuki SEKITO[1], Yoshimi KAKINUMA[1,2] ([1]Ehime Univ., [2]INCS, Ehime Univ.)

【目的】出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の液胞は能動的な取込みにより、細胞全体の 70-90%の塩基性アミノ酸 (リジン、ヒスチジン、アルギニン)を蓄積する。最近、我々は Amino Acid/Auxin Permease (AAAP) superfamily に属する Avt1 がヒスチジンの液胞内への取り込みに機能するプロトン／アミノ酸アンチポーターであることを報告した(1)。動物リソソーム塩基性アミノ酸トランスポーターPQLC2 が属する Transporter-Opsin-G protein coupled receptor (TOG) superfamily には、*S. cerevisiae* Ypq1, Ypq2, Ypq3 も属している。本研究ではこれら Ypq タンパク質の液胞塩基性アミノ酸取込みへの関与について *YPQ1*、*YPQ2*、*YPQ3* 各遺伝子破壊の単離液胞膜小胞アミノ酸輸送活性の測定により検討した。
【方法】親株、*AVT1* および各 *YPQ* 遺伝子破壊株からフィコール密度勾配遠心により液胞膜小胞を単離し、ATP 存在下および非存在下での ^{14}C 標識アミノ酸の取り込み活性を測定した。また Sato らの方法(2)に従って、ATP 依存的な ^{14}C 標識アルギニンの取り込みのヒスチジンによる促進及び ATP 非存在下でのヒスチジン濃度勾配に依存した ^{14}C 標識アルギニンの取り込み活性を検討した。
【結果と考察】単離液胞膜小胞による ATP 依存的なリジン、アルギニン、ヒスチジンの取り込みは、それぞれ *YPQ1*、*YPQ1*／*YPQ2*、*YPQ3* の各遺伝子破壊により低下した。一方、チロシンの取込みはどの *YPQ* 遺伝子破壊によっても大きく変化しなかった。よって Ypq1 は液胞へのリジンおよびアルギニン、Ypq2 と Ypq3 はそれぞれアルギニンとヒスチジンの液胞内への取り込みに関与することが示唆された。次に *YPQ1* と *YPQ2* について Sato ら(2)が報告したアルギニン／ヒスチジン交換輸送活性への関与を検討した。*ypq1*Δ株の小胞では親株の小胞同様に ATP 依存的なアルギニン取り込みがヒスチジン添加によって増加したのに対し、*ypq2*Δ株及び *avt1*Δ株の小胞では顕著な増加はみられなかった。ATP 非存在下、小胞内外のヒスチジン濃度勾配により野生株および *avt1*Δ株の小胞がアルギニンを取り込んだのに対し、*ypq2*Δ株の小胞は顕著な取り込み活性を示さなかった。以上のことから、Ypq2 は以前報告されたアルギニン／ヒスチジン交換輸送活性の本体であり、Avt1 によって液胞内に取り込まれたヒスチジンの濃度勾配を駆動力とすることが示唆された。
【参考文献】
1) Tone J. *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem. in press*
2) Sato T, Ohsumi Y, and Anraku Y. *J. Biol. Chem.* 259:11505-11508 (1984).

Saccharomyces cerevisiae, Vacuole, Transporter

講演番号：3A41p18
講演日時、会場：3 月 28 日 17:37～ A 校舎 41 会場

出芽酵母のイソアミルアルコール誘導偽菌糸における細胞質微小管の伸長不全
Impairment of elongation in cytoplasmic microtubule during isoamyl alcohol-induced pseudohyphal formation of budding yeast.

○村田 和加惠[1,2]、金原 聡子[1]、北原 望[1]、荻田 亮[1,3]、藤田 憲一[1]、田中 俊雄[1] ([1]阪市大院理、[2]米子高専物質、[3]阪市大・健康研セ)
○ Wakae MURATA[1,2], Ssatoko KINPARA[1], Nozomi KITAHARA[1], Akira OGITA[1,3], Ken-ichi FUJITA[1], Toshio TNAKA[1] ([1]Grad. Sch. Sci., Osaka City Univ., [2]Yonago Natl. Coll. Technol., [3]Res. Center. Urban Health Sports, Osaka City Univ.)

イソアミルアルコール（IAA）は出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の偽菌糸形成を誘導する。酵母体から偽菌糸への形態変化にはダイナミックな細胞骨格の変動が関与している可能性が高い。IAA によって偽菌糸が誘導される際に、アクチンの細胞内レベルには変化が見られず、微小管の構成分子であるα-およびβ-チューブリンのレベルが低下する現象をウェスタン解析によって、また細胞周期の遅れもフローサイトメトリーによりすでに明らかとなっている。今回、偽菌糸の形態形成メカニズムを明らかにする一環として、IAA 誘導偽菌糸における細胞骨格の分布、特に細胞質微小管の伸長性について再検討を行った。

細胞骨格である微小管およびアクチンの細胞内の分布を、蛍光顕微鏡を用いて調べた。その結果、IAA 誘導偽菌糸形成細胞では、娘細胞の先端にアクチンが凝集し続け、紡錘体微小管の配向異常が観察され、さらに、細胞質微小管の伸長不全が観察された。以上の結果から、共焦点顕微鏡で微小管の観察を詳細に行った。IAA 誘導の偽菌糸形成細胞において、娘細胞の先端まで細胞質微小管が伸張しなかった細胞および伸長していても正常細胞より細い細胞質微小管が IAA 無処理細胞と比較して多数観察された。このことから、微小管の配向や伸長に関わるアクチン結合タンパク質と、それらと相互作用する微小管結合タンパク質との間に何らかの異常があるのではないかと考え、今回、出芽酵母においてアクチンと微小管をつなぐタンパク質である Bim1 と Kar9 に着目した。RT-PCR によってこれら遺伝子の RNA 転写量を調べた結果、IAA 無処理細胞と IAA 処理細胞の間で転写量の差はみられなかった。一方、局在を観察したところ、IAA 誘導偽菌糸における Bim1 の配向異常や、Kar9 においては、正常細胞ではほぼ見られない細胞の内部への局在が多く観察され、伸張不全にはこれらのタンパク質の関与が示唆された。

これらのことから、IAA 誘導偽菌糸において、細胞周期の遅れ、さらには細胞質微小管の伸長不全により細胞質分裂が正常に完了せず、細胞の先端にアクチンが凝集し続けることによって逆に細胞が伸長し続ける結果、偽菌糸が形成されるのではないかという仮説をうちたてた。

Saccharomyces cerevisiae, microtubule, pseudohyphae

講演番号：3A41p19
講演日時、会場：3 月 28 日 17:48～ A 校舎 41 会場

糖ペプチド解析による新規 ERAD 基質糖タンパク質の探索

Search for novel ERAD substrate glycoproteins by glycopeptide analysis

○細見 昭[1]、梶 裕之[2]、鈴木 匡[1] ([1]理研、糖鎖代謝学研究チーム、[2]産総研、糖鎖医工学研究センター)
○Akira HOSOMI[1], Hiroyuki KAJI[2], Tadashi SUZUKI[1] ([1]RIKEN, [2]AIST)

真核細胞の分泌経路において、分泌および膜タンパク質は最初に小胞体（Endoplasmic reticulum: ER）に運ばれ、シャペロンタンパク質によって立体構造が整えられる。正しい立体構造を獲得できたタンパク質はそれぞれの目的地に輸送される。一方、正しい立体構造を獲得できなかった（異常）タンパク質は細胞質に出され、ユビキチン-プロテアソーム系で分解される。この分解機構は小胞体関連分解（ER-associated degradation: ERAD）と呼ばれる。

細胞質 peptide:*N*-glycanase (PNGase)は ERAD において異常糖タンパク質から *N* 型糖鎖を切り離す酵素である。我々は出芽酵母を用いて PNGase 依存的 ERAD 経路の研究を行っている。しかしながら、これまでの研究では、多くの異常糖タンパク質で脱糖鎖型が検出されてこなかった。ゆえに、ERAD における PNGase の役割は未だに不明な点が多い。

細胞質 PNGase の ERAD における機能の重要性を明らかにするには、酵母が元々持っている PNGase 依存的に ERAD で分解される糖タンパク質が有用なツールになると考えられる。そこで、我々は、PNGase 依存的な内在性基質を検索する目的で、糖鎖付加位置特異的安定同位体標識法（Isotope-coded glycosylation site-specific tagging, IGOT）を用いて欠損株に特異的に細胞質に蓄積する糖タンパク質を探索した。その結果、内在性基質の候補タンパク質を得ることができたので報告する。

ERAD, PNGase, Glycoprotein

講演番号：3A41p20
講演日時、会場：3 月 28 日 17:59～ A 校舎 41 会場

嫌気条件下での耐熱性酵母 *Kluyveromyces marxianus* のミトコンドリア形態変化
Mitochondrial behavior of the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* under anerobic condition.

○賀川 翔太[1]、星田 尚司[2]、赤田 倫治[2]([1]山口大・工・応化、[2]山口大・医系・応用分子生命)
○ SHOTA KAGAWA[1], HISASI HOSIDA[2], RINJI AKADA[2] ([1]Yamaguchi Univ.Faculty of Engineering.Department of Applied Chemistry, [2]Yamaguchi Univ.Graduate School of Medicine.Applied Molecular Bioscience)

酵母によるアルコール発酵は、酸素を必要とせず，嫌気的条件で ATP が生産できる。一方、酸素が豊富にある好気的環境においての ATP 生産は，ミトコンドリアの機能に多くを依存している。嫌気的なエタノール発酵に好気的条件で必要なミトコンドリア機能がどのように関与しているかは詳しく知られていない。そこで本研究では、エタノール発酵とミトコンドリアの関連を調べるために，高温でのバイオエタノール発酵に適した耐熱性酵母 *Kluyveromyces marxianus* を用いて，嫌気条件下でミトコンドリアの形態変化を観察した。

ミトコンドリア局在シグナルを N 末にもつ yEGFP(NcSu9-yEGFP)を *K. marxianus* に導入し、ミトコンドリアの形態を蛍光で観察した。好気条件下で培養すると緑色蛍光は一般的なミトコンドリア形態と一致し、細胞周辺にドット状に観察された。酸素吸収剤を用いた 30℃，嫌気条件下で培養した酵母の蛍光を観察すると、培養 6 時間後に細胞内に比較的大きな円形の蛍光が多くの細胞で観察された。嫌気条件下で 9 時間培養するとほとんどの細胞で緑色蛍光は大きな円形で存在した。嫌気条件で培養した細胞を液胞膜を染色する蛍光色素 FM4-64 で染色すると，NcSu9-yEGFP の蛍光は液胞内に存在していることが分かった。また、45℃嫌気条件で 6 時間培養した酵母では，30℃に比べ液胞で緑色蛍光を示す細胞の割合が多かったが，9 時間後では温度による大きな差は見られなかった。

ミトコンドリアが液胞に局在したことからマイトファジーにより嫌気条件下でミトコンドリアが液胞に運ばれているのではないかと考えた。そこで *K. marxianus* のオートファジー関連遺伝子である *ATG11* を破壊し、NcSu9-yEGFP を導入して嫌気条件下で蛍光を観察した。*atg11* 破壊株では NcSu9-yEGFP は培養 9 時間後でも，半数程度の細胞でミトコンドリアはドット状に分布し、24 時間、嫌気条件で培養するとほとんどの細胞が液胞局在を示した。この結果から，嫌気条件下で *K. marxianus* はマイトファジーを引き起こし，*atg11* 破壊株ではマイトファジーが遅延することが示唆された。

mitochondria, anaerobic condition, *Kluyveromyces marxianus*

講演番号：3B21a01
講演日時、会場：3 月 28 日 09:00～ B 校舎 21 会場

Streptomyces 属放線菌 C42 由来のセルロース分解遺伝子カセットの構築とセルロース分解能の異種発現

Construction of cellulose-degrading gene cassettes from *Streptomyces* sp. C42 and the heterologous expression of cellulase degradability

○春日 和[1]、千田 優香[1]、興野 峻一郎[1]、友常 久実子[1]、牟田口 祐太[1]、志村 洋一郎[1]、石川 淳[2]、池田 治生[3]、小嶋 郁夫[1]（[1]秋田県大生資、[2]国立感染研、[3]北里大・北里生命研）
○Kano Kasuga[1], Yuka Chida[1], Shun-ichiro Kyono[1], Kumiko Tomotsune[1], Yuta Mutaguchi[1], Yoichiro Shimura[1], Jun Ishikawa[2], Haruo Ikeda[3], Ikuo Kojima[1] ([1]Dept. Biotechnol., Akita Pref. Univ., [2]National Institute of Infectious Diseases, [3]Kitasato Inst. Life Sci., Kitasato Univ.)

【背景・目的】

Streptomyces 属放線菌は、有用な抗生物質生産菌として高度に産業利用されている。一方、自然界において放線菌はセルロース系バイオマスの分解者であり、これまでに放線菌由来のセルラーゼやその遺伝子が報告されている。我々は、セルロース系バイオマスを原料とする抗生物質発酵生産系の確立をめざし、セルロース分解性放線菌、およびその有用なセルラーゼ遺伝子群を探索している。これまでにセルラーゼを高分泌する放線菌 *Streptomyces thermocarboxydus* C42 株を単離し、C42 株ゲノムのドラフトシーケンスより 9 種類の推定セルラーゼ遺伝子(*cel5A*, *cel5B*, *cel6A*, *cel6B*, *cel6C*, *cel9A*, *cel12A*, *cel12B*, *cel48A*)とキシログルカナーゼ遺伝子(*xeg74A*)を見出し、これら遺伝子の発現と機能の解析を行った。5 種のセルラーゼ遺伝子の上流域には CebR box というオペレーター配列が見出され，セロビオースによる発現制御を受けることがわかった。

本研究では，セルロースを高含量で含むセルロース系バイオマスを発酵原料として有用な抗生物質を生産できる放線菌の分子育種を目指している。そのため、C42 株から見出された 10 種類の遺伝子を組み合わせ、異種放線菌でセロビオース(CB)によりセルロース分解能が導かれるセルロース分解遺伝子カセットを構築し、このカセット導入により放線菌へのセルロース分解能が付与されるか検討することを目的とした。

【方法・結果】

セルラーゼおよびキシログルカナーゼの合計10遺伝子を各遺伝子が本来持つプロモーターやCebR box と共にクローン化し、染色体組込み型ベクターpTYM19 に連結してセルロース分解遺伝子カセットをもつ pBOM51 を構築した。また、セルロース分解の初期に関与すると推定される *cel5A* の上流にリボソームタンパク質遺伝子プロモーターP*rpsJ* を組込んだ pBOM66 を構築した。

pBOM51 を放線菌 *Streptomyces avermitilis* SUKA1 に導入し、グルコースを含む GPY 培地とセロビオースを含む CBPY 培地で形質転換体を培養し、培養上清の CMC 分解酵素(CMCase)活性及び濾紙分解酵素(FPase)活性を測定した。その結果、有意な CMCase、FPase 活性の発現を確認した。現在、pBOM66 を SUKA1 に導入し、発現したセルラーゼ活性を pBOM51 導入株のものと比較検討している。

cellulase, *Streptomyces thermocarboxydus*, heterologous expression

講演番号：3B21a02
講演日時、会場：3 月 28 日 09:11～ B 校舎 21 会場

Streptomyces rochei 7434AN4 株の線状ゲノムの塩基配列解析
Nucleotide sequence of a linear genome of *Streptomyces rochei* strain 7434AN4

○稲田 晋宣[1]、曹 志生[2]、ニンディタ ヨシ[2]、張 奕雯[2]、田上 道平[3]、レジャヴァ アレキサンダー[3]、志波 優[4]、吉川 博文[4]、石川 淳[5]、木梨 陽康[2]、荒川 賢治[2] ([1]広島大・自然科学セ、[2]広島大院・先端研、[3]理研・OSC、[4]東農大・応生科、[5]国立感染研)
○Kuninobu INADA[1], Zhisheng CAO[2], Yosi NINDITA[2], Yiwen ZHANG[2], Michihira TAGAMI[3], Alexander LEZHAVA[3], Yuh SHIWA[4], Hirofumi YOSHIKAWA[4], Jun ISHIKAWA[5], Haruyasu KINASHI[2], Kenji ARAKAWA[2] ([1]N-BARD, Hiroshima Univ., [2]Grad. Sch. AdSM, Hiroshima Univ., [3]RIKEN, [4]Tokyo Univ. of Agric, [5]NIID)

【目的】放線菌 *Streptomyces rochei* 7434AN4 株は抗生物質ランカサイジン、ランカマイシンを生産する。また本菌は 3 つのプラスミド（pSLA2-L、M、S）を保持しており、染色体およびこの全てのプラスミドが線状構造をしているという特徴を持つ。この 3 つの線状プラスミドについてはその全塩基配列を決定し、抗生物質生産遺伝子や生体防御関連の遺伝子がプラスミド上にコードされていることを明らかにした。本研究では *S. rochei* 7434AN4 株の染色体の全塩基配列を決定し、染色体やプラスミドの起源や構造相関性、さらにアーム領域に含まれる二次代謝遺伝子群の詳細解析を目指した。
【方法および結果】
これまで、*S. rochei* 7434AN4 株のゲノム解析を Illumina GAII シークエンサおよび Roche 454 シークエンサを用いて解析した結果、500 bp 以上の hybrid contig が 213 個得られた。この結果と既にその配列が決定されているプラスミドの結果と合わせて解析した結果、約 8.5Mb の染色体由来の配列が得られた。今回、新たに PacBio RS II を用い解析を行った。その結果、3 SMART Cell シークエンシング解析で合計 688Mb のデータが得られた。これらの次世代シークエンサによるゲノム解析結果および近縁種の *S. hygroscopicus* 5008 株のゲノム配列を合わせて解析した結果、全長約 8.4Mb の 9 個の領域（コンティグ）まで絞り込むことができた。このゲノムサイズは他の *Streptomyces* 属放線菌と同程度の大きさであった。
全ゲノム解析を行うに当たり、rRNA(16S-23S-5S)に着目して解析を行ってきた。これまで 23S および 5S の下流部の領域の塩基配列の比較解析から、*S. rochei* 7434AN4 株は他の *Streptomyces* 属放線菌と同様に染色体上に 6 コピーの rRNA を保持していることが示唆されていた。今回のゲノム解析の結果から 23S および 5S の下流部の領域に相当する配列が 6 箇所あり、前回の結果を支持するものであった。一方、16S およびその上流を含む配列は 7 箇所存在していた。9 コンティグの連結および rRNA の構造について現在詳細な解析を行っている。さらに二次代謝クラスターの解析を行ったところ、本菌の線状染色体上にはポリエン抗生物質ペンタマイシン生合成遺伝子を含めた PKS クラスターが 7 つ見つかり、その他の二次代謝遺伝子クラスターを含めると 30 種類以上の二次代謝遺伝子クラスターが見つかった。

Streptomyces, genome sequence, linear genome

講演番号：3B21a03
講演日時、会場：3 月 28 日 09:22～ B 校舎 21 会場

接合伝達を用いた遺伝子導入法の最適化

Optimization of the gene transfer system by using the RK2 conjugal transfer.

○横井 崇紘[1]、森 浩禎[3]、板谷 光泰[2]、片岡 正和[1] ([1]信州大学、[2]慶応義塾大学、[3]奈良先端科学技術大学院大学)
○Takahiro Yokoi[1], Hirotada Mori[3], Mitsuhiro Itaya[2], Masakazu Kataoka[1] ([1]Sinshu Univ., [2]Keio Univ., [3]Nara Institute of Science and Technology)

接合伝達は、多剤耐性菌の出現や遺伝子の水平伝播による細菌の高速進化に関与していると考えられている。これまで多種の接合伝達性プラスミドが同定されており、F因子やR因子は遺伝学および細菌の遺伝的多様性の解釈に大きな影響を与えた。また、これまでの報告から接合伝達はゲノムサイズのDNAを、物理的なせん断を回避して可動化させる能力がある事が分かっている。IncPグループに属するRK2プラスミドやIncWに属するR388プラスミドなどはグラム陰性菌、陰性菌に関係なく、多種の細菌に対する接合伝達能を持つ事が知られている。

近年、次世代シークエンサーが開発され様々な微生物のゲノム情報が迅速に得られるようになり、多くのゲノム情報がデータベースに蓄積しつつある。しかし、現場での巨大遺伝子の取り扱いには実験科学上の大きな障壁が残っている。遺伝子解析において細胞への遺伝子導入は欠かせない技術であるが、多くの細菌において巨大な遺伝子の導入は難易度が高い。さらに野生株の多くは形質転換法が開発されていない、または効率が低く実用的でない株が多くを占める。私の研究ではこれらの障壁を克服し、効率的な遺伝子操作手法を構築するためにIncPグループに属するRK2を用いた接合伝達による遺伝子導入法の最適化を目指した。

RK2は多くの細菌に対する接合伝達能が見出されているが、グラム陽性菌に対する実用的な系の最適化は進んでいない。本報告では、グラム陽性菌のモデル生物である枯草菌に対するRK2の接合伝達能を評価し、最適化を行った結果を報告する。

Conjugation, Bacillus subtilis, Bacteria

講演番号：3B21a04
講演日時、会場：3 月 28 日 09:33～ B 校舎 21 会場

放線菌プラスミド pSN22 由来接合伝達遺伝子による染色体移行の解析

Analysis of chromosomal mobilization using conjugal transfer related gene from *Streptomyces* plasmid pSN22

○村端 広介、金 眞熙、宮武 徹、横井 崇紘、片岡 正和（信州大院理工）
○Kosuke Murabata, Jin Hee Kim, Tetsu Miyatake, Takahiro Yokoi, Masakazu Kataoka (Shinshu Univ.)

抗生物質生産菌として工業的に利用される放線菌は、遺伝子水平伝播の一つである接合伝達により、種間でプラスミドを移動するとともに、染色体も移行させる。遺伝子水平伝播は、有性生殖システムをもたない細菌における遺伝的多様性獲得の推進力となり、放線菌でも接合伝達を用いることで遺伝的多様性を増加させてきたと考えられる。当研究室では、*Streptomyces nigrifaciens* 由来の接合伝達性プラスミド pSN22 の解析を進めている。pSN22 の接合伝達は、4 つの遺伝子群（*traR,traA,traB,spdB*）に依存しており、膜に局在する TraB タンパク質が、接合伝達時の DNA 輸送チャネルとして主要な役割を担うことを明らかにしている。現在までに、pSN22 の接合伝達に必要な最小領域の決定し、プラスミド伝達に伴う宿主染色体の可動化を確認している。本研究では、プラスミド伝達に伴う宿主染色体移行に着目し、染色体移行現象について詳細に解析することとした。他グループの過去の研究では、*Streptomyces lividans* 由来の伝達性プラスミド pIJ101 の接合伝達関連遺伝子 *tra* およびその転写制御因子 *korA* の *S.lividans* の染色体内への導入によって、低頻度ではあるが染色体移行能の向上が確認されている。さらに *korB* の下流域のシス因子 *cis*‐acting locus of transfer (*clt*)が、接合伝達における効率的なプラスミド輸送に必要であることも確認されている。今回我々は、pSN22 上にコードされている *traR, traA, traB, clt* を *S.lividans* の染色体内に導入することで染色体移行能が効率的に引き起こされるか否かを検定した。

染色体内への接合伝達関連遺伝子の組み込みには、actinophage phiC31 由来の integrase および *att* サイトを用いた部位特異的組換えを用いた。染色体移行能の評価は、移行後の受容菌染色体との組換え効率を定量化した。現在までに pSN22 由来の *tra* 遺伝子群の導入により、pIJ101 伝達因子導入時よりも、100 倍以上高い効率の染色体組み換え体の出現を確認した。さらに、*traB* の下流域に存在している *clt* を欠損させることで染色体移行効率の大幅な低下が見られた。

本研究は、生物進化の歴史を明確にする可能性だけでなく、大規模な遺伝情報の交換操作技術の確立による放線菌を宿主とした新規合成微生物学への貢献と、二次代謝産物を利用した新薬、健康食品の開発など次世代生物工学分野への貢献へと繋がることが期待できる。

Streptomyces, chromosomal mobilization, conjugal transfer

講演番号：3B21a05
講演日時、会場：3 月 28 日 09:44～ B 校舎 21 会場

ナフタレン分解プラスミド NAH7 の接合伝達宿主域に関する研究

Host Range of Conjugation System Encoded by Naphthalene-Catabolic Plasmid NAH7

○岸田 康平、大坪 嘉行、永田 裕二、津田 雅孝（東北大学・院生命）
○Kohei Kishida, Yoshiyuki Ohtsubo, Yuji Nagata, Masataka Tsuda (Tohoku Univ.)

【背景・目的】プラスミドの接合伝達による遺伝子の水平伝播は微生物の多様な環境への適応進化に大きく貢献している。現在まで F や Ti プラスミド等のモデルプラスミドにおける接合伝達の分子機構の概略が解明されてきている。だが、プラスミドの宿主域に関する知見は乏しい。また、プラスミドが伝達可能な受容菌の範囲を示す接合伝達宿主域はプラスミドにより異なるが、「接合伝達宿主域」の評価は不十分である。従来の実験系では接合伝達後の複製・維持機能も含む宿主域が評価されている場合が多いが、受容菌内に接合伝達されても複製できないプラスミドも見出されており、このような場合には「接合伝達宿主域」が正しく評価されているとは言い難い。これまでに当研究室では、γ-proteobacteria に属する *Pseudomonas putida* G7 株由来の自己伝達性プラスミド NAH7 の宿主域について検討してきた。供与菌を G7(NAH7)株、受容菌を α-、β- proteobacteria の細菌株として接合伝達試験を行ったところ、接合伝達体は出現しなかった。また、NAH7 が α-、β- proteobacteria の細菌株へ接合伝達できなかったのか、複製維持ができなかったのかは不明であった。本研究では、α-、β- proteobacteria 属の細菌株の接合伝達体が出現しない原因と接合伝達宿主域の規定メカニズムの解明を目指した。
【方法・結果及び考察】実験的に同定した NAH7 の *oriT* を広宿主域性の複製・維持能を持つベクターにクローニングしたプラスミド pNAH7oriT を作製し、本プラスミドを用いて接合伝達宿主域を複製宿主域と区別して評価する系を構築した。供与菌を pNAH7oriT と NAH7 を保持する株、受容菌を複数の α-, β-proteobacteria の細菌株として、pNAH7oriT の接合伝達試験を行った。その結果、使用したほとんどの細菌株に pNAH7oriT が接合伝達し、NAH7 が α-、β- proteobacteria の細菌株内で複製維持できないことが、接合伝達体が出現しない原因であることが示唆された。だが、*Sphingobium japonicum* UT26 株へは pNAH7oriT も接合伝達しなかった。UT26 株は pNAH7oriT を複製維持できるので、接合伝達過程に障害があり、pNAH7oriT を受容できなかったと考えられた。次に接合伝達宿主域の規定メカニズムを明らかにするため、pNAH7oriT を獲得できるようなった UT26 変異株の取得を目指した。そこで、UT26 株のトランスポゾン挿入変異株ライブラリとアクチベーションタギングライブラリに加え、UT26 株と近縁株であり、pNAH7oriT を受容することができた *Sphingobium* sp. MI1205 株のゲノムコスミドライブラリを挿入した UT26 株を作製した。現在、受容菌をこれら UT26 株の変異株ライブラリとして接合伝達試験を行い、pNAH7oriT を受容できるようなった UT26 変異株の取得を試みている。

plasmid, conjugation, pseudomonas

講演番号：3B21a06
講演日時、会場：3 月 28 日 10:05～ B 校舎 21 会場

オガ粉を使用しない食用キノコの栽培

Sawdust-free cultivation of edible mushrooms

○川手 亮、吉野 一晴、渡邉 彰、麻田 恭彦（香川大農）
○Makoto KAWATE, Issei YOSHINO, Akira WATANABE, Yasuhiko ASADA (Kagawa Univ.)

【目的】 現在、ほとんどの食用キノコは菌床栽培（オガ粉に米ぬかなどの栄養物を添加した培地を用いる栽培方法）で人工栽培されており、オガ粉の供給不足が深刻化している。さらに、毎日膨大な量が発生する廃菌床（キノコ収穫後の残渣培地）の処理も大きな問題となっている。そこで本研究では、これらの問題点の解決を目指し、オガ粉の代替品を用いる新規食用キノコの栽培方法を開発することを目的とした。また、菌床を使用しない液体栽培方法についても検討を行った。

【方法・結果】 (1)使用した食用キノコ

本研究では、代表的な食用キノコであるエノキタケ、ヒラタケ、ナメコ、エリンギ、ブナシメジ、およびハナビラタケを使用した。栽培条件は各キノコにおける通常の菌床栽培条件に基づいて行った。

(2) オガ粉の代替品として竹粉を用いる食用キノコの栽培

竹は豊富に存在する未利用資源の一つである。そこで、粉末化した竹（竹粉）をオガ粉の代替品とする菌床培地（竹粉培地）を作成して、各種食用キノコの栽培を行った。その結果、エノキタケとヒラタケにおいては竹粉培地栽培でも通常の菌床栽培（オガ粉を使用）と同等の菌糸生育と子実体収量が得られることが明らかとなった。また、ナメコ、エリンギ、およびブナシメジにおいても竹粉培地での栽培が可能であることが認められた。ハナビラタケにおいては、竹粉培地では菌糸生育が顕著に抑制され、子実体形成には至らなかった。

(3) オガ粉の代替品としてファルカタ粉を用いる食用キノコの栽培

マメ科の広葉樹であるファルカタは東南アジアで広く栽培されており、他の広葉樹よりも早く、わずか 7 年ほどで成木に成長する。そこで、オガ粉の代替品としてファルカタの粉末（ファルカタ粉）を用いて各種食用キノコの栽培を行った。その結果、エノキタケ、ヒラタケ、ナメコ、およびエリンギにおいて子実体形成が認められた。ブナシメジにおいてはファルカタ粉培地では菌糸生育が阻害され、子実体形成まで至らなかった。

(4) 液体培地を用いる食用キノコの栽培

菌床培地を使用しない、液体培地を用いる食用キノコの栽培方法についても検討を行った。液体培地には米ぬか熱水抽出液、オガ粉熱水抽出液と米ぬか熱水抽出液の混合液、および GPY 液体培地（グルコース 5%、ペプトン 0.25%、酵母エキス 0.25%）を用いた。各種食用キノコは上記の各液体培地において良好な菌糸生育を示した。現在、子実体発生処理を行っている。

edible mushrooms, cultivation, falcata

講演番号：3B21a07
講演日時、会場：3 月 28 日 10:16～ B 校舎 21 会場

バニリン添加時の選択的白色腐朽菌のプロテオーム解析

Proteomic analysis of a selective white-rot fungus exposed to vanillin

○渡邊 崇人、吉岡 康一、李 俊錫、西村 裕志、渡辺 隆司（京大・生存研）
○Takahito WATANABE, Koichi YOSHIOKA, Junseok LEE, Hiroshi NISHIMURA, Takashi WATANABE (RISH, Kyoto Univ.)

【目的】選択的白色腐朽菌 *Ceriporiopsis subvermispora* は，「①酵素を細胞壁内に進入させずにリグニンを高選択的に分解する；②木材腐朽初期に長鎖脂肪酸の分泌と過酸化を活発に起こす；③リグニンペルオキシダーゼ活性を有しない；④セルロース分解の原因となる水酸化ラジカルを新規代謝物 ceriporic acid(s) で抑制する；⑤セロビオヒドロラーゼ活性を有しない」等，白色腐朽菌のモデル種である *Phanerochaete chrysosporium* 等とは異なる特徴を有する．これまでに本研究室では，*C. subvermispora* の選択的リグニン分解機構の解明の一環として，リグニンの生分解時に見出されるリグニン分解フラグメントの 1 つであるバニリンに注目し，脂質関連代謝物の定量解析やバニリンで転写が誘導される遺伝子のクローニング等を行ってきた [1)]．しかしながら，近年，本菌のゲノム情報が利用できるようになったことから [2)]，今回，プロテオミクスの手法を用いてバニリンに対する細胞応答をタンパク質のレベルで解析することを試みた．

【方法・結果】グルコースを炭素源とする液体合成培地にバニリン添加及び非添加の条件で *C. subvermispora* をそれぞれ培養した．バニリン添加の培養条件においては，グルコースの著しい消費及び大量の菌体外多糖の産生が認められた．そこで，菌体外多糖を除去し，菌体内タンパク質を調製する方法をまず確立した．次に，バニリン添加及び非添加の培養条件で調製した 2 種類のタンパク質を異なる波長を持つ 2 種類の蛍光色素で標識し，混合後，二次元電気泳動に供した．泳動後，それぞれの蛍光波長でゲルイメージを異なる色で取得し，それらを重ね合わせることで色の違いから発現量の変化を視覚的に捉えることが可能となった．また，ゲルよりタンパク質のスポットを切り出し，トリプシン消化後，MALDI-TOF-MS による測定を行った．さらに，得られた測定データと *C. subvermispora* のタンパク質のデータベースを用いて Peptide Mass Fingerprinting 法によるタンパク質の同定を行った．今回までに同定できたタンパク質とこれまでに Suppression Subtractive Hybridization 法によって同定したバニリンで誘導される遺伝子 [3)] を比較し，代謝経路の予想等を現在行っている．

1) Watanabe, T. *et al*., *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **87,** 215-224 (2010).
2) Fernandez-Fueyo, E. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109,** 5458-5463 (2012).
3) 渡邊崇人ら，第 13 回糸状菌分子生物学コンファレンス講演要旨集 (2013), p. 36.

proteomic analysis, white-rot fungus, vanillin

講演番号：3B21a08
講演日時、会場：3 月 28 日 10:27～ B 校舎 21 会場

アルファルファ根粒菌の共生系レセプター遺伝子 mcpS の発現と欠損株相補能の解析
Expression of symbiotic receptor *mcpS* in *Sinorhizobium meliloti* during nodulation and its complementation test
柴田 椋太、二宮 道歩、杉野 裕哉、栗田 将平、○田渕 晃（信州大農・応用生命）
Ryouta Shibata, Michiho Ninomiya, Yuuya Sugino, Shouhei Kurita, ○Akira Tabuchi (Shinshu Univ.)

アルファルファ根粒菌 *Sinorhizobium meliloti* には，9 種のメチル基受容化学走性タンパク質 MCP が存在する．9 種の MCP 遺伝子（*mcp*）のうち， *mcpS* が欠損した *S. meliloti*, Δ*mcpS*, では，根粒数の増加，形成根粒におけるニトロゲナーゼ活性の低下，根粒中のレグヘモグロビンの形成異常などが観察されている．これらの結果は，*mcpS* が宿主植物 alfalfa との共生系を確立する上で重要な機能をもつことを示唆する．

今回，私達は，*mcpS* を含むプラスミド pBS1059 を用いて Δ*mcpS* の相補試験（成育，根粒数，ニトロゲナーゼ活性について）を行った．また，*S. meliloti* WT を用いて，根粒形成にともなう *mcpS* の発現解析を行った．

【方法】（1）Δ*mcpS* の相補試験：発芽 4 日目の alfalfa に pBS1059 を導入した Δ*mcp*S 株（Δ*mcpS*／pBS1059）を接種した後，22℃で培養した．菌接種後 4 週間培養したところで，形成された根粒数の計測及びアセチレン還元法による形成根粒のニトロゲナーゼ活性の測定を行った．さらに，根粒を破砕後，Δ*mcpS*／pBS1059 を抽出･単離し，レプリカ法により，pBS1059 の安定性の調査を行った．
（2）*mcpS* の発現解析：先ず，*S. meliloti* WT を alfalfa に接種した後， 1 週間毎に alfalfa 根部及あるいは根粒からトータル RNA の抽出を行った. このトータル RNA を用いて RT–PCR を行った後，アガロースゲル電気泳動により PCR 産物の解析を行った．

【結果】（1）Δ*mcpS*／pBS1059 によって形成された根粒のニトロゲナーゼ活性は，WT 形成根粒の 27%の値を示した．根粒形成過程における pBS1059 の安定性は，４%の値を示した．さらに，この根粒から，回収し再単離した Δ*mcpS*／pBS1059（Δ*mcpS*／pBS1059R）を再度 alfalfa に接種し，形成した根粒に関して，同様の実験を繰り返し行ったところ，ニトロゲナーゼ活性及び pBS1059R の安定性は WT の場合とほぼ同様の値を示した．
（2）WT における *mcpS* の発現は根粒形成に伴うニトロゲナーゼ活性の増加と共に増加した．

【考察】（1）Δ*mcpS* の性質等が pBR1059R によって相補されることを確認した。接種･回収にともなって，何らかの原因により，プラスミドの安定性が向上したことが考えられる．
（2）McpS の機能がニトロゲナーゼの活性の発現に関連していること，さらに，McpS の機能が根粒形成にともなう必須のものである可能性を示唆する．

mcp, *Sinorhizobium meliloti*, symbiosis

講演番号：3B21a09
講演日時、会場：3 月 28 日 10:38～ B 校舎 21 会場

低温菌 *Shewanella livingstonensis* Ac10 のエイコサペンタエン酸生合成酵素の細胞分裂部位への局在性と複合体形成の解析

Localization and complex formation of eicosapentaenoic acid biosynthetic enzymes at cell division site of a psychrotrophic bacterium, *Shewanella livingstonensis* Ac10

○小倉 隆太郎、趙 賢南、川本 純、栗原 達夫（京大化研）
○Ryutaro OGURA, Hyun-Nam CHO, Jun KAWAMOTO, Tatsuo KURIHARA (Inst. Chem. Res., Kyoto Univ.)

【目的】南極海水より単離された *Shewanella livingstonensis* Ac10 は低温誘導的にエイコサペンタエン酸（EPA）を含むリン脂質を生合成する。本菌の EPA 生合成は遺伝子クラスターによってコードされる 5 つの酵素 (Orf2、Orf5、Orf6、Orf7、Orf8) が担っている。これらの遺伝子破壊株は、EPA 生産能を失い、低温での形態異常を示す。この異常は本菌培養液に EPA を外部添加することで回復する。また、本菌培養液に EPA 含有リン脂質アナログの蛍光プローブを外部添加する実験では、プローブ分子が細胞分裂部位に局在することが示された。このことから、本菌は低温環境において細胞分裂部位に EPA 含有マイクロドメインを形成することが示唆されている。そこで、本研究では、EPA 生合成酵素の局在性および EPA 生合成酵素間の相互作用について解析し、EPA 含有マイクロドメインの形成機構を解明することを目的とした。
【方法】抗 Orf5、抗 Orf8 抗体を用いた蛍光免疫染色法により、Orf5、Orf8 の局在性を解析した。ネイティブプロモーターにより GFP 融合型 Orf8 を発現するプラスミドを構築し、*orf8* 遺伝子破壊株に導入した。4°C で培養した本菌の各生育段階における GFP 融合型 Orf8 の局在性について解析した。更に、他の EPA 生合成酵素遺伝子 (*orf2*、*orf5*、*orf6*、*orf7*) 破壊株に GFP 融合型 Orf8 を発現させ、その局在性を観察した。また、His タグ融合型 Orf8 と *orf8* 遺伝子破壊株の破砕液を混合し、ニッケル担体で共精製することで、Orf8 と相互作用するタンパク質を解析した。
【結果と考察】蛍光免疫染色の結果、Orf5 および Orf8 が細胞分裂部位および極に局在することが示された。GFP 融合型 Orf8 を発現した *orf8* 遺伝子破壊株を用いた実験では、蛍光シグナルが、対数増殖期の 68% の細胞において片方の極に、18% の細胞において細胞分裂部位に局在性を示し、14% の細胞ではその他の局在性を示した。一方、定常期の菌体においては、極に局在性を示す細胞の割合が 88% に増加し、細胞分裂部位へ局在を示す割合は 4% に低下した。このことから、細部分裂期に Orf8 は細胞分裂部位に局在性を示すことが示唆された。*orf2*、*orf6*、*orf7* 遺伝子破壊株において発現した GFP 融合型 Orf8 は、極および細胞分裂部位への局在性を同様に示したが、 *orf5* 遺伝子破壊株では、局所的に存在する GFP シグナルの割合が減少し、細胞全体に均一に広がるシグナルが増加した。また、抗 Orf5 抗体を用いたウェスタンブロッティングの結果、His タグ融合型 Orf8 と Orf5 が共精製された。以上の結果から、Orf5 と Orf8 が本菌の細胞分裂部位において相互作用することが示された。

eicosapentaenoic acid, protein localization, psychrotrophic bacterium

講演番号：3B21a10
講演日時、会場：3 月 28 日 10:49～ B 校舎 21 会場

Shewanella livingstonensis Ac10 由来新規アシルトランスフェラーゼ PlsC4 は特定の分枝鎖飽和脂肪酸を細胞膜リン脂質に導入する

A novel acyltransferase PlsC4 from *Shewanella livingstonensis* Ac10 introduces a specific branched-chain saturated fatty acid into membrane phospholipids

○豊竹 洋佑、趙 賢南、川本 純、江崎 信芳、栗原 達夫（京都大・化研）
○Yosuke TOYOTAKE, Hyunnam CHO, Jun KAWAMOTO, Nobuyoshi Esaki, Tatsuo KURIHARA (Inst. Chem. Res., Kyoto Univ.)

【背景・目的】1-アシル-*sn*-グリセロール-3-リン酸アシルトランスフェラーゼ (PlsC) は、細菌細胞膜リン脂質 *sn*-2 位に、アシル CoA 由来のアシル基を導入するアシル基転移酵素である。大腸菌を含む多くの細菌は、1 種類のみの PlsC を有しており、その働きで鎖長や二重結合の数、位置の異なる種々のアシル鎖を含むリン脂質を生合成している。一方で、南極海水由来の低温菌 *Shewanella livingstonensis* Ac10 は、5 つの PlsC ホモログを有していることがわかった。本研究では、本菌の PlsC ホモログ (PlsC1～5) のうち、飽和脂肪酸のみを特異的にリン脂質に導入する PlsC4 を見いだした。
【方法】相同組み換えにより *plsC4* 遺伝子破壊株を作製し、その細胞内全リン脂質の組成を ESI-MS によって解析した。また、His タグ融合型 PlsC4 (PlsC4-His) 発現ベクターを破壊株に導入することで *plsC4* 相補株を作製し、破壊株と同様にその細胞内全リン脂質の組成を ESI-MS によって解析した。破壊株、相補株それぞれについて、抽出したリン脂質の *sn*-2 位をホスホリパーゼ (PLA2) をもちいて加水分解し、ESI-MS に供した。また、細胞内リン脂質由来の全脂肪酸をメチルエステル化し、その組成を GC-MS で解析した。種々のアシル CoA を基質として用い、リゾホスファチジン酸へのアシル基転移を解析することで、PlsC4-His のアシル鎖転移活性を評価した。
【結果・考察】細胞内全リン脂質組成を ESI-MS で解析した結果、破壊株では炭素数 13 の飽和脂肪酸含有リン脂質の生産量が野生株に比べて著しく低下した。一方、相補株ではそれらのピークが回復した。PLA2 によるリン脂質の加水分解産物を ESI-MS に供した結果、破壊株では炭素数 13 の飽和脂肪酸のピークが著しく低下し、相補株では回復した。PlsC4 がリン脂質の *sn*-2 位に炭素数 13 の脂肪酸を導入していることが示された。細胞内リン脂質由来の脂肪酸組成を GC-MS によって解析した結果、破壊株では炭素数 13 の飽和脂肪酸のピークのみ低下し、相補株では回復していた。さらに、炭素数 13 の直鎖、iso、anteiso-from の 3 種類の異性体の溶出時間と比較すると、本菌由来の炭素数 13 の脂肪酸は、iso-form と溶出時間が一致したことから、PlsC4 は、iso-form である 11-メチルラウリン酸の導入を触媒するアシル鎖転移酵素であることが示された。また、*in vitro* で PlsC4-His のアシル鎖転移活性を調べた結果、炭素数 12 から 14 までの飽和脂肪酸に対する活性を示したが、炭素鎖長 16 以上の脂肪酸には活性を示さなかった。以上の結果から、PlsC4 は、鎖長の短い脂肪酸に対して基質特異性を有するアシル鎖転移酵素活性を有しており、*in vivo* においては 11-メチルラウリン酸含有リン脂質の生合成を担う PlsC であることがわかった。

1-acyl-*sn*-glycerol-3-phosphate acyltransferase, phospholipid, psychrotroph

講演番号：3B21a11
講演日時、会場：3 月 28 日 11:10～ B 校舎 21 会場

低温菌 *Shewanella livingstonensis* Ac10 における細胞分裂タンパク質の細胞内局在におけるエイコサペンタエン酸の役割

Role of eicosapentaenoic acid in the subcellular localization of cell division proteins of a psychrotrophic bacterium, *Shewanella livingstonensis* Ac10

○岩野 友里子、川本 純、栗原 達夫（京大・化研）
○ Yuriko IWANO, Jun KAWAMOTO, Tatsuo KURIHARA (Insti. for Chem. Res., Kyoto University)

[目的]グラム陰性細菌の細胞分裂は、細胞分裂関連タンパク質群が分裂装置を形成することにより開始する。分裂装置に含まれる FtsE と FtsX の複合体は ABC トランスポーターのホモログであり、細胞分裂サイトにおいてペプチドグリカン層の加水分解に関わっていると考えられているが、機能発現機構の詳細は未だ不明である。南極海水から単離された *Shewanella livingstonensis* Ac10 は、低温誘導的にエイコサペンタエン酸 (EPA) を生産する。EPA 生合成遺伝子を破壊した EPA 欠損株は、低温での生育速度が低下し、伸長した多核細胞 (> 4 μm) を形成した。さらに、極性頭部に蛍光発色団を導入した EPA アナログ含有リン脂質プローブをもちいたとき、本菌の分裂サイトに EPA 含有リン脂質を含むマイクロドメインが形成されたことから、本菌の細胞分裂関連タンパク質の機能発現に EPA 含有リン脂質が重要であることが示唆されている。EPA 欠損株に、FtsE、FtsX それぞれを高発現させるベクターを導入したとき、EPA の欠損による生育速度の低下、および細胞の伸長は抑制された。さらに、EPA の欠損は膜局在性の FtsE を減少させていた。これらの結果から、EPA の欠損は FtsE の膜局在性に影響し、FtsX との相互作用を妨げていることが示唆された。本菌における FtsE および FtsX の細胞内局在性の解析を目的とし、HA タグもしくは GFP 融合型の FtsE、FtsX の高発現ベクターを導入したときは、EPA 欠損株の生育遅延が相補されなかった。本研究では、天然型 FtsE の可視化を目的とし、ハイブリドーマ法による抗体作製を行い、免疫染色を行った。
[方法] pET21a (+) をもちいて His タグ融合型 *ftsE* 高発現用プラスミドを構築し、*E. coli* BL21 (DE3) に導入した。封入体として高生産された His タグ融合型 FtsE を精製し、8 週齢のメスのラットに免疫し、2 週間後にリンパ節を採取し、ミエローマ細胞との融合細胞を作製した。得られたハイブリドーマをもちいた ELISA 試験から、抗 FtsE 抗体を生産する細胞を選抜し、得られた培養上清を用いて免疫染色を行った。*S. livingstonensis* Ac10 と EPA 欠損株を 4 ˚C で培養し、対数増殖期の菌体を調製した。
[結果と考察] 免疫蛍光染色の結果、野生株において FtsE は分裂部位と極に局在していた。一方で、EPA 欠損株において、FtsE は細胞全体にわたってスポット状に点在していた。以上の結果から、EPA は、FtsE と FtsX との相互作用に関与し、FtsE の細胞分裂部位への局在に寄与していることが示唆された。

eicosapentaenoic acid, cell division, immunofluorescent staining

講演番号：3B21a12
講演日時、会場：3 月 28 日 11:21～ B 校舎 21 会場

低温適応細菌 *Shewanella livingstonensis* Ac10 の外膜タンパク質の構造形成解析

Analysis of the folding of an outer membrane protein in a psychrotrophic bacterium, *Shewanella livingstonensis* Ac10

○杉浦 美和、浅井 梓、水谷 彩乃、川本 純、栗原 達夫 (京大化研)
○Miwa SUGIURA, Azusa ASAI, Ayano MIZUTANI, Jun KAWAMOTO, Tatsuo KURIHARA (Institute for Chemical Research, Kyoto Univ.)

【目的】南極海水由来のグラム陰性細菌 *Shewanella livingstonensis* Ac10 は、低温誘導的に高度不飽和脂肪酸（PUFA）の一種であるエイコサペンタエン酸（EPA）をリン脂質のアシル鎖として生産する。本菌の EPA 生合成遺伝子破壊株（ΔEPA）の表現型から、EPA は本菌の低温環境適応に重要であることがわかっている。また、ΔEPA では膜透過に関与する外膜タンパク質の生産量が減少しており、EPA が膜タンパク質の生産に影響を与えていることが示唆された。本菌の主要な外膜ポーリンタンパク質である Omp74 を用いて、膜タンパク質の folding に対する EPA 含有リン脂質(EPA-PLs) の影響を解析した結果、EPA-PLs は Omp74 の構造形成を促進することがわかった。膜タンパク質の folding について、一時的に α ヘリックスを持つ中間体が形成された後、最終的な三次構造を形成する多段階的な進行過程が多く知られている。Omp74 の folding に EPA-PLs が影響を与える段階を明らかにするために、本研究では、Omp74 の構造形成様式を解析した。
【方法】Urea はタンパク質の構造を完全に変性させる一方で、SDS はタンパク質の変性効果を持つが水素結合を完全に切断することはできず、タンパク質の構造を部分的に保持させる場合が多い。Omp74 の folding の過程で二次構造を持つ中間体が形成されるかを解析するために、Omp74 を封入体の形で発現、精製し、8 M Urea と 2% SDS によって変性、可溶化した。CD スペクトル測定によって Urea で変性した Omp74 と SDS で変性した Omp74 の二次構造を解析した。変性状態の違いが Omp74 の構造形成に影響を与えるかを解析するために、*in vitro* 再構成実験を行った。*sn*-1 位にパルミトレイン酸、*sn*-2 位に EPA を含むリン脂質と、パルミトレイン酸のみをアシル鎖とする EPA 非含有リン脂質を合成し、リポソームを作製した。Urea 及び SDS で変性した Omp74 をリポソームと混合し、SDS-PAGE における fold した Omp74 のバンド強度を継時的に定量解析した。
【結果・考察】CD スペクトル測定より、Urea で変性した Omp74 は二次構造を形成していないが、SDS で変性した Omp74 は α ヘリックスを形成していることがわかった。*in vitro* 再構成実験において、Omp74 を SDS で変性した場合は、Urea で変性した時よりも早く fold したバンドが観察された。以上の結果より、Urea で変性した場合、Omp74 は完全に変性した状態からの初期段階を経た folding が起き、SDS で変性した場合は、部分的に fold し部分的に二次構造ができた状態から folding が起きており、Omp74 が多段階的に folding している可能性が考えられた。

outer membrane protein, psychrotrophic bacterium, folding

講演番号：3B21a13
講演日時、会場：3 月 28 日 11:32～ B 校舎 21 会場

ω末端修飾型高度不飽和脂肪酸アナログの合成

A synthesis of ω-modified polyunsaturated fatty acid analogs

○徳永 智久、渡辺 文太、川本 純、栗原 達夫（京大化研）
○Tomohisa TOKUNAGA, Bunta WATANABE, Jun KAWAMOTO, Tatsuo KURIHARA (Inst. Chem. Res., Kyoto Univ.)

【目的】エイコサペンタエン酸（EPA）はシス型二重結合を 5 つ有する ω-3 系多価不飽和脂肪酸であり、抗炎症作用など多様な効能を有する生理活性物質として大きな注目を集めている。EPA は脂質メディエーターの前駆体として機能することが知られている。それとともに、リン脂質のアシル鎖として存在し、生体膜における生理機能発現に重要な役割を担っていると考えられている。南極海水より単離された低温適応細菌 *Shewanella livingstonensis* Ac10 は EPA 含有リン脂質を低温誘導的に生合成する。本菌において、細胞分裂部位に EPA 含有リン脂質が濃縮されたマイクロドメインが形成されることや、EPA によって修飾されたタンパク質が存在することが明らかとなった。これまでに、EPA の可視化や EPA 修飾タンパク質探索に有用な、EPA のメチル末端にエチニル基を導入した末端エチニル型 EPA の効率的な合成法の確立に成功している（図 1）。この合成法の中間体である化合物 **2** からは末端エチニル型 EPA 以外の様々なω末端修飾 EPA プローブを合成することも可能である。本研究では、この合成法を応用した EPA 重水素ラベル体の合成を目的とした。

【方法及び結果】銅触媒を用いたカップリング反応により、スキップポリインである化合物 **1** を得た（図 1）。化合物 **1** を立体選択的部分還元した後に、アセタールを加水分解して化合物 **2** を得た。化合物 **2** から化合物 **3**、**6** のようにホスホニウム塩の種類によって EPA のω 末端の構造を変化させた EPA アナログの合成に成功した。化合物 **8** に示される EPA 重水素ラベル体は EPA を前駆体とする脂質メディエーターの解析に利用できる。

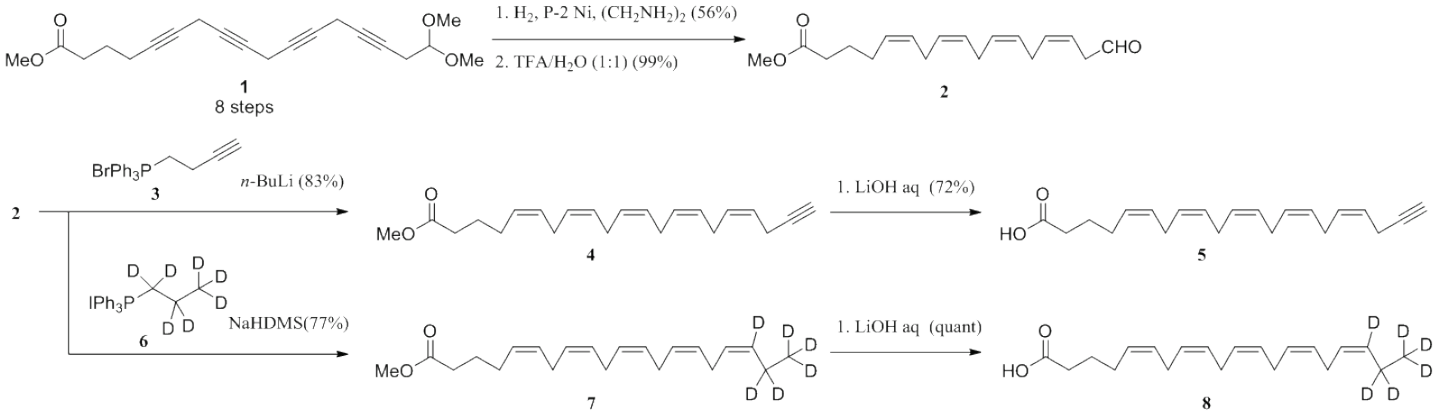


図 1　EPA アナログの合成

polyunsaturated fatty acid, eicosapentaenoic acid, fatty acid probe

講演番号：3B21a14
講演日時、会場：3 月 28 日 11:43～ B 校舎 21 会場

低温適応性 Shewanella 属細菌におけるカルジオリピン生産性の解析

Analysis of cardiolipin biosynthesis by cold-adapted Shewanella species

○浅井 梓、杉浦 美和、川本 純、栗原 達夫（京大化研）
○Azusa ASAI, Miwa SUGIURA, Jun KAWAMOTO, Tatsuo KURIHARA (Institute for Chemical Research, Kyoto University)

【目的】*Escherichia coli* や *Bacillus subtilis* の細胞膜においては、カルジオリピン（CL） が細胞分裂時に細胞分裂部位に濃縮され、細胞分裂において重要な役割を果たすことが明らかにされている。一方、南極海水より単離されたエイコサペンタエン酸（EPA）生産性低温菌 *Shewanella livingstonensis* Ac10 は、低温での細胞分裂時に EPA 含有リン脂質が濃縮したマイクロドメインを分裂部位に形成する。EPA 含有リン脂質は、CL と同様にアシル鎖の占有面積の割合が極性頭部よりも大きいコーン型リン脂質であることから、曲率の高い膜領域の形成に関与していると考えられる。一方で、本菌のゲノムには、CL 生合成遺伝子（*clsA*）も存在する。本研究では EPA 生産菌である *S. livingstonensis* Ac10 における CL 生産能を解析し、EPA 含有マイクロドメインの形成との関連を解明することを目指した。同時に、常温域を好む近縁の *Shewanella oneidensis* MR-1 についても、同様に解析し、*Shewanella* 属細菌におけるカルジオリピンの生理的役割の解明を目指した。
【方法】LB 培地を用いて *E. coli* MG1655、*S. oneidensis* MR-1 を 37 ℃、30 ℃で、それぞれ培養した。また、*S. livingstonensis* Ac10 を 18 ℃と 4 ℃ で培養した。それぞれの株を定常期初期（OD_{600}≒1.0）まで培養し、得られた菌体をもちいて Bligh-Dyer 法により全リン脂質を抽出した。全リン脂質抽出物は、ESI-MS をもちいて解析した。
【結果・考察】*E. coli* MG1655 では、16:0/16:0/18:1/16:0 をアシル鎖に持つと予想される *m/z* 1378 のピークを含めて、少なくとも 6 種の CL が検出された。一方で、いずれの培養条件においても、*S. livingstonensis* Ac10 由来の全リン脂質抽出物からは CL に相当するピークは検出されなかったことから、本菌は CL を生産しない、もしくはその生産量は *E. coli* に比べて極めて少ないことが示され、本菌の生体膜においては、CL ではなく EPA 含有リン脂質が曲率の高い膜の形成に寄与していることが示唆された。一方で、近縁の *S. oneidensis* MR-1 では、16:0/16:0/18:1/16:0 をアシル鎖に持つと予想される *m/z* 1378 のピークを含めて、少なくとも 11 種の CL が検出された。*S. oneidensis* MR-1 のゲノム配列には、*E. coli* など CL 生産菌に保存されている生合成遺伝子群が（*clsA, B, C*）存在しないことから、*S. oneidensis* MR-1 では、*E. coli* とは異なる CL 生合成経路を経て CL を生産している可能性が考えられた。

cardiolipin, eicosapentaenoic acid, Shewanella

講演番号：3B21a15
講演日時、会場：3 月 28 日 11:54～ B 校舎 21 会場

変敗食品より単離された低温適応性乳酸菌の固体表面への接着性の解析

Adhesive activity of a psychrotrophic lactic acid bacterium isolated from spoiled food products

○二宮 健匡[1]、後藤 清太郎[2]、川本 純[1]、工藤 和幸[2]、栗原 達夫[1]([1]京大化研、[2]日本ハム（株）商開研)
○ Takemasa NINOMIYA[1], Seitaro GOTO[2], Jun KAWAMOTO[1], Kazuyuki KUDO[2], Tatsuo KURIHARA[1] ([1]Insti. for Chem. Res., Kyoto Univ., [2]Product Development Laboratory, NH Foods Ltd.)

【目的】食肉加工品より単離された *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* NH04 株は、10 °C、25 °C いずれにおいても近縁の標準株 （*L. mesenteroides* ATCC8293 株, NBRC3832 株）に比べ高い増殖能を示す食品変敗乳酸菌である。これまでに、ペルオキシレドキシン(AhpC) が低温誘導的に発現し、抗酸化ストレス能の向上が食肉加工品製造現場の低温環境における増殖性に関与していることが示唆されている。本菌の全ゲノム解析の結果、全長約 2.1 Mb で約 2,140 個の ORF が存在することがわかった。さらに、本菌の AhpC はフィブロネクチン結合タンパク質の遺伝子（*fbpA*）を含む遺伝子クラスターにコードされていた。FbpA は細胞接着に関わるタンパク質であることが知られており、本菌の食肉加工品表面に対する接着性が、食肉加工品表面での生育に関与していることが示唆される。本研究では、本菌と近縁の乳酸菌について細胞接着性を解析すると同時に、培養条件の違いが本菌の細胞接着性に及ぼす影響を解析した。
【方法】本菌と、同じ亜種の標準株 2 種（*L. mesenteroides* ATCC8293 株, NBRC3832 株）をマイクロタイタープレート(ポリスチレン)に入れた GAM + 1%グルコース培地にて 25 °C で培養し、24 時間培養後の細胞接着物を 0.1% クリスタルバイオレット水溶液をもちいて染色した。細胞に保持された色素を 33%酢酸水溶液にて溶出し、波長 590 nm における吸光度を測定することで、ウェル内部に凝集・付着した細胞量を定量化し、乳酸菌群の接着性を評価した。また、バイオフィルムの主要な構成成分の１つであるデキストランの生合成の基質となるスクロース、および抗菌性食品添加物として使用される亜硝酸ナトリウム存在下での細胞接着性について解析した。
【結果】グルコース含有培地で培養した NH04 株は、近縁の標準株 2 株に比べて細胞接着性が約 3 倍高いことがわかった。一方で、いずれの *L. mesenteroides* 株においても、スクロースの添加によりポリスチレンプレートへの細胞接着性が抑制された。また、抗菌性食品添加物として一般的に食肉加工品に添加されている亜硝酸ナトリウム（300 ppm）存在下では、近縁の標準株の細胞接着能は僅かに低下していたのに対して、NH04 株の接着量は約 1.7 倍増加することがわかった。以上の結果から、高い食品変敗能を有する NH04 は同種の株に比べて高い細胞接着能力を有し、特に亜硝酸ナトリウム存在下で顕著に細胞接着性を増加する仕組みを有していることがわかった。

lactic acid bacteria, food spoilage, adhesive activity

講演番号：3B21p01
講演日時、会場：3 月 28 日 14:00～ B 校舎 21 会場

麹菌 hydrophobin RolA と cutinase CutL1 間の相互作用に関与する CutL1 分子表面のアミノ酸
Analysis of CutL1 amino acid residues involving in interaction between Aspergillus oryzae hydrophobin RolA and CutL1

○金 允卿[1]、寺内 裕貴[2]、田中 拓未[1]、對馬 裕誠[1]、上原 健二[1]、高橋 徹[3]、阿部 敬悦[1,2,3] ([1]東北大院農、[2]東北大・農、[3]東北大・未来研)
○YOONKYUNG KIM[1], Yuki Terauchi[2], Takumi Tanaka[1], Yusei Tsushima[1], Kenji Uehara[1], Toru Takahashi[3], Keietsu Abe[1,2,3] ([1]Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ., [2]Dept. Agric., Tohoku Univ., [3]NICHe., Tohoku Univ.)

hydrophobin は糸状菌および担子菌の特有の分泌タンパク質で，菌糸表面に局在する。*Aspergillus oryzae*を生分解性ポリエステルである polybutylene succinate-co-adipate(PBSA)を唯一の炭素源として培養すると，hydrophobin RolA と PBSA 分解酵素 cutinase CutL1 を共発現する。PBSA に吸着した RolA は CutL1 と相互作用し，PBSA 表面に CutL1 を濃縮することで PBSA 分解を促進する。これまでの研究によって，RolA と CutL1 の相互作用にはイオン的相互作用が関与し，RolA 側の H32，K34，K41，K46，K51 と CutL1 側の E31，D142，D171 が結合に重要であることが明らかになった。しかし，QCM(Quartz Crystal Microbalance)を用いて動力学的解析を行ったところ，NaCl 存在下における RolA 野生型-CutL1 三重変異体(E31S/D142S/D171S)間の結合量，また RolA 二重変異体(H32S/K34S)-CutL1 三重変異体(E31S/D142S/D171S)間の結合量が NaCl 非存在時に比べ顕著に減少した。このことから，これまでに特定された部位以外にもイオン的相互作用部位が残在する可能性が示唆された。

そこで本研究では CutL1 側に着目し，E31，D142，D171 以外の RolA との相互作用に関与する部位を特定し，相互作用機構を解明することを目的とした。CutL1 立体構造モデルと CutL1 ホモログ間のアラインメント解析から相互作用に関与すると推測される負電荷アミノ酸残基を新たに選抜した。本報告では，候補部位のうち D73 を非荷電性の Ser に置換した CutL1 一重，四重変異体を作製し，QCM および Pull-down assay により RolA との相互作用について検証を行った。その結果，CutL1 D73 の RolA に対する親和性が低下した。このことから CutL1 D73S も RolA との結合に重要であり，他の部位との多価効果により RolA との相互作用に関与することが示された。現在，CutL1 分子表面にある他の負電荷アミノ酸部位(D34，E109，D145，D203)ついて同様に Ser 置換体を作製しており，これらの変異体を用いた解析を行っている。

Aspergillus oryzae, hydrophobin, Cutinase

講演番号：3B21p02
講演日時、会場：3 月 28 日 14:11～ B 校舎 21 会場

麹菌 hydrophobin RolA とポリエステル間の相互作用における Cys7-Cys8 ループの関与
Involvement of C7-C8 loop of *Aspergillus oryzae* hydrophobin RolA in interaction between RolA and a polyester.

○田中 拓未[1]、寺内 裕貴[2]、金 允卿[1]、田邊 弘毅[1]、上原 健二[1]、大類 景子[1]、高橋 徹[3]、阿部 敬悦[1,2,3] ([1]東北大院農、[2]東北大農、[3]東北大未来研)
○Takumi Tanaka[1], Yuki Terauchi[2], Yoonkyung Kim[1], Hiroki Tanabe[1], Kenji Uehara[1], Keiko Orui[1], Toru Takahashi[3], Keietsu Abe[1,2,3] ([1]Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ., [2]Dept. Agric., Tohoku Univ., [3]NICHe., Tohoku Univ.)

hydrophobin は糸状菌に広く保存されている界面活性タンパク質であり，8 つの保存された Cys 残基を持つ。Cys3-Cys4 ループ及び Cys7-Cys8 ループは疎水面を形成し，疎水性表面への吸着に関与していると考えられている。生分解性ポリエステル polybutylene succinate-co-adipate (PBSA) を唯一の炭素源として含む液体培地で麹菌 *Aspergillus oryzae* を培養すると，PBSA への吸着能を持つ hydrophobin RolA と，PBSA 分解酵素であるクチナーゼ CutL1 を分泌する。RolA は PBSA に吸着した後構造変化し，CutL1 をリクルートすることで PBSA 分解を促進する [1)]。

本研究において我々は， RolA の疎水性ループ中に存在する疎水性アミノ酸残基を Ser に置換した変異体，及び，疎水性ループ中に存在する荷電性アミノ酸を Ala に置換した変異体を作製した。また，これらの変異体用い，プルダウンアッセイ及び Quartz Crystal Microbalance (QCM) によって PBSA に対する吸着キネティクスを解析した。

Cys7-Cys8 ループ中の疎水性アミノ酸 Leu137, Leu142 を Ser に置換した RolA 変異体では，野生型 RolA と比較して PBSA への吸着速度または最大吸着量が低下した。一方，Cys7-Cys8 ループ中の荷電性アミノ酸 Lys130, Asp134, Asp136 を置換した変異体では，PBSA への吸着量が増大した。このことから，Cys7-Cys8 ループに存在するこれらの残基が吸着に主に関与し，このループの疎水性と荷電性のバランスが PBSA への吸着に重要であることを示唆した。

1) Takahashi T et al., Mol Microbiol. 57:1780, 2005

Aspergillus oryzae, hydrophobin, protein-solid surface interaction

講演番号：3B21p03
講演日時、会場：3 月 28 日 14:22～ B 校舎 21 会場

麹菌界面活性タンパク質 hydrophobin RolA の疎水性表面への吸着様式・吸着機構の解析
Analysis of adsorption patterns and mechanisms of *Aspergillus oryzae* hydrophobin RolA to hydrophobic surfaces.

○永山 恵美[1]、寺内 裕貴[2]、田中 拓未[1]、田邊 弘毅[1]、上原 健二[1]、高橋 徹[3]、有田 稔彦[4]、樋口 剛志[4]、阿部 敬悦[1,2,3] ([1]東北大院農、[2]東北大農、[3]東北大未来研、[4]東北大多元研)
○Megumi Nagayama[1], Yuki Terauchi[2], Takumi Tanaka[1], Hiroki Tanabe[1], Kenji Uehara[1], Toru Takahashi[3], Toshihiko Arita[4], Takeshi Higuchi[4], Keietsu Abe[1,2,3] ([1]Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ., [2]Dept. Agric., Tohoku Univ., [3]NICHe., Tohoku Univ., [4]IMRAM.,Tohoku Univ.)

【背景・目的】*Aspergillus oryzae* の分泌する hydrophobin RolA は様々な疎水性固体表面に吸着する。RolA は生分解性ポリエステルである PBSA(Poly(butylene succinate-*co*-adipate))に吸着した後に分解酵素と相互作用し，PBSA 分解効率を上昇させている(1)。また、hydrophobin はその界面活性特性と免疫回避機能から，材料表面加工への応用が期待されている。その一方で，様々な特性を有する固体表面と hydrophobin との相互作用機構や，吸着の速度論的性質についての詳細は不明である。現在までに我々は，SAM (Self-Assembled Monolayer)化によって異なる性質の表面を作製し，その表面と RolA との親和性を QCM (Quarts Crystal Microbalance)で測定して，固体表面の性質に依存して RolA 吸着の動力学的性質が異なることを見出した。QCM を用いた RolA の吸着解析では、センサーの金電極表面の均一な SAM 化が必要となる。そこで本研究では，金電極への SAM 形成状態を評価する方法を確立することとした。また，均一に SAM 化した固体表面に対して RolA を様々な条件下で吸着させ，その吸着状態と親和性解析結果を比較することで，固体表面に対する RolA の吸着様式・吸着機構について考察することを目指した。

【方法】QCM のセンサー金電極表面を 1-undecanethiol を用いて疎水性に改質し，接触角測定と AFM (Atomic Force Microscope)のダイナミックフォースモードによる観察によって，作製した表面の均一性を評価した。また，SAM 化表面に対する RolA の親和性解析を pH 4.0，7.0，10.0 の緩衝液条件下でそれぞれ行った。さらに，同条件下で異なる量の RolA が吸着した表面を作製し，水の接触角測定と AFM による表面観察を行った。

【結果・考察】接触角測定と表面観察により，均一な 1-undecanethiol SAM 化表面が作製できていることが確認された。また，この 1-undecanethiol SAM 化表面に対して異なる pH 条件下で段階的に RolA を吸着させていった結果，吸着時の pH と吸着量に依存して異なる高次構造が形成され，RolA の吸着により疎水表面が親水性に改質された。また，class I hydrophobin 類で一般的に見られる rodlet と呼ばれる棒状の自己組織化構造を，RolA も形成することが確認された。さらに，異なる pH 条件下では RolA と 1-undecanethiol SAM 化表面間の親和性も異なっていることから，RolA-固体表面間の親和性と rodlet 構造の形成されやすさが相関する可能性が示唆された。現在，より詳細な吸着メカニズムの解明に向けて，荷電性を持った固体表面に対する RolA の親和性解析，及び表面観察を行っている。

(1) Takahashi *et al*., *Mol Microbiol*. 57: 1780-1798 (2005)

Hydrophobin, AFM, QCM

講演番号：3B21p04
講演日時、会場：3 月 28 日 14:33～ B 校舎 21 会場

イネいもち病菌を用いた薬剤標的分子解析法によるロキシスロマイシンの真核生物における作用点の探索

A Eukaryotic Molecular Target Candidate of Roxithromycin: Fungal Differentiation as a Sensitive Drug Target Analysis System

○石井 晶[1]、草間 瞬太[1]、野坂 亮仁[1]、熊坂 茉佑[1]、イサグゥイレ ヘスス[1]、倉持 幸司[2]、紙透 伸治[1]、成川 恵[1]、菅原 二三男[1]、鎌倉 高志[1] ([1]東理大、[2]京都府立大)
○ Akira ISHII[1], Shunta Kusama[1], Akihito Nozaka[1], Mayu Kumasaka[1], Jesus Izaguirre Carbonell[1], Koji Kuramochi[2], Shinji Kamisuki[1], Megumi Narukawa[1], Fumio Sugawara[1], Takashi Kamakura[1] ([1]Univ. Sci, [2]Kyoto Prefectual Univ.)

近年ドラッグリポジショニングと呼ばれる既存薬剤を利用した新規薬剤の開発や新たな薬効の利用が注目されている。しかし、既存の薬剤にも作用点未解明のものも多く、新規化合物はもちろん、既存の薬剤の標的を解明し得る新たな解析手法の重要性がより高まっている。そこで本研究では真菌であるイネいもち病菌を用いた薬剤標的分子解析系による薬剤作用点の解明を目的とした。本実験系ではイネいもち病菌の感染特異的器官である付着器の分化に注目した。付着器の分化過程で 1 度細胞分裂を行う。そのため、様々な生理活性阻害により細胞分化や細胞分裂が抑制されると、付着器分化が抑制される。また、プラスチック上で簡単にほぼ同調した付着器分化を観察できるという特徴がある。そこで、薬剤によるイネいもち病菌の付着器分化阻害を種々の阻害効果の指標として利用した。また、薬剤作用点探索にファージディスプレイ法を用い、弱い相互作用まで解析可能な系とした。

ヒトに対して感染症や炎症の治療薬として用いられているロキシスロマイシン（RXM）に注目し、作用点探索を行った。RXM は抗ガン作用等有用な作用が見つかっているが、真核生物における作用点はほとんど解明されていない。ファージディスプレイ法による解析によりイネいもち病菌における RXM の標的候補タンパク質として *MoCDC27* が得られた。ホモログと推定された CDC27 は、ヒトや酵母などにおいて有糸分裂後期のチェックポイントを担う事が知られており、RXM による付着器.分化抑制の標的として期待できた。イネいもち病菌において *MoCDC27* の過剰発現株、ノックダウン株を作製し、RXM に対する影響を調べた。その結果、RXM 未添加時にはどちらの株も野生株と比べ付着器形成能に変化は見られなかったが、ノックダウン株では.RXM に対し感受性が低下し、過剰発現株では RXM の感受性が野生株と比べ変化はなかった。そこで、*mocdc27* ノックダウン株に過剰発現ベクターを導入し、*MoCDC27* 相補株とした。相補株に RXM を作用させたところ、野生株と同程度の RXM 感受性を示した。以上の結果から、RXM の付着器分化阻害作用には MoCDC27 が必要であることが予想された。さらに、表面プラズモン共鳴解析により結合定数は 1.06×10^{-5}M 程度の比較的弱い結合であったが RXM と MoCDC27 の直接相互作用が検出できた。これらの結果より、RXM は MoCDC27 と複合体を形成することで他の因子に作用し、イネいもち病菌において付着器分化を抑制した可能性が考えられる。本研究で用いた手法は、イネいもち病菌の分化に影響を与える生理活性物質に広く応用可能である。そのため、様々な化合物に対し網羅的に解析を進めることで新たな薬効の発見や未解明の作用点解明など新薬開発への貢献が期待できる。

Pyricularia oryzae, A macrolide antibiotic, anaphase promoting complex

講演番号：3B21p05
講演日時、会場：3 月 28 日 14:44～ B 校舎 21 会場

Insecticidal activity of a recombinant baculovirus expressing spider venom cyto-insectotoxin (Cit1a)

○MD PANNA ALI[1], Tatsuya Kato[2], Enoch Park[1,2] ([1]Laboratory of Biotechnology, Department of Bioscience, Graduate School of Science and Technology, Shizuoka Univ., [2]Research Institute of Green Science and Technology, Shizuoka Univ., 836 Ohya Suruga-ku, Shizuoka 422-8529, Japan)

Baculoviruses have a long history of safe use as specific, environmentally friendly insecticides thus provide alternatives to chemical pesticide for controlling insect pests. However, their use has been limited by several factors, especially their slow pathogenicity. Baculovirus expression vectors expressing foreign genes, such as those for insect-specific toxins, hormones or enzymes, might alleviate this problem. In this study, we constructed a recombinant *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus (BmNPV) expressing an insect-specific cyto-insectotoxin (Cit1a) from the venom of the central Asian spider *Lachesana tarabaevi*. Cit1a is a comparatively long linear cytolytic molecule with a predicted α-helix structure which is composed of two short MAMPs (membrane-acting antimicrobial peptides) joined together in a "head-to-tail" shape. The mature peptide of cyto-insectotoxin fused to polyhedrin gene (Polh) (Polh-Cit1a) was expressed not only occluded into the polyhedra, but also activated by treatment with trypsin. The BmNPVPolh-Cit1a baculovirus showed a significant reduction in the median lethal time (LT_{50}) against *Bombyx mori* larvae compare to those of control baculovirus. Early death of recombinant BmNPV-Polh-Cit1a-infected insects were happened due to early cells death caused by necrosis during recombinant virus infection *in vitro* relative to a control virus lacking the toxin gene. When infected cells were subjected to analysis, the cells showed loss of cytoplasm, membrane integrity and structural changes. Our study highlights that use of baculovirus expressing insect-specific toxic peptides is a potential tool for insect pest management.

Cyto-insectotoxin (Cit1a), recombinant baculovirus, Bombyx mori, Bm5 cell line, cytotoxicity, necrosis

講演番号：3B21p06
講演日時、会場：3 月 28 日 15:05～ B 校舎 21 会場

TiO_2 光触媒反応による細菌の細胞膜と呼吸活性への影響

The influences of bacterial cell membrane and respiration activity by the TiO_2 photocatalytic reaction

○三ツ木 理騎[1]、藤嶋 昭[2]、鈴木 智順[1,2] ([1]東理大・応用生物、[2]東理大・総研)
○Masaki MITSUGI[1], Akira FUJISHIMA[2], Tomonori SUZUKI[1,2] ([1]Tokyo University of Science, Department of Applied Biological Science, [2]Tokyo University of Science, Reseach Institute for Science & Technology)

【目的】 大気汚染や水質汚染など様々な環境問題や、院内感染や空中浮遊菌による感染症などが話題になっており、その解決手段として注目されているのが光触媒である。しかし、光触媒による殺菌メカニズムの詳細はほとんどわかっていない。そこで本研究では、*Escherichia coli* に対して TiO_2 による光触媒反応を行い、反応後の *E. coli* の細胞膜損傷とコロニー形成能、呼吸活性などを比較することで、光触媒反応による細胞膜への影響を調べた。これらによって光触媒による殺菌メカニズムの解明を行うことを目的とした。

【方法】 *E. coli* に対する光触媒反応は次の装置を用いて行った。シャーレ内に濾紙を置き、滅菌超純水を 5 mL滴下した。そこへプラスチックケースを置き、その上にNDH-510C（日本曹達）でコーティングしたホウケイ酸ガラス（5.0×5.0 cm）を置いた。そこへ、PBS で約 1.0×10^9 cells/mL に調製した *E. coli* 懸濁液を 100 μL 滴下し、フィルムをかぶせ、シャーレ全体をラップで覆った後に、0.25 mW/cm^2 の UVA 照射を 0-4 時間行った。その後、菌液を回収し、コロニー計数（コロニー形成能）、共焦点顕微鏡観察（BacLight： 細胞膜損傷, CTC： 呼吸活性）を行い、比較解析した。

【結果】 コロニー計数の結果では、光触媒反応 40 分間で *E. coli* の生存率が 48%まで低下し、その後 4 時間まで徐々に生存率が下る結果になった。このことから、光触媒反応が始まってすぐに *E. coli* に対する何らかの大きな影響が及んでいることが示唆された。BacLight の結果では、30 分間で *E. coli* の生存率が 43%まで低下し、その後もコロニー計数の結果同様、徐々に下がっていくが、生存率は 0 にはならなかった。よってこの結果より、*E. coli* の細胞死の主な原因は細胞膜損傷であるということが考えられた。しかし、BacLight の結果はコロニー計数の結果より先に生存率が低下するが、その後生存率は約 6%に収束し、コロニー計数の結果は生存率が 4 時間後まで低下し続けたので、細胞死の原因は細胞膜の損傷のみではないことが考えられた。つまり、光触媒反応による *E. coli* の細胞死は細胞膜が主な原因であるが、細胞膜以外の要因も大きく関係していると示唆された。また、CTC の結果では、光触媒反応によって呼吸活性が徐々に低下していき、4 時間で 46%となった。この結果から、呼吸活性の低下より先に、細胞膜損傷が起きたことが示唆された。この結果からも、細胞膜の損傷が *E. coli* の不活化に大きな影響を及ぼしていると考えられる。

以上の結果をまとめると、光触媒反応を開始すると、細胞増殖能は失われていくが、呼吸活性はしばらく残っていることが明らかになった。

photocatalysis, killing mechanism, bacteria

講演番号：3B21p07
講演日時、会場：3 月 28 日 15:16～ B 校舎 21 会場

細菌の細胞壁に対する光触媒反応の影響の検討

The effects of the photocatalytic reaction to bacterial cell wall

○大嶋 佑治[1]、芦田 美稀[1]、藤嶋 昭[2]、鈴木 智順[1,2]([1]東理大 応生、[2]東理大 総研)
○YUJI OHSHIMA[1], MIKI ASIDA[1], AKIRA FUJISHIMA[2], TOMONORI SUZUKI[1,2] ([1]Tokyo Univ. of Science Dept. of Applied Biological Science, [2]Tokyo Univ. of Science, Research Institute for Science & Technology)

【目的】 現在、消毒剤や殺菌剤として抗菌剤や抗生物質などが広く普及しているが、消毒剤は毒性や発ガン性をもつものもあり、抗生物質は耐性株の出現というリスクもある。そのため新たな殺菌・消毒剤が必要とされているが、その一つに光触媒効果があげられる。光触媒による殺菌効果は、紫外光を照射することで自身が産生する活性酸素種の強い酸化力によるものである。しかし、細菌の殺菌メカニズムについては明確な知見が得られていない。光触媒による殺菌メカニズムを解明することで、殺菌効率の向上やさらなる応用が期待できる。現在の知見では、光触媒による細胞膜損傷が殺菌に起因しているとされている。グラム陽性細菌はペプチドグリカン層が厚いためにグラム陰性細菌より致死率が低いという報告もあるが、その一方で、活性酸素種はグラム陽性細菌のペプチドグリカン層をそのまま通過し、グラム陰性細菌では活性酸素種の侵入が外膜で阻まれるために、その結果、グラム陽性細菌の殺菌効果がグラム陰性菌よりも高いとする報告もある。そのため細胞壁に対する光触媒反応には相反する報告が存在している。

そこで本研究では、活性酸素種の寿命の短さ、反応性の高さで細胞壁のペプチドグリカン層を通過できるのかを、グラム陰性細菌とグラム陽性細菌の死滅速度の違いに着目し、ペプチドグリカン層に対する光触媒反応の影響を探ることを目的とした。

【方法】 ペプチドグリカン層の有無の違いによる死滅速度の違いを見るために、芽胞を形成しないグラム陽性桿菌である *Lactobacillus.plantarum* のプロトプラストを作製した。プロトプラストは細胞壁を除去した細胞であるため、破裂しやすいので、安定して測定できる条件の検討を行った。今回の実験では未処理の菌体とプロトプラスト状態の菌体の光触媒反応を比較するため、高い形成率のプロトプラストサンプルを調製する必要がある。そこで本研究では、従来とは異なる手法でプロトプラスト細胞の作成を行い、高い形成率を維持した状態での光触媒反応によるプロトプラストの生存率を評価することができる実験系を目指した。まず、グラム陽性菌で桿菌である乳酸菌のプロトプラスト化の条件検討を行い、調製液の組成やリゾチーム濃度を検討した。

【結果】 緩衝液にHEPESを使用し、浸透圧調整としてショ糖を加え、さらにゼラチンを添加することでプロトプラスト化が可能となった。さらにリゾチーム濃度：1.5 mg/mL、ラビアーゼ濃度 1.5 mg/mL で高いプロトプラストの形成率が得られた。また、Baclight やサイバーグリーンを用いることでプロトプラストでも生死判定の確認が可能であることが分かり、細胞壁を除去することで生存率が下がる可能性が示唆された。光触媒反応中にプロトプラストを構造的に安定化させる必要があるため、実験系における物理的な障害の除去など、さらに検討し、発表する予定である。

photocatalysis, killing mechanism, peptidoglycan

講演番号：3B21p08
講演日時、会場：3 月 28 日 15:27～ B 校舎 21 会場

光触媒反応による真菌の殺菌メカニズムと細胞壁損傷との関連性の解析
Analyses of relationship between the mechanism of sterilization and cell wall damage of fungi on photocatalysis reaction

○並木 康之[1]、中田 一弥[1,2]、藤嶋 昭[2]、池北 雅彦[1,2]、鈴木 智順[1,2] ([1]東理大・応用生物、[2]東理大・総研)
○YASUYUKI NAMIKI[1], KAZUYA NAKATA[1,2], AKIRA FUJISHIMA[2], MASAHIKO IKEKITA[1,2], TOMONORI SUZUKI[1,2] ([1]TUS・BS, [2]TUS)

【目的】 近年我々が開発した新規光触媒担持チタンメッシュフィルタ(TMiP)は様々な微生物を殺菌することができる。今回、多細胞性の菌糸を形成する *Aspergillus niger* および単細胞性の *Saccharomyces cerevisiae* に対して光触媒反応による殺菌メカニズムの解明を目的として実験を行った。
【方法】 本研究では、JIS の評価方法に準じた抗菌性能評価を行った。まず、ガラスシャーレの中に濾紙を置き、菌液の蒸発を防ぐため滅菌蒸留水を 5 mL 入れた。濾紙の上にプラスチックケースを置き、50±2 mm の正方形型に切った TMiP をその上に載せ、菌体濃度を調節した菌液を 100 μL 滴下した後、フィルムで覆った。シャーレの蓋をかぶせ、さらにラップで密閉した。次に、あらかじめ UVA の光強度が 0.8 mW/cm²になるように調節した位置に上記シャーレを置き、UV 照射を行った。そして、時間経過ごとに菌液を回収して、コロニー計数法でそれぞれの真菌の生存率を計測した。
次に、走査型電子顕微鏡(SEM)を使用して細胞が光触媒反応により破壊されていく過程を経時的に解析した。そして、光触媒反応により細胞内部で発生する ROS の生成量や、細胞膜で形成される過酸化脂質の量を共焦点レーザー顕微鏡で解析して細胞内部および細胞外部への光触媒反応の影響を検証した。
【結果】 JIS に準じた試験法では、*S. cerevisiae* を 12 時間で 99%以上殺菌し、20 時間経過すると 99.9%以上殺菌した。多糖類からなるキチン質の強固な細胞壁をもっているにもかかわらず、この時間で殺菌できたことは、光触媒反応が強力な殺菌効果を有していることを示している。また、*A. niger* の殺菌に必要な光触媒反応時間が *S. cerevisiae* と較べて長かった。このことから、細胞壁組成や菌体色素の違いなどがこれら真菌における殺菌効率の違いに関係している可能性が示唆された。
SEM による細胞構造の解析結果では、殺菌が主に起こった 0~8 時間の間で *S. cerevisiae* と *A. niger* のどちらにも顕著な細胞構造の変化が見られなかった。その間に細胞内で ROS が生成しているかを蛍光試薬 APF で解析した結果、光触媒反応処理を始めてすぐに ROS の生成が確認された。つまり、光触媒反応により細胞構造が破壊される前に、細胞内で発生した ROS が細胞にダメージを与えていた可能性が示唆された。また、過酸化脂質生成量の解析の結果、光触媒反応を開始して 0~6 時間では過酸化脂質の生成を確認できなかったが、8 時間以上反応させたことで過酸化脂質の生成を開始することが確認された。
これらのことから、光触媒反応により細胞壁が分解される前に、細胞内部で発生した ROS が細胞にダメージを与えている可能性が示唆された。

photocatalysis, killing mechanism, fungi

講演番号：3B21p09
講演日時、会場：3 月 28 日 15:38～ B 校舎 21 会場

オキシダーゼ様触媒活性を有する天然由来低分子有機化合物の発見

Discovery of natural low-molecular mass organic compound with oxidase-like activity

○西山 辰也[1]、橋本 義輝[1]、日下部 均[2]、熊野 匠人[1]、小林 達彦[1] ([1]筑波大院　生命環境、[2]株式会社エンザイム・センサ)
○Tatsuya NISHIYAMA[1], Yoshiteru HASHIMOTO[1], Hitoshi KUSAKABE[2], Takuto KUMANO[1], Michihiko KOBAYASHI[1] ([1]Grad. Sch. of Life and Environ. Sci., Univ. of Tsukuba, [2]Enzyme-Sensor　Co., Ltd.)

触媒とは反応を促進するがそれ自身は反応の前後で変化することの無い物質のことであり、その中でも生体内外で作用する触媒は生体触媒と呼ばれている。生体触媒にはアミノ酸を構成要素とする酵素と、核酸を構成要素とし触媒活性を有する RNA（リボザイム)がある。

触媒には、金属原子を含まず触媒活性を有する低分子有機化合物・有機触媒も存在する。工業で多く用いられている金属触媒と比較して、有機触媒は、製品への金属混入リスクが少ない、廃液にも金属が含まれず処理が簡便、反応系が比較的温和な条件で進行、などの点から環境負荷が少ないため、近年、グリーンケミストリーへの関心の高まりと相まって注目を浴びている。しかし、生体内外の生理的条件下で有機触媒が機能している報告はこれまでに全くない。

我々は酸化酵素のスクリーニング過程で、放線菌 *Streptomyces coelicolor* A3(2)の培養上清にL-アスコルビン酸オキシダーゼおよびL-システインオキシダーゼ活性があることを見いだした。そこでこれら酵素の精製を試みたが、精製の過程で酵素ではなく、*S. coelicolor* A3(2)が分泌する青色色素(低分子有機化合物)アクチノロージンが酸化反応を触媒すると推測された。そこで、アクチノロージンを精製し、酵素学的実験手法などによりその反応を調べた結果、①アクチノロージンが本活性を保持し、②反応液中のアクチノロージン量は反応の前後で変化せず、③反応に用いたアクチノロージン量の100倍以上の基質が消費された。④精製したアクチノロージンに金属原子が含まれないことを考え合わせ、アクチノロージンを有機触媒と同定した。本研究により、生物が生産する低分子有機化合物が生理学的条件下において触媒活性を示す有機触媒であることを世界で初めて発見した。

さらに、酵素学的実験手法を用いて、アクチノロージンの諸性質を解明した。その結果、本反応の指摘条件はpH 8.5であり、100℃で１時間熱処理後のアクチノロージンでも活性は全く失われず、反応温度の上昇や基質濃度の上昇に伴って活性が上昇した。また、反応のストイキオメトリーを測定し、触媒する反応をそれぞれ　L-アスコルビン酸 + O_2 → L-デヒドロアスコルビン酸 + H_2O_2、 2 L-システイン + O_2 → L-シスチン + H_2O_2 と同定した。

organocatalysts, natural products, oxidase

講演番号：3B21p10
講演日時、会場：3 月 28 日 15:49～ B 校舎 21 会場

有機触媒アクチノロージンの抗菌活性作用機序の解明および新規天然有機触媒のスクリーニング

Mechanism of antibiotic action of actinorhodin and screening of novel organocatalysts

西山 辰也[1]、○橋本 義輝[1]、日下部 均[2]、熊野 匠人[1]、小林 達彦[1] ([1]筑波大院　生命環境、[2]株式会社エンザイム・センサ)
Tatsuya Nishiyama[1], ○Yoshiteru Hashimoto[1], Hitoshi Kusakabe[2], Takuto Kumano[1], Michihiko Kobayashi[1] ([1]Grad. Sch. of Life and Environ. Sci., Univ. of Tsukuba, [2]Enzyme-Sensor Co., Ltd.)

触媒には金属原子を含まず触媒活性を有する低分子有機化合物・有機触媒も存在する。工業で多く用いられている金属触媒と比較して、有機触媒は、製品への金属混入リスクが少ない、廃液にも金属が含まれず処理が簡便、反応系が比較的温和な条件で進行、などの点から環境負荷が少ないため、近年、グリーンケミストリーへの関心の高まりと相まって注目を浴びている。しかし、生体内外の生理的条件下で有機触媒が機能している報告はこれまでに全くない。

我々は酸化酵素のスクリーニング過程で、放線菌*Streptomyces coelicolor* A3(2)の生産する青色色素で抗生物質でもあるアクチノロージンがL-アスコルビン酸およびL-システインを基質として酸化反応を触媒する有機触媒であることを発見・証明し、酵素学的実験手法を用いてその諸性質を解明した。

本研究では、未だ解明されていないアクチノロージンの抗菌活性作用機序を解明することを目的とした。L-アミノ酸酸化酵素は魚の粘膜中に存在し、本酵素により、L-アミノ酸を酸化して発生する過酸化水素(H_2O_2)が抗菌活性を示すことで、病原菌から魚自身を守っている可能性が報告されている。アクチノロージンの反応産物がH_2O_2であることから、アクチノロージンの抗菌活性作用機序はH_2O_2の可能性が示唆された。そこで、様々な培地でアクチノロージン感受性菌の生育を比較した結果、アクチノロージンを加えた培地では感受性菌の生育が阻害されたが、アクチノロージンとカタラーゼ(H_2O_2を分解する酵素)とを両方加えた培地では感受性菌の生育阻害が緩和された。また、本菌はH_2O_2の添加でも生育が阻害された。これらの結果より、アクチノロージンが生成したH_2O_2による感受性菌へのダメージが抗菌活性の原因と示唆された。

続いて、アクチノロージンと同様の活性を有する有機触媒を、動物、植物、微生物由来の天然化合物からスクリーニングした。その結果、植物由来の３つの化合物がアクチノロージンと同様の活性を持つ有機触媒であることが示唆された。

Organocatalysts, natural products

講演番号：3B21p11
講演日時、会場：3 月 28 日 16:10～ B 校舎 21 会場

MALDI-TOF MS を用いた S10-GERMS 法による大腸菌 O157、O26 および O111 の識別
Discrimination of Escherichia coli O157, O26 and O111 from other serovars by MALDI-TOF MS based on the S10-GERMS method

○山本 奈保美[1]、加藤 晃代[2]、鈴木 真弓[1]、田村 廣人[1] ([1]名城大農、[2]（公財）科技財団)
○Naomi YAMAMOTO[1], Teruyo KATO[2], Mayumi SUZUKI[1], Hiroto TAMURA[1] ([1]Meijo Univ., [2]ASTF)

【背景および目的】

大腸菌の分類指針のひとつである血清型は多岐にわたり、特に O 抗原型は現在約 200 種類が報告されている。その中でも志賀毒素を生産し世界的に集団食中毒を起こす原因として知られている主な O 抗原型は O157、O111、O26 であり、食中毒の原因究明や安全な食品を供給するためにもこれらの迅速な検出が求められている。現在 O 抗原検査の主流である PCR 法は判定に時間を要し、近年開発され普及している MALDI-TOF MS による細菌同定は迅速であるが属種までの同定が限界であり、O 抗原型等のより詳細な識別はできない。

我々はバイオインフォマティクスとゲノミクスとプロテオミクスを融合した S10-GERMS 法 (S10-spc-alpha operon Gene Encoded Ribosomal protein Mass Spectrum method)を用いてホールセルを用いた MALDI-TOF MS 分析結果から、大腸菌 O157、O26 および O111 を迅速に識別する事を目的とした。

【方法および結果】

はじめに、大腸菌 O157_16 株、O111_3 株、O26_9 株を含む 50 株を MALDI-TOF MS(AXIMA 微生物同定システム)によって測定し、識別の指標となるリボゾームタンパク質を含むバイオマーカータンパク質を選出した。次にバイオマーカータンパク質の塩基配列を決定し、理論質量を算出及びデータベースを構築した。これをマススペクトルの観測結果と比較し、O157、O111 及び O26 を識別するバイオマーカーの信頼性を確認した。このバイオマーカーを指標として、愛知県科学技術交流財団の産学行政連携の共同開発プロジェクト『「知の拠点あいち」重点プロジェクト　食の安心・安全技術開発プロジェクト（P2)』にて愛知県科学技術交流財団、株式会社島津製作所、名城大学で共同開発した MALDI-TOF MS 高精度細菌識別ソフトウエア-Strain Solution にて大腸菌 O157、O26 および O111 半自動識別が可能であった。検証実験として、食中毒患者及び食品から単離した大腸菌 56 株を 100%の識別率で、O157、O26 及び O111 に識別することに成功した。これらの結果から、Strain Solution が大腸菌 O157、O26 及び O111 の識別に有効である事が示された。

E.coli O157, O26, O111, Ribosomal Protein, MALDI-TOF MS

講演番号：3B21p12
講演日時、会場：3 月 28 日 16:21～ B 校舎 21 会場

枯草菌バイオフィルムを分解するファージタンパク質の同定と解析

Identification and analysis of phage protein involved in *Bacillus subtilis* biofilm disruption

○山本 達也、中村 幸治、野村 暢彦（筑波大生命環境）
○Tatsuya YAMAMOTO, Kouji NAKAMURA, Nobuhiko NOMURA (Univ. of Tsukuba)

細菌の多くは環境中ではバイオフィルムという細胞外マトリックスに覆われた構造を形成して集団で生息している。バイオフィルムは多くの産業において微生物汚染源として知られており、その制御法が求められている。バイオフィルム中の菌体は薬剤耐性が高く、ファージによる対処が期待されているが、バイオフィルム中の細菌に対するファージの感染については不明な点が多い。*Bacillus* 属細菌は様々な環境に広く存在し、また、そのバイオフィルム形成は水処理膜のファウリングの原因にもなっており、本属菌のバイオフィルムに対するファージ感染機構の解明が求められている。*Bacillus* 属では枯草菌（*Bacillus subtilis*）においてバイオフィルム研究が進められており、気液界面にペリクルバイオフィルムと呼ばれる特徴的なバイオフィルムを形成する。しかしながら、これまでこのようなペリクルバイオフィルムに対してどのようにファージが感染するかは明らかではなかった。

枯草菌 RM125 株に SP10、SPO1、φ29 及び SPP1 ファージを感染、溶菌させファージライセートを調整し、各ファージライセートを枯草菌 NCIB3610 株のペリクルバイオフィルムに添加したところ、SP10 ファージを添加したときのみ著しいペリクルの分解がみられた。一方、精製した SP10 ファージではペリクルの分解はみられず、超遠心によってファージライセートからファージを除いた超遠心上清ではペリクルの分解がみられた。よって、SP10 ファージライセートによるペリクルの分解は SP10 ファージそのものではなく、SP10 ファージの感染により枯草菌がペリクルの分解因子を作り出していることが考えられた。また、Proteinase K を処理した SP10 ファージライセートではペリクル分解活性が低下することから、このペリクル分解因子はタンパク質であることが示唆された。そこで、ペリクル分解活性が見られる SP10 ファージライセート及び超遠心上清と分解活性の見られない SPO1 ファージ超遠心上清中のタンパク質を SDS-PAGE で展開し、MALDI-TOF MS によって SP10 ファージライセート及び超遠心上清に特異的なタンパク質を同定したところ、SP10 ファージのゲノム上にコードされるタンパク質であった。同定したタンパク質をコードする遺伝子をクローニング、大腸菌で発現させ、そのライセートを枯草菌のペリクルバイオフィルムに添加したところ、ペリクルの分解が観察された。SP10 ファージはこのようなペリクル分解タンパク質を用いることで、菌体をペリクルから遊離させ、菌体に付着しやすくしている可能性が考えられる。また、他の *Bacillus* ファージのゲノム上にもこの遺伝子のホモログが存在していることから、*Bacillus* ファージにおいて同様のペリクル分解機構がファージの感染に寄与している可能性が示唆される。

Bacillus subtilis, bacteriophage, biofilm

講演番号：3B21p13
講演日時、会場：3 月 28 日 16:32～ B 校舎 21 会場

水溶性テトラゾリウム塩を用いた微生物検出法：ハイスループットバイオフィルム薬剤感受性試験への適用

Microbial detection method using water-soluble tetrazolium salts: Application for the high-throughput susceptibility testing of microbial biofilms

○塚谷 忠之[1]、末永 光[1]、志賀 匡宣[2]、松本 清[3]([1]福工技セ・生物食品研、[2]同仁化学研、[3]崇城大・生物生命)
○Tadayuki TSUKATANI[1], Hikaru SUENAGA[1], Masanobu SHIGA[2], Kiyoshi MATSUMOTO[3] ([1]Fukuoka Industrial Technology Center, [2]Dojindo Laboratories, [3]Sojo Univ.)

【目的】バイオフィルムは難治性・慢性感染症の大きな要因の１つであるため、形成されたバイオフィルムの薬剤感受性を迅速かつ正確に把握することは投薬・治療上非常に重要である。そこで、水溶性テトラゾリウム塩を用いた微生物検出法と 96 ピン付きマイクロプレート（フタ）へのバイオフィルム形成法を組み合わせることでハイスループットなバイオフィルム薬剤感受性試験法の開発を行った。
【方法】
(1)検出試薬：水溶性テトラゾリウム塩WST-8と電子メディエータ2-methyl-1,4-naphthoquinone(NQ)を10%DMSO水溶液に溶解し、検出試薬とした。
(2)バイオフィルム形成法：96ウェルマイクロプレートへ最適な培地で調製した微生物懸濁液を分注し、これに96ピン付きマイクロプレート（フタ）を被せて30～37℃で一定時間インキュベーションした。バイオフィルムの形成量はクリスタルバイオレット染色法により測定した。
(3)Biofilm MIC、MBC、MECの逐次測定：96ウェルマイクロプレートに２倍希釈系列濃度の抗生剤溶液180μLを分注し、これにバイオフィルムを形成させた96ピンマイクロプレート（フタ）を被せ、20時間インキュベーションした。インキュベーション後、吸光度測定(660nm)を行い、吸光度が0.1以下のウェルを阻止と判定し、Biofilm MIC（最小発育阻止濃度）を測定した。次に、抗生剤溶液に接触させた96ピン付きマイクロプレート（フタ）を洗浄後、新鮮な培地へ移し、24時間インキュベーションした。回復培養後、同様にして吸光度測定(660nm)を行い、Biofilm MBC（最小殺菌濃度）を測定した。さらに、96ピン付きマイクロプレート（フタ）を検出試薬含有培地へ移し、一定時間反応後、吸光度測定(460nm)を行い、Biofilm MEC（最小撲滅濃度）を測定した。
【結果】種々の微生物を用いて 96 ピン付きマイクロプレート（フタ）へバイオフィルム形成条件の最適化を行った。菌種によって、最適なピン素材、形成時間、培地組成に大きな違いあることが分かった。次に、被検菌として *Staphylococcus aureus* NBRC13276 を用い、抗生剤単独あるいは複数の組み合わせで Biofilm MIC、MBC、MEC の逐次測定を行った。その結果、バンコマイシン、ダプトマイシン、テイコプラニンの組み合わせが有効であることが明らかとなった。本法は、マイクロプレートの底にバイオフィルムを形成させて評価する従来法と比較して、洗浄工程が簡便であり、操作ミスでバイオフィルムを壊す恐れが格段に低かった。また、バイオフィルム内の微生物活性を迅速かつ簡便に測定することが可能であり、抗バイオフィルム剤のスクリーニング法として有望な手法と考えられる。

tetrazolium salt, biofilm, susceptibility testing

講演番号：3B21p14
講演日時、会場：3 月 28 日 16:43～ B 校舎 21 会場

チオフラビン T とローダミン B によって染色される内生胞子特異的構造体の蛍光顕微鏡観察

Fluorescence microscopy of the endospore-specific structures stained with thioflavin T and rhodamine B

○高松 宏治[1]、桑名 利津子[1]、木ノ内 智之[2]、藤田 康弘[2]、山岸 賢治[2]、伊藤 潔[1] ([1]摂南大薬、[2]キリン株品質保証)
○Hiromu TAKAMATSU[1], Ritsuko KUWANA[1], Tomoyuki KINOUCHI[2], Yasuhiro FUJITA[2], Kenji YAMAGISHI[2], Kiyoshi ITO[1] ([1]Setsunan Univ., [2]Kirin Co.)

枯草菌などの Firmicutes 門に属する細菌が形成する胞子（endospore、内生胞子）は、栄養細胞とは異なる構造を持ち、熱・放射線・化学薬品などに対する高い耐久性と、長期休眠能を有する。透過型電子顕微鏡を用いた解析により、Firmicutes 門細菌の胞子は、コア、内膜、コルテックス、外膜、スポアコートの５つの基本構造を持つことが明らかにされている。一方で Firmicutes 門細菌のゲノム研究結果は胞子の構造タンパク質が多様性に富むことを示唆している。我々は Firmicutes 門細菌の胞子に電子顕微鏡で識別できない構造体が存在すると推定し、組換え蛍光タンパク質を用いてその観察を試みてきた。

蛍光染色は細胞構造研究分野における重要な実験技術の１つである。成熟した細菌胞子は強固な構造を持ち、物質透過性が低いため、蛍光染色剤を用いた構造解析が困難な細胞と考えられていた。近年になって枯草菌胞子がチオフラビン T で染色されることが明らかにされた。チオフラビン T はアルツハイマー病患者におけるアミロイドの検出に用いられる蛍光染色剤である。本研究では胞子の構造研究に対する蛍光染色法の有効性を検討するため、枯草菌野生株及び各種胞子形成変異株について、チオフラビン T と、脂質膜などの染色に用いられるローダミン B を混合し、多重染色による蛍光顕微鏡観察を行った。

チオフラビン T は対数増殖期の初期の栄養細胞の細胞質と、胞子形成の中期から後期にかけて胞子の外縁を染色した。母細胞から放出された胞子のチオフラビン T に対する染色性は時間経過と共に低下した。寒天培地上で 24 時間培養した枯草菌の胞子をチオフラビン T で染色したところ、野生株、cgeA 変異株、cotH 変異株、cotX 変異株、spsA 変異株、yabG 変異株の胞子について顕著な違いが認められなかった。一方、スポアコート形成に異常をきたす cotE 変異株、gerE 変異株、safA(yrbA)変異株、spoVID 変異株、spoVIF(yjcC)変異株では、胞子外縁部の染色性が低下し、母細胞内の一部が染色された。ローダミン B はライフサイクルに関係なく、野生株と変異株の栄養細胞および胞子形成細胞の細胞膜と、胞子の外縁部分を染色した。spoVID 変異株の胞子では、ローダミン B の染色部位が野生型胞子と異なり、フォアスポアから母細胞内に偏っていた。これらの結果から、チオフラビン T は主にスポアコートを、ローダミン B は脂質膜とスポアコートに関連する未知の構造体を染色することが示唆された。本研究で開発した蛍光染色技術は胞子の構造研究など基礎分野の利用だけでなく、微生物制御分野などへの応用も可能である。

Bacillus subtilis, endospore, fluorescent stain

講演番号：3B21p15
講演日時、会場：3 月 28 日 16:54～ B 校舎 21 会場

クルクミン分解菌の単離

isolation of curcumin degradating microorganisms

○邵 帥、萩下 大郎、篠田 吉史、清水 昌（京都学園大院）
○Shuai Shao, dairou hagishita, yoshifumi shinoda, sakayu shimizu (kyotogakuen Univ.)

[目的]クルクミンはウコンの根に含まれる天然ポリフェノールの一種である。クルクミン及びクルクミン誘導体において抗ガン性と抗炎活性を示す多数の報告があり、注目されている。クルクミンの溶解度の問題を改善すればさらに用途が広がることが期待される。本研究では自然界からクルクミン分解活性を示す菌株を探索し、クルクミンに対する反応性を調べた。
[方法と結果]クルクミンを単一炭素源として添加した集積培地により、自然界からクルクミンの分解活性を持つ微生物を単離した。通常、クルクミン含有寒天平板培地ではクルクミンの持つ殺菌効果によりコロニーの出現頻度は低かったが、クルクミン濃度（0.0001%）とすることより、コロニーを得ることができた。クルクミンの分解活性は菌体反応により測定した。反応液に添加したクルクミン(0.001%)を 28℃、3 時間で全て分解する能力を有する菌株が 3 株得られた。これらの菌株を用いてクルクミンの分解を経時的に調べたところ HPLC で検出されるクルクミンのピークが減少し、新たなピークが検出された。GC-MS などにより生成物の同定を試みクルクミン分子内の C＝C 結合が C-C 結合への変換などの反応が分解過程に含まれることを推定した。このように新しく単離した菌株についてクルクミンが分解されることが確認された。

curcumin, screening, isolation

講演番号：3B21p16
講演日時、会場：3 月 28 日 17:15～ B 校舎 21 会場

漬物より分離した乳酸菌が有する抱合胆汁酸脱抱合酵素の解析
Comparative analysis of bile salt hydrolases of lactic acid bacteria derived from Japanese traditional pickles
○岩井 克機、尾崎 順哉、吉川 悠子、大橋 典男（静県大食品栄養）
○KATSUKI IWAI, JUNYA OZAKI, YUKO YOSHIKAWA, NORIO OHASHI (Univ. Shizuoka)

【目的】乳酸菌はプロバイオティクスを代表する微生物であり、宿主に対する多彩な保健機能が注目されている。その機能の一つに乳酸菌が産生する抱合胆汁酸脱抱合酵素(BSH)による血中コレステロール濃度減少作用がある。抱合型胆汁酸を遊離型胆汁酸とアミノ酸に加水分解する BSH は同菌種であっても菌株間で活性に差が存在することが知られており、その要因については未だ不明な点が多い。そこで本研究では、当研究室で分離した漬物由来の乳酸菌が有する BSH について、活性を比較するとともに、分子生物学的解析を行った。
【方法】漬物(白菜浅漬け、らっきょう漬け、わさび漬け)から分離した乳酸菌 40 菌株の BSH 活性をグリココール酸(GCA)、グリコデオキシコール酸(GDCA)、タウロコール酸(TCA)、タウロデオキシコール酸(TDCA)の 4 種の抱合型胆汁酸を基質として用いて plate assay により評価し、オルトフタルアルデヒド(OPA)法により定量化した。次に、試験菌株のうち 22 株を占める *Lactobacillus plantarum* の *bsh* 遺伝子の有無および plate assay の結果より、菌株をパターン化し、5 菌株(A1 株、KTe3 株、Tm1-5 株、No. 1 株、No. 7 株)を選抜した。選抜菌株の BSH1-4 のアミノ酸配列を比較し、リアルタイム PCR によって 4 種の抱合型胆汁酸に対する *bsh1-4* mRNA 発現の変化を解析した。
【結果および考察】plate assay および OPA 法にて、最も高い BSH 活性を示した菌種は *L. plantarum* であった。*L. plantarum* の多くの菌株でグリシン抱合型の GCA と GDCA に対する活性が見られ、Tm1-5 株のみタウリン抱合型の TCA に対して活性を示した。また、白菜浅漬け由来の菌株は GCA と GDCA の両方に、らっきょう漬け由来の菌株は GDCA に、わさび漬け由来の菌株は GCA に対し比較的高い活性を示した。*L. plantarum* は、4 種の *bsh* 遺伝子(*bsh1-4*)の存在が知られている。この活性の違いの要因を探るために 5 菌株を選抜し、4 種の BSH のアミノ酸配列を比較解析した。その結果、各菌株間ですべての BSH において 98%以上の高い相同性を示し、活性の違いは BSH 自体の構造によらないことが判った。そこで、OPA 法と同条件下での抱合胆汁酸添加による各菌株の *bsh1-4* mRNA の発現量の変化を解析したところ、抱合胆汁酸の刺激に反応して発現が増加する主な *bsh* 遺伝子は A1 株、KTe3 株および Tm1-5 株では *bsh1*、No. 1 株では *bsh2*、No. 7 株では *bsh3* であることが判った。また、TCA 添加時に Tm1-5 株の *bsh4* 発現量が他の菌株と比べ有意に増加していた。以上の結果より、*L. plantarum* における菌株特有の BSH 活性の差は 4 種 *bsh* 遺伝子の発現量に依存していることが示唆された。

lactic acid bacteria, bile salt hydrolase, probiotics

講演番号：3B21p17
講演日時、会場：3 月 28 日 17:26～ B 校舎 21 会場

ラオス、タイの淡水魚塩辛発酵ペースト（パーデック、プララー）の微生物相、成分分析
Microbial and taste component analysis of salty-fermented freshwater fish paste products in Laos and Thailand

○丸井 淳一朗[1]、Sayvisene BOULOM[2]、Wanchai PANTHAVEE[3]、門馬 真里[1]、楠本 憲一[4]、中原 和彦[1]、齋藤 昌義[1]([1]国際農研、[2]ラオス国立大・農、[3]カセサート大・食品研、[4]農研機構・食総研)
○Junichiro MARUI[1], Sayvisene BOULOM[2], Wanchai PANTHAVEE[3], Mari MOMMA[1], Ken-Ichi KUSUMOTO[4], Kazuhiko NAKAHARA[1], Masayoshi SAITO[1] ([1]JIRCAS, [2]NUoL FAG, [3]IFRPD, [4]NARO NFRI)

【目的】東南アジアの内陸国であるラオスや、隣接するタイ東北部などでは、様々な淡水魚が重要な食料資源となっており、これらを用いた水産発酵食品が伝統的な保存食・調味料として広く普及している。中でも、淡水魚を塩、米糠などと混ぜ合わせ、常温で６か月以上発酵させて作る塩辛様の発酵ペースト調味料（ラオス名：パーデック、タイ名：プララー）は、塩味に加え、後を引くうま味が特徴的で、万能調味料として様々なラオス、東北タイ料理に用いられており、農村部の各家庭で自家製され日常的に食されている。また最近では、都市部などの消費者向けの中・大規模生産も一般的になりつつある。この様な伝統的水産発酵食品は地域の特産品ともなっており、栄養源としてだけではなく、農村地域の生計向上に資する貴重な収入源としても期待できる。また、好まれる味が地域ごとに異なることも興味深い。我々は、現地の共同研究者、生産者らの協力のもと、パーデック、プララーの発酵プロセスの詳細を理解し、品質の向上、生産の安定化に役立つ知識・技術の普及を目指している。本研究では、PCR-DGGE 法を用いた網羅的な手法により、パーデック、プララーの発酵に関与する微生物の多様性、発酵過程での挙動を解析するとともに、特徴的な味に関連する成分との相関について検討した。
【方法及び結果】ラオス、タイ各地で収集した１０種類のパーデック、プララーの塩分、酸度には地域性が示唆され、塩分が低いものほど pH が低い傾向が見られた。各サンプルから抽出した DNA をもとに PCR-DGGE 法で実施した微生物相解析では合わせて１３種類の乳酸菌を検出し、塩分が最も低かったサンプル群からは *Lactobacillus* 属菌が主要な乳酸菌として検出された。一方、それ以外のサンプルでは *Tetragenococcus* 属菌が主なものとして検出された。本研究では、６か月にも及ぶ発酵期間と品質との関連にも着目し、発酵過程の経時観察を可能にするため、実験室規模での発酵試験方法の確立を目指している。本発表では、発酵期間を通じた乳酸菌などの微生物相の変化、特徴的な呈味要素である乳酸含量、pH に加え、うま味成分であるグルタミン酸の消長について報告する。また、これらの研究成果を品質上・生産安定化に役立てるための現地での取り組みについても紹介する。

fermented fish product, PCR-DGGE, lactic acid bacteria

講演番号：3B21p18
講演日時、会場：3 月 28 日 17:37～ B 校舎 21 会場

乳酸菌を用いた犬用発酵ペットフードの機能性評価

Functional valuation of pet food fermented with *Lactobacillus* spp. for dog.

○柳 裕子[1]、坂本 奈穂[1]、神坂 愛理奈[1]、穴井 直博[2]、村松 久司[3]、永田 信治[3] ([1]高知大農、[2]アミール動物病院、[3]高知大・生命環境)
○ Yuko YANAGI[1], Naho SAKAMOTO[1], Erina KAMISAKA[1], Naohiro ANAI[2], Hisashi MURAMATSU[3], Shinji NAGATA[3] ([1]Kochi Univ., [2]Ameal animal hospital, [3]Kochi Univ. L.E.)

【目的】乳酸菌を用いた発酵餌料は、その保存性や消化性、嗜好性が高まると同時に、それを経口摂取することによって動物の腸内細菌叢を改善し、良好な状態を維持することで動物の健康管理に寄与することができる。酸度に富むブンタンやユズなどの柑橘系搾汁残渣は、乳酸菌の生育に有利な環境を与える。また、動物の消化器官系に由来する乳酸菌の中から安定性の優れた乳酸菌を選択することによって、摂食に適した機能性餌料の開発が可能になる。本研究では、植物性の搾汁残渣もしくは動物の新鮮便から分離した乳酸菌を用いた発酵餌料の経口摂取が、犬の腸内環境に与える効果を評価した。さらに免疫賦活化、抗アレルギー、整腸機能をもつ黒酵母の β−グルカンの添加効果を調べた。
【方法】乳酸菌の分離源として、ユズ搾汁残渣と、日齢が 50～250 の幼犬の新鮮便を用いた。乳酸菌の培養は、0.1mg/L シクロヘキシミドと 20%のトマトジュースを添加した MRS 寒天培地を用いて、37℃でアネロパックを用いた嫌気条件下での培養を行った。生じたコロニーを光学顕微鏡下で形態観察し、グラム陽性菌を分離した。分離菌株を 16S rDNA の塩基配列の解析によって同定し、グルコースとグルコン酸を炭素源とするガス産生試験、種々の糖資化性試験、抗菌力試験と、温度・pH・塩濃度の最適な生育条件を検討した。また、腸内環境での生育に優れた乳酸菌を人工胃酸・胆汁末耐性試験によって選別した。さらに、選択した乳酸菌をバナナの果肉の破砕物に添加し、約 1.0×10^7 cfu/g 以上の生菌体が検出されるまで発酵した。発酵餌料を毎日 5g 成犬に摂食させて、餌料の摂食前、摂食 1 週間後、摂食 2 週間後、摂食停止 1 週間後の新鮮便中の、微生物叢と pH、アンモニア濃度、水分含量の測定と、オーナーによる排便状況の観察を行った。さらに、同様の方法で β−グルカンを添加した発酵餌料による摂取試験を、犬由来の乳酸菌を用いて行った。
【結果】ユズ由来 *Lactobacillu plantarum* OR318 を用いた発酵餌料の摂食中において、新鮮便中に乳酸菌の増加とアンモニア濃度の減少が見られ、摂取停止後でも、高齢の成犬（チワワ）1 頭で著量の乳酸菌が検出された。犬（パピヨン：日齢 250）由来 *L. reuteri*　KRN12 を用いた発酵餌料の摂食でも、摂取試験を通して全体的にアンモニア濃度の減少が見られた。また、乳酸菌のみを摂食させたときと比較して、β−グルカンを同時摂食させたとき、著しいアンモニア濃度の減少が見られたと同時に、新鮮便中の水分含量が著しく高くなった。このことは、食物繊維でもある β−グルカンの保水性の効果と考えられる。以上のことは、乳酸菌を用いた発酵餌料の摂食によって犬の腸内環境の改善が可能であると示唆された。

Lactobacillus, probiotics, pet food

講演番号：3B21p19
講演日時、会場：3 月 28 日 17:48～ B 校舎 21 会場

黒酵母 β-グルカンの微生物と植物の生育に対する影響

Influence on growth of a microbe and the plant of the black yeast ß - glucan

○池上 裕倫[1]、河原崎 樹子[2]、齋藤 寛俊[2]、長瀧 充[1]、村松 久司[2]、永田 信治[2]([1]株式会社ソフィ、[2]高知大農)
○ Yasunori Ikeue[1], mikiko Kawarazaki[2], Hirotoshi Saitou[2], Mitsuru Nagataki[1], Hisashi Muramatsu[2], Shinji Nagata[2] ([1]Sophy Inc., [2]Kochi Univ.)

【目的】黒酵母が菌体外に生産する水溶性 β-1,3-1,6-グルカン(SBG)は、食品添加物として認可されており、様々な食品に利用されている。SBG については、免疫賦活・血糖値改善・整腸作用など数多くの機能性評価の結果がすでに報告されており、健康食品、病院や介護分野での利用が活発化している。一方で、これまでの機能性の評価は、摂取したヒトや動物を対象とした研究に限られていた。そこで本研究では、加工食品への応用を目的し、SBG が微生物や植物にもたらす影響を検討した。
【方法】SBG は、*Aureobasidium pullulanns* AFO-202 株を通気撹拌培養して得た β-1,3-1,6-グルカンを含む培養液を使用した。SBG は、遠心分離とエタノール沈殿により不溶性画分(f1)、水溶性低分子画分(f2)、水溶性多糖画分(f3)に分画し試験に用いた。試験菌株には、子犬の新鮮便より採取した *Lactobacillus reuteri* 6 菌株、ブンタンとユズの搾汁残渣、ヤーコンの破砕物から採取した *L. plantarum* 3 菌株の乳酸菌を用いた。SBG 存在下での乳酸菌の増殖を観察するため、MRS 液体培地で 37℃にて 2 日間静置培養した各菌株の前培養液を、終濃度が 0,5,10,20%になるよう SBG を添加した MRS 液体培地中に植菌し、37℃で振とう培養して経時的に菌数と濁度を測定した。また、SBG を終濃度 0,5,10,20%になるよう添加した生理食塩水中で、各試験菌株を 37℃で 1 時間振とう培養した後、MRS 寒天培地に塗布して、37℃にて 4 日間嫌気培養した後コロニー数を測定した。生理食塩水の代わりに、HCl で pH2.5 に調製した MRS 液体培地に 1.0%ペプシンを添加した培養液を用いて、37℃で 3 時間または 5 時間振とう培養して、胃酸耐性試験を行った。同様に、MRS 液体培地に胆汁粉末を 0.3-1.0%添加した後、37℃で 3 時間振とう培養して、胆汁耐性試験とした。各耐性試験には、SBG を終濃度 10%になるよう添加した試験群を作成し、コロニー数から算出する生存率を比較した。植物はカイワレ大根の種子を用いて、SBG が発芽率と成長率に与える影響を観察した。種子 10 粒をシャーレに入れて、終濃度がそれぞれ 0,5,10,20%になるよう SBG を添加した蒸留水中で、蛍光灯を用いて 24 時間光を当てつつ、37℃で 5 日間水耕栽培した。
【結果】SBG の添加により、ほとんどの菌株で濁度・菌数共に増加し、乳酸菌の増殖が促進されることが示唆された。また、SBG を添加することで、生理食塩水、胃酸、胆汁末中での生存率が改善された。試験菌株により、SBG に対する反応性は異なっており濃度依存的ではなかったが、SBG10%の濃度で良好な結果が得られた。カイワレ大根も、SBG 存在下で発芽率、成長率ともに良好な結果が得られ、最適濃度は 5-10%であった。

Glucan, *Aureobasidium*, *Lactobacillus*

講演番号：3B21p20
講演日時、会場：3 月 28 日 17:59～ B 校舎 21 会場

薬物代謝酵素発現酵母を用いた医薬品および食品成分代謝物の調製

Whole cell-dependent production of drug and polypehnolic food metabolites using gene engineered yeast cells

○西川 美宇[1,2]、高平 梨可[2]、藤井 美春[1]、小池 りりい[1]、安田 佳織[2]、生城 真一[2]、榊 利之[2]([1]TOPU バイオ研究所、[2]富山県立大学)
○Miyu NISHIKAWA[1,2], Rika TAKAHIRA[2], Miharu FUJII[1], Ririi KOIKE[1], Kaori YASUDA[2], Shinichi IKUSHIRO[2], Toshiyuki SAKAKI[2] ([1]TOPUBIO Rerearch Co., Ltd., [2]Toyama Pref., Univ.)

【背景・目的】 2008 年に米国食品医薬品局から提出された「代謝物の安全性評価に関するガイダンス」により、医薬品開発においては親化合物だけでなくその代謝物についても安全性評価が必要になってきた。また、医薬品や機能性食品成分は代謝により吸収動態や薬効および生理活性が変化することが往々にしてあり、代謝物機能性評価の必要性が高まっている。このような背景を受けて、より効率的な代謝物調製法の確立が望まれている。本研究では、出芽酵母発現系を用いて種々の薬物代謝酵素発現系を構築し、種々の医薬品やポリフェノール代謝物の合成を試みた。
【方法】 酵母発現用ベクターを用いてヒトおよび哺乳類由来シトクロム P450(CYP)、UDP-グルクロン酸転移酵素 (UGT)、硫酸基転移酵素 (SULT)、カテコール-O-メチルトランスフェラーゼ(COMT)遺伝子を出芽酵母 AH22 株に導入し、薬物代謝酵素発現酵母株を構築した。酵母の静止菌体懸濁液にモデル化合物である 7-エトキシクマリンおよび 7-ヒドロキシクマリンを添加し、代謝活性を評価した。また、既存医薬品やポリフェノールを含む様々な化合物の代謝物合成し、分取クロマトグラフィーによる精製を行った。
【結果】 これまでに、医薬品やポリフェノールなどの基質化合物から、水酸化体、グルクロン酸抱合体、硫酸抱合体、およびメチル化体などの代謝物合成に成功し、1L の反応系で数十～数百ミリグラムの代謝物製造が可能となった。複数の代謝経路を持つ化合物においては、最適分子種の選択により特異的な代謝物製造が可能であった。また、ヒト以外の哺乳類由来 UGT 分子種発現株を用いることにより、複数の医薬品からアシルグルクロン酸抱合体を効率良く製造することに成功した。さらに、種々のポリフェノールについて、グルクロン酸、硫酸抱合体およびメチル化体の合成に成功した。分取クロマトグラフィーによる反応抽出液からの目的代謝物の分離精製を行い、高純度な代謝物精製品を得ることができた。多様な発現系を有する本代謝物調製技術は、幅広い基質化合物の効率的な代謝物製造に有用であると考えられる。

drug metabolizing enzymes, yeast expression system, drug metabolites

講演番号：3B41a02
講演日時、会場：3 月 28 日 09:11～ B 校舎 41 会場

Pseudomonas putida における好気呼吸鎖末端酸化酵素の発現調節
Regulation of multiple terminal oxidases for aerobic respiration in *Pseudomonas putida*
○酒井 義瑛、石井 正治、新井 博之（東大農）
○Yoshiaki SAKAI, Masaharu ISHII, Hiroyuki ARAI (Univ. of Tokyo)

【目的】*Pseudomonas* 属細菌は環境中に広く存在する好気性細菌であり、多様な代謝機能を持つことで知られている。代表的な菌種である緑膿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)は日和見性の病原菌であり、多くの動植物に対して病原性を示すのに対し、類縁菌の *Pseudomonas putida* には病原性がなく、多くの芳香族化合物を分解する能力を持つことから、環境浄化への利用が期待されている。緑膿菌と *P. putida* はともに、好気呼吸の末端酸化酵素を 5 種類(bo_3, CIO, aa_3, cbb_3-1, cbb_3-2)持っており、生育環境に応じてこれらを使い分けることで環境適応していると考えられる。両菌が持つ 5 種類の末端酸化酵素は互いに相同であるが、それらの発現パターンに違いがある。緑膿菌では酸素に対する親和性の高い cbb_3 タイプの末端酸化酵素が主要に働き、*P. putida* では親和性の低い bo_3 タイプの末端酸化酵素が主要に働くことが分かっている。このような違いが、病原性等の両菌の表現型の違いの要因の一つと考えられる。そこで、本研究では *P. putida* の各末端酸化酵素の発現調節について詳細に調べ、緑膿菌との違いを明らかにすることを目的とした
【方法・結果】各種培養条件における *P. putida* の各末端酸化酵素の転写活性を、*lacZ* との転写融合を用いたプロモーターアッセイにより調べた。5 種の末端酸化酵素のうち aa_3、cbb_3-1(緑膿菌の cbb_3-2 に相当)、CIO については緑膿菌の末端酸化酵素の発現パターンと同様の結果が得られた。このことから *P. putida* の aa_3、cbb_3-1、CIO については緑膿菌の末端酸化酵素と同様の発現制御を受けていると考えられた。また、bo_3 は緑膿菌では発現量が低く、鉄飢餓で発現が上昇することが知られていたが *P. putida* では構成的に発現していた。一方、cbb_3-2(緑膿菌の cbb_3-1 に相当)は緑膿菌では構成的に発現していることが知られているが、*P. putida* での発現量は常に低く、スーパーオキシド発生剤であるメチルビオロゲン添加で発現量が上昇した。これらの結果から、*P. putida* の cbb_3-2 は酸化ストレスで誘導されることが示唆された。

Pseudomonas aeruginosa, *Pseudomonas putida*, terminal oxidase

講演番号：3B41a03
講演日時、会場：3 月 28 日 09:22～ B 校舎 41 会場

緑膿菌における NADH 脱水素酵素の発現制御に関する研究

Regulation of NADH dehydrogenases in *Pseudomonas Aeruginosa*

○藤田 結香、酒井 義瑛、石井 正治、新井 博之（東大農）
○Yuka FUJITA, Yoshiaki SAKAI, Masaharu ISHII, Hiroyuki ARAI (Univ. of Tokyo)

【目的】緑膿菌（*Pseudomonas aeruginosa*）は複数のエネルギー獲得機構を有する環境遍在菌であり、その呼吸鎖は高度に分岐している。これまでに緑膿菌は 5 種類の末端酸化酵素を持つことが分かっており、各末端酸化酵素の発現制御や機能について解析がなされてきた。一方、呼吸鎖への電子の取り込み口である NADH dehydrogenase には、プロトン排出能を持つ NDH-Ⅰ、プロトン排出能を持たない NDH-Ⅱ、Na^+輸送性の Na^+-NDH が存在することがゲノム解析から分かっている。しかし、それらの発現制御と機能については不明である。本研究ではこれら 3 種類の NADH dehydrogenase の発現制御についての知見を得ることを目的とした。

【方法・結果】3 種類の NADH dehydrogenase 遺伝子のプロモーター領域と *lacZ* との転写融合断片をゲノム中に組み込んだ株を作製し、種々の培養条件下での各プロモーターの転写活性を調べた。NDH-Ⅰのプロモーター活性は複合培地を用いた時に高いが、グルコースやクエン酸を炭素源として用いた場合や炭素飢餓の場合には低いことが示された。また、低酸素条件で低く、嫌気条件では高いことが分かった。一方、NDH-Ⅱ、Na^+-NDH については培養条件によるプロモーター活性の顕著な変化は見られなかった。これらの結果から、緑膿菌ではプロトン排出能を持つ NDH-Ⅰの発現量を変化させることによって、酸化還元バランスを調節するしくみがあると考えられた。

Pseudomonas Aeruginosa, NADH dehydrogenase, respiration

講演番号：3B41a04
講演日時、会場：3 月 28 日 09:33～ B 校舎 41 会場

超好熱菌 *Thermococcus kodakarensis* の転写制御因子
Transcriptional regulation of hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakarensis*
○福田 青郎[1]、内田 圭亮[1]、JAZIRI Abdul Aziz[1]、市村 瑞葉[1]、何 あゆみ[1]、金井 保[2]、跡見 晴幸[2]、今中 忠行[1] ([1]立命館大生命、[2]京大院工)
○Wakao FUKUDA[1], Keisuke UCHIDA[1], Abdul Aziz JAZIRI[1], Mizuho ICHIMURA[1], Ayumi GA[1], Tamotsu KANAI[2], Haruyuki ATOMI[2], Tadayuki IMANAKA[1] ([1]Ritsumeikan Univ., [2]Kyoto Univ.)

【研究背景・目的】超好熱菌は 16S/18S rRNA 遺伝子配列に基づいた進化系統樹において根の近傍に位置しており、ゲノムサイズも他の生物と比べ小さい傾向にあることから、超好熱菌の生命メカニズムは非常に単純化されていると考えられている。本研究では超好熱菌の生命メカニズム解明を目指す。

生命は細胞内外の状況に応じて転写・翻訳量を調節し、必要なタンパク質を合成する。この転写調節は生命の定義の一つともいえる「恒常性維持」にとって非常に重要であり、現在までに様々な生物の転写調節に関する研究報告がなされてきた。しかしながら超好熱菌の持つ転写制御因子の中で働きが明らかになっているものはほんの一部であり、大部分の転写因子の役割は不明である。超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* においても、ゲノム解析より 82 個の転写制御因子の存在が予想されているが、他のアーキアと同様にその働きが明確な転写制御因子はほんのわずかである。そこで本研究では超好熱菌 *T. kodakarensis* を題材とし、遺伝子破壊により各転写因子の細胞内における働きを解明することで、超好熱菌の転写調節について広範囲の知見を得ることを目的とした。

【方法・結果】これまでに約 60 種類の転写制御因子について遺伝子破壊株作製を試みた。その結果、48 個の転写調節因子について遺伝子破壊に成功し、16 個については遺伝子破壊株が得られなかった。破壊できなかった遺伝子は、少なくとも今回の遺伝子破壊株単離条件において生育に必須であると考えられた。またこれまでに得られた遺伝子破壊株関してマイクロアレイ解析を行い、遺伝子破壊が転写制御に与える影響を解析することで、各転写調節因子の役割を推察した。本発表ではこれら遺伝子破壊株の性質について、その一部を紹介する。

得られた破壊株の一つ ΔTK0169 株は野生株に比べ増殖速度と最終到達濁度の低下が見られた。ΔTK0169 株のマイクロアレイ解析の結果、キチン代謝に関わる多くの遺伝子で顕著な転写量の増加がみられた。そこで実際に野生株と ΔTK0169 株のキチンの分解能の比較を行った結果、ΔTK0169 株ではキチン分解能が活性化していた。また、転写調節因子の破壊により、生育塩濃度範囲が変化する（より高塩濃度での生育が可能になる）株や高エタノール含有培地で生育可能になる株、運動性が著しく低下する株など様々な特徴を示す株が得られた。

Archaea, Transcriptional regulator, Hyperthermophile

講演番号：3B41a05
講演日時、会場：3 月 28 日 09:44～ B 校舎 41 会場

高度好熱性細菌 *Thermus thermophilus* における ArgR を介した新規アルギニン生合成転写調節機構
Novel ArgR-mediated transcriptional regulation mechanism of arginine biosynthesis in an extremely thermophilic bacterium *Thermus thermophilus*

○森貞 志穂[1,2]、岩永 直樹[1]、富田 武郎[1]、西山 千春[2]、葛山 智久[1]、西山 真[1]（[1]東大生物工学セ、[2]東京理大生物工学科）
○Shiho MORISADA[1,2], Naoki IWANAGA[1], Takeo TOMITA[1], Chiharu NISHIYAMA[2], Tomohisa KUZUYAMA[1], Makoto NISHIYAMA[1] ([1]BRC, The Univ. of Tokyo, [2]Dept. of Biol. Sci. Technol., Tokyo Univ. of Sci.)

【目的】一般に細菌においてアルギニン生合成は転写因子 ArgR による制御を受けることが知られている。高度好熱菌 *T. thermophilus* も同様であり、アルギノコハク酸合成酵素をコードする *argG* 遺伝子を先頭とするアルギニン生合成遺伝子クラスターが ArgR によって特に強く調節を受けていることが我々が以前に行った *argR* 破壊株のマイクロアレイ解析により明らかになっている。我々は *argG* 上流には 3 つの ArgR 結合部位(*argGO1*, *argGO2*, *argGO3*)が存在し、*argG02* に結合した ArgR 六量体が *argGO1*、*argGO3* とループ構造を形成しながら結合し、これが *argG* 以下の遺伝子の強い転写抑制の要因となっていることを示唆してきた。今回我々は上記の 3 つ以外に *argG* の遺伝子内部にも 1 か所 ArgR 結合部位（*argGO4*)が存在していることを見出した。*argGO4* は *argG01-03* とは約 500 bp も離れた位置に存在し、転写抑制における役割は不明である。そこで本研究では *argGO4* に焦点を当てた解析を行い、*argG* の転写調節機構の全容を解明することを目指した。
【方法・結果】大腸菌を宿主とし His タグを付加した ArgR を発現・精製した。*argGO4* を含む DNA プローブとその変異型プローブを作製し、これらを用いて EMSA を行った。野生型のプローブを用いた EMSA では ArgR との結合が見られたが、変異型プローブを用いたものでは結合が見られなかった。*T. thermophilus* HB8 株の *argGO4* に EMSA で用いた変異型プローブと同様の変異を有する組換え株を作製し、定量 PCR 解析を行った結果、変異株で *argG* 遺伝子の転写量の増大が見られた。これらのことから *argGO4* が ArgR を介した *argG* 遺伝子の転写調節機構において重要な役割を持つことが明らかになった。*argGO4* は *argG* がコードする酵素の基質認識に重要なアミノ酸残基をコードする部位である。このことは、酵素活性発現のために重要なアミノ酸残基がそれをコードする塩基配列上でも転写制御における重要な意味を持つという遺伝子構造形成における新規なモデルが存在する可能性を示唆している。

Thermus thermophilus, *argR*, transcriptional regulation

講演番号：3B41a06
講演日時、会場：3 月 28 日 10:05～ B 校舎 41 会場

酢酸菌 *Gluconacetobacter europaeus* における転写調節因子 *Ge*Lrp の機能解析

Functional analysis of transcriptional regulator *Ge*Lrp in *Gluconacetobacter europaeus*

○石井 友理[1]、赤坂 直紀[2]、佐古田 久雄[2]、藤原 伸介[1] ([1]関西学院大院理工、[2]マルカン酢株式会社)
○Yuri Ishii[1], Naoki Akasaka[2], Hisao Sakoda[2], Shinsuke Fujiwara[1] ([1]Kwansei Gakuin Univ., [2]Marukan Vinegar Co. Ltd.)

酢酸菌 *Gluconacetobacter europaeus* は高いエタノール酸化能力及び酢酸耐性を備えており、食酢工業生産に広く用いられている微生物である。当該酢酸菌において、内在性遺伝子及び栄養要求性を、それぞれ選択マーカー遺伝子及び選択圧とした遺伝子破壊系が確立されている[1)]。また、本菌の潜在型プラスミドを用い、大腸菌及び他属の酢酸菌においても複製可能なシャトルプラスミドが構築された[2)]。本菌は遺伝子破壊法に加え、プラスミドを用いた代謝改変技術の基盤が確立されている。我々は抗生活習慣病作用を有する分岐鎖アミノ酸(BCAA:バリン、ロイシン、及びイソロイシン)を産生する *G. europaeus* の変異株を取得した[3)]。ゲノム解析、特異的遺伝子破壊による検証を通じて、大腸菌においてアミノ酸代謝遺伝子群の発現を包括的に制御する転写因子 leucine responsive regulatory protein (Lrp)の *G. europaeus* におけるオルソログ(*Ge*Lrp)の機能欠損が、BCAA 生産能を付与する決定因子である事を明らかにした[4)]。*Ge*Lrp は、BCAA 生合成における律速酵素遺伝子(*ilvIH*)のリプレッサーとして機能しており、*ilvIH* の転写量は、*Ge*lrp 破壊株で顕著に上昇していた[4)]。また、*Gelrp* 完全欠損株(KGMA7110 株(Δ*pyrE* Δ*Gelrp*::*pyrE*))は最少培地において著しい生育遅延を示し、その遅延は 20 種の基本アミノ酸添加により解消された事から、*Ge*Lrp も大腸菌 Lrp と同様に、アミノ酸代謝全般を制御する事が示唆された。これらを踏まえ、BCAA に加えてどのアミノ酸の代謝が *Ge*Lrp により制御されているかを明らかにするため、20 種のアミノ酸を 1 つずつ添加した最少培地で KGMA7110 株を培養したところ、メチオニンの添加により生育遅延が部分的に解消された。更に、メチオニンを基質として合成される S-アデノシルメチオニン(SAM, メチル基供与体)の添加でも、上記同様の生育回復効果が見られた。また、定量 PCR により、生合成系遺伝子群の発現動態を調べた結果、KGMA7110 株では SAM 合成酵素遺伝子(*metK*)の転写レベルが著しく減少していた。これより、*Ge*Lrp は BCAA、メチオニン、及び SAM 生合成遺伝子群の転写を制御しており、*ilvIH* に対してはリプレッサー、*metK* に対してはアクチベーターとして機能する事が示唆された。この特性は、大腸菌 Lrp のものとは異なる。現在、*Ge*Lrp タンパク質を精製し、被制御遺伝子に対する作用機序、リガンド分子に対する特異性を検討している。

【引用文献】(1) Akasaka et al, Appl. Environ. Microbiol., 79, 7334 (2013). (2) Akasaka et al, J. Biosci. Bioeng., in press (2014). (3) 赤坂ら, 生物工学会誌, 90, 374 (2012). (4) Akasaka et al, J. Biosci. Bioeng., 118, 607 (2014).

acetic acid bacteria, leucine responsive regulatory protein, amino acid metabolism

講演番号：3B41a07
講演日時、会場：3 月 28 日 10:16～ B 校舎 41 会場

Rhodobacter sphaeroides 2.4.1 の 5-アミノレブリン酸（ALA）生合成遺伝子の転写制御に関する研究

Study on the regulation of 5-aminolevulinic acid synthase genes in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1

○天野 修[1,2]、石井 正治[1,2]、新井 博之[1,2] ([1]日本農芸化学会、[2]東大院農生科)
○Osamu AMANO[1,2], Masaharu ISHII[1,2], Hiroyuki ARAI[1,2] ([1]JSBBA, [2]Univ. of Tokyo)

5-アミノレブリン酸 (ALA) は動植物の生体内に存在する天然アミノ酸であり、ヘム、バクテリオクロロフィル、コバラミンなどのポルフィリンの前駆体である。これらのポルフィリンは呼吸や光合成に必要であり、微生物の多様なエネルギー代謝を支えているため、ALA の生合成は微生物の生存戦略において重要である。最近では、ALA は植物の生長促進剤として利用されているほか、化粧品、育毛剤、そして医療面での応用が進められている。

Rhodobacter sphaeroides 2.4.1 はαプロテオバクテリアに属する紅色非硫黄細菌であり、様々な環境で生育できる。好気条件下では好気呼吸を行い、嫌気条件下では酸素非発生型の光合成、もしくは嫌気呼吸を行う。本菌は ALA 生合成酵素をコードする遺伝子を２つ（*hemA*、*hemT*）持っている。通常は *hemA* のみが発現していて、スクシニル CoA とグリシンから ALA を生合成する。*hemT* の発現は *hemA* 破壊株において確認されているが、野生株における発現条件や調節機構は不明である。本研究では *R. sphaeroides* 2.4.1 の *hemT* の発現制御を明らかにすることを目的とした。

マイクロアレイ解析により、野生株において一酸化窒素（NO）発生剤である sodium nitroprusside（SNP）の添加条件で *hemT* の発現が示されたので、*hemT* プロモーターと *lacZ* との転写融合プラスミドを用いたプロモーターアッセイによりさらに詳細な発現条件の解析を行った。また、*hemT* 遺伝子の近傍には MocR タイプのレギュレーターをコードする RSP3026 が存在したため、この遺伝子の破壊株を作製し、*hemT* の発現への影響を調べた。プロモーターアッセイより RSP3026 破壊株において *hemT* の構成的な発現が認められたため、RSP3026 の遺伝子産物は *hemT* の発現制御に関わるリプレッサーであると示唆された。

Rhodobacter sphaeroides, ALA, *hemT*

講演番号：3B41a08
講演日時、会場：3 月 28 日 10:27～ B 校舎 41 会場

大腸菌における GGDEF/EAL ドメインタンパク質 YliE/YliF の機能解析

Functional Analysis of GGDEF/EAL domain proteins, YliE and YliF, in *E. coli*

○草間 慶弘[1]、渡部 大樹[1]、今野 環[2]、久下 貴紀[2]、塚田 海斗[1]、杉本 華幸[1,2]、渡邉 剛志[1,2]、鈴木 一史[1,2] ([1]新潟大院・自然科、[2]新潟大農・応生化)
○ Yoshihiro KUSAMA[1], Daiki WATANABE[1], Tamaki KONNO[2], Takaki KUGE[2], Kaito TSUKADA[1], Hayuki SUGIMOTO[1,2], Takeshi WATANABE[1,2], Kazushi SUZUKI[1,2] ([1]Grad. Sch. Sci. Technol., Niigata Univ., [2]Fac. Agri., Niigata Univ.)

【目的】bis-(3'-5')-cyclic-diguanosine mono phosphate（c-di-GMP）は細菌の新規セカンドメッセンジャーであり、細菌の運動性、バイオフィルム形成、病原性、細胞間シグナルなどを制御している。c-di-GMP は GGDEF ドメインを持つ DGC（Diguanylate cyclase）によって合成され、EAL ドメインを持つ PDE（Phosphodiesterase）によって分解される。大腸菌 K-12 株には 29 個の GGDEF/EAL ドメインタンパク質が存在しているが、多くのタンパク質の機能は明らかになっていない。我々は、機能未知の GGDEF/EAL ドメインタンパク質をコードする 10 個の遺伝子をクローン化し、過剰発現株でバイオフィルム形成量や運動性を調査した。その結果、GGDEF ドメインタンパク質 YliF 及び EAL ドメインタンパク質 YliE が顕著に影響を及ぼすことがわかった。今回、YliE 及び YliF の機能解明を目的に研究を行い、以下の結果を得た。
【方法・結果】YliE 及び YliF は共に膜貫通領域を持つタンパク質である。*yliE* 遺伝子の直後には *yliF* 遺伝子が位置し、これらはオペロンを形成していることが明らかとなった。大腸菌 MG1655 株でプラスミドにクローン化した *yliE, yliF* を過剰発現させたところ、バイオフィルム形成量は *yliE* 発現により減少し、*yliF* 発現により増加した。一方、運動性はどちらの遺伝子の発現でも減少した。また、DGC 活性及び PDE 活性に重要なアミノ酸残基のアラニン残基への置換によりこれらの表現型が変化したことから、YliE 及び YliF は c-di-GMP 代謝活性を示すことが示唆された。次に、*yliE* や *yliF* の欠損変異株を作製し、バイオフィルム形成や運動性等への影響について調べたところ、バイオフィルム形成量には顕著な変化は認められなかったが、*yliE* 欠損株において運動性の減少が認められた。これらのことから、YliE/YliF は、特に運動性に影響を与えると考えられた。運動性は様々な要因により制御されているが、まず初めに YliE/YliF が鞭毛マスターレギュレーターFlhDC の発現量に与える影響を調べた。*yliE* や *yliF* の欠損株において、*flhDC* 発現量を *flhDC* と *lacZ* が融合した *flhDC'-'lacZ* translational fusion を用いて測定した。その結果、*yliF* 欠損株に変化はなかったが、*yliE* 欠損株において *flhDC'-'lacZ* の発現量が増加した。しかし、この現象だけで YliE/YliF が運動性に及ぼす影響を説明することは困難であり、YliE/YliF 及び c-di-GMP が関与する複雑な制御機構の存在が示唆された。

c-di-GMP, GGDEF, EAL

講演番号：3B41a09
講演日時、会場：3 月 28 日 10:38～ B 校舎 41 会場

大腸菌 type I toxin-antitoxin 遺伝子システム *ldr*/*rdl* における遺伝子発現制御機構

Gene expression regulation of *ldr*/*rdl* type I toxin-antitoxin system in *Escherichia coli*

○川野 光興、石本 巧、水吉 智彦、橋本 兼吾（新潟薬大）
○ Mitsuoki KAWANO, Takumi ISHIMOTO, Tomohiko MIZUYOSHI, Kengo HASHIMOTO (Niigata Univ. of Pharm. and Appl. Biol.)

大腸菌で発見された *ldr/rdl* 遺伝子ユニットは type I toxin-antitoxin (TA) システムに分類される。これは、毒素タンパク質をコードしている mRNA の翻訳シグナル配列近傍に抗毒素であるアンチセンス RNA が結合し、mRNA の翻訳を抑制する遺伝子発現制御システムである。*ldrD/rdlD* 遺伝子ユニットでは *ldrD* が毒素、*rdlD* が抗毒素にあたるが、RdlD RNA は *ldrD* の翻訳シグナル配列には結合せず、*ldrD* 翻訳シグナル配列より 39 塩基以上上流の配列と結合する。しかし RdlD RNA 非存在下において LdrD の翻訳活性値が上昇したことから、RdlD RNA は *ldrD* の翻訳を間接的に抑制すると考えられる。

ldrD の翻訳における RdlD RNA の役割を調べるため、*ldrD* mRNA と RdlD RNA の結合領域を見直したところ、翻訳シグナル配列および翻訳開始コドン UUG を発見した。この UUG からの翻訳は *ldrD* の翻訳終結コドン UAA まで行われる。我々はこの UUG から UAA までの ORF を *ldrDX* と名付け、RdlD RNA が *ldrDX* の翻訳を抑制することにより *ldrD* が翻訳抑制されるのではないかと考えた。

この仮説を検証するため、アラビノース存在下でプラスミドから *ldrD* mRNA を転写する株と、アラビノース存在下でプラスミドから *ldrDX* の翻訳開始コドン UUG が翻訳終結コドン UAG に塩基置換された *ldrD* mRNA を転写する株を用いて生育を比較した。その結果、野生型の *ldrD* mRNA を転写する株では生育阻害がみられたが、*ldrDX* が翻訳されない *ldrD* mRNA を転写する株では生育阻害がみられなかった。このことから *ldrD* の翻訳には *ldrDX* の翻訳が必要であることが示唆された。

次に *ldrD* の翻訳には *ldrDX* がどの程度翻訳される必要があるのか調べた。*ldrDX* が 7 aa だけ翻訳される *ldrD* mRNA を転写する株と、*ldrDX* が 12 aa だけ翻訳される *ldrD* mRNA を転写する株を用いて解析したところ、*ldrDX* が 7 aa 翻訳される株では生育阻害がみられなかったが、12 aa 翻訳される株では生育阻害が生じた。つまり *ldrDX* の翻訳が少なくとも 12 aa 以上であれば *ldrD* が翻訳されることがわかった。また、LdrDX は 55 aa からなるが、最初の 12 aa の翻訳でも生育阻害を引き起こすことから、LdrDX タンパク質自体は *ldrD* の翻訳には必要ではないことが示唆された。

この機構を調べるため *ldrD* mRNA の二次構造を調べたところ、*ldrD* の翻訳シグナル配列は上流の相補的な配列とステムループ構造を形成することが予想された。そこで、このステムループ構造を解消する変異が導入され、さらに *ldrDX* が翻訳されない変異型 *ldrD* mRNA を発現する株を用いたところ生育阻害がみられた。よって、*ldrDX* が翻訳されることでステムループ構造が解消され、*ldrD* の翻訳シグナル配列にリボソームがアクセス出来るようになり *ldrD* が翻訳されることが考えられた。

toxin-antitoxin, antisense RNA, post-transcriptional regulation

講演番号：3B41a10
講演日時、会場：3 月 28 日 10:49～ B 校舎 41 会場

PCB 分解菌がもつビフェニル分解遺伝子群の 2 つの制御因子による制御

Regulation of the biphenyl degradation genes by two regulators in a PCB degrading bacterium

○金井 拓也、前田 理久 (明治大院農)
○Takuya KANAI, Michihisa MAEDA (Meiji Univ.)

Alcarigenes denitrificans A41 株は、PCB/ビフェニル分解遺伝子群（*bph* 遺伝子群）を染色体中のゲノミックアイランド上に保持する。*bph* 遺伝子群は最上流に存在するプロモーターから一つの転写単位で転写され、その発現には *bph* 遺伝子群上流に位置するリプレッサータンパク質の BphS と、ゲノム上離れた場所にある二成分制御系、DctS/DctR が関与している。われわれは BphS および二 DctS/DctR による *bph* 遺伝子群の制御システムの分子機構を明らかにするために研究を行っている。

bph 遺伝子群のプロモーター領域には BphS 結合部位、DctS/DctR のレスポンスレギュレーター (RR) 結合部位がそれぞれ 1 か所(BS I), 5 か所(*bphE* 遺伝子から上流に向かって RR I～RR V)存在することが示唆されている。今回はプロモーター領域のデリーション解析を行い、2 つの転写制御因子が *bph* 遺伝子群の転写に影響を与える領域を詳細に決定した。

bph 遺伝子群のプロモーター領域を組み込んだレポータープラスミドで転写活性を測定したところ、この系におけるビフェニルによる転写の誘導比は 3 であった。RR I を欠損させてもビフェニルによる転写誘導比には変化はなかったが、BS I を欠損させた場合ではビフェニルによる誘導は見られなくなった。RR II および RR III を欠損させた場合、ビフェニルによる誘導は見られないが、転写活性が段階的に増強された。RR IV、RR V および RR 遺伝子を欠損させた場合では転写活性ははほぼ消失した。

bphS 欠損株では活性を有したすべてのレポータープラスミドにおいて、野生株に比べて活性が 10 分の 1 程度に低下した。また、DctS/DctR の 2 つの遺伝子のうち片方あるいは両方を破壊した株では、保有するレポータープラスミドの種類に関わらず転写活性はほぼネガティブコントロールレベルであった。

以上の結果から、*bph* 遺伝子群のビフェニルによる転写誘導は BphS に大きく依存していること、RR II および RR III と RR の相互作用は *bph* 遺伝子群転写に抑制的にはたらくことが示された。RR IV および RR V は、RNA ポリメラーゼホロ酵素が結合するプロモーター候補(-35 および-10 領域)とほぼ重複するため、この領域が基底転写活性に必須な領域であることが示唆された。また、BphS がビフェニルによる誘導の中心的役割以外に遺伝子群の活性化に関わっている可能性が示唆された。

Biphenyl degradation, Two-component system, Transcriptional regulator

講演番号：3B41a11
講演日時、会場：3 月 28 日 11:10～ B 校舎 41 会場

枯草菌での 2 つの転写因子 YulB および CcpA を介したラムノース異化に関わるオペロンの制御機構
Regulatory mechanism of the operon involved in rhamnose metabolism by two transcriptional factors, YulB and CcpA, in *Bacillus subtilis*

広岡 和丈、○小土井 祐介、藤田 泰太郎（福山大生命工・生物工）
Kazutake HIROOKA, ○Yusuke KODOI, Yasutaro FUJITA (Fukuyama Univ.)

枯草菌は植物根圏にも普遍的に存在し、根から滲出する種々の有機化合物を栄養源としている。我々は、枯草菌ゲノムからラムノース異化に関わる酵素群とその発現制御を担う転写因子をコードする *yuxG-yulBCDE* オペロンを見出し、その機能解析を行っている。ラムノースは、細胞壁ペクチン・根から分泌される粘液質・フラボノイド配糖体などの植物由来物質の構成成分であるので、根圏土壌中には比較的豊富に存在しており、枯草菌はこのオペロンを発現させてラムノース資化を行っていると考えられる。

これまでの研究から、DeoR ファミリーに属する YulB 転写因子は二量体を形成し、*yuxG* 上流の 2 つの不完全なダイレクトリピートを含む領域に結合することが示されている。欠失 DNA プローブを用いたゲルシフト解析の結果、2 つのダイレクトリピートのうち、上流側に位置するものが YulB の DNA 結合に不可欠であり、下流側の方を欠失させた場合は YulB の結合親和性の低下と 2 段階のバンドシフトが観察された。これにより二分子の YulB 二量体が *yuxG* 上流制御領域に結合することが推定された。この制御領域には、カタボライト制御を司る CcpA の認識配列である *cre* が下流側のダイレクトリピートと重なる形で存在しており、実際に CcpA/P-Ser-HPr 複合体が結合することが DNase I フットプリント解析で確認されている。*yuxG-yulBCDE* オペロンの各遺伝子に pMUTIN プラスミドの挿入をもつ枯草菌株に *ccpA* 破壊をさらに導入して構築した各菌株と、*yuxG* プロモーターと *lacZ* との連結を *amyE* 座に導入した枯草菌株を用いてレポーター解析を行った結果、*yuxG* プロモーターの誘導は YulB、YulE、および YulC が存在する菌株を炭素源としてラムノースを添加した培地で生育させた場合にのみ検出された。このことから、YulB が制御領域に結合してオペロンの発現を負に制御しており、ラムノースイソメラーゼである YulE とラムヌロキナーゼである YulC によってラムノースが変換されて生じたラムヌロース-1-リン酸がエフェクターとして作用して、YulB による抑制を解除することが強く示唆された。また、YulB、YulE、YulC、および CcpA が存在する菌株をグルコースとラムノースの両方を添加した培地で培養すると、ラムノースによる誘導効果はグルコースが消費されるまで抑制されたことから、YulB が脱抑制されたとしてもグルコース存在下では CcpA によってカタボライト抑制を受けると考えられた。

Bacillus subtilis, rhamnose, transcriptional regulation

講演番号：3B41a12
講演日時、会場：3 月 28 日 11:21～ B 校舎 41 会場

Geobacillus kaustphillus のイノシトール代謝系遺伝子群の発現制御

Organazation and Transcription of the Inositol operon in *Geobacillus kaustphillus*

○田中 耕生[1]、白江 雄介[2]、岡田 大[2]、竹中 慎二[1,2]、吉田 健一[1,2] ([1]神戸大・自、[2]神戸大・農)
○ Kosei TANAKA[1], Yusuke SHIRAE[2], Atsushi OKADA[2], Shinji TAKENAKA[1,2], Ken-ichi YOSHIDA[1,2] ([1]Kobe Univ. Advanced Science and Technology, [2]Kobe Univ. Agrobioscience)

Geobacillus kaustophilus HTA426 株(GK) は、マリアナ海溝深海底泥から単離された生育至適温度が 60ºC の好熱性バチラス属細菌である。本株のゲノム配列情報よりイノシトールを分解・代謝するための全遺伝子セットが推定され、またイノシトールを唯一の炭素源として生育することも確かめられている。我々は、HTA426 株のイノシトール代謝に関わる *iol* 遺伝子群が 2 つのオペロンから構成され、そのいずれもの転写がイノシトールにより誘導されることを見出した。バチルス属細菌を代表する枯草菌において、イノシトール代謝遺伝子群（*iol* オペロン）は IolR リプレッサーによって制御されており、イノシトール存在下では代謝中間生成物が IolR に結合することにより転写抑制が解除される誘導制御系が明らかとなっている。しかし、GK では IolR のホモログが見いだされないことから、枯草菌とは異なる代謝制御系が存在すると推定されている。

GK においてイノシトール代謝の初発反応酵素とそれに次ぐ反応を担う酵素である GK1899 （イノシトールデヒドロゲナーゼ）と GK1890（イノソースデヒドロゲナーゼ）の遺伝子をそれぞれ破壊したところ、両株ともイノシトールを唯一の炭素源として増殖できなくなった。このことから、これらの遺伝子はイノシトール代謝に必須であることが明らかであるが、この場合でもイノシトール分解系遺伝子群の発現は依然としてイノシトールによって誘導されていた。従って、GK において細胞内の誘導物質はイノシトール代謝中間産物ではなく、また枯草菌で示された制御系では説明ができない。

イノシトール分解系遺伝子群の上流領域を PCR にて増幅し、この DNA と特異的に結合するタンパク質を探索した結果、アラビノース代謝遺伝子群の制御因子として推定された AraR タンパク質が見いだされた。GK においても *araR* 遺伝子は他のバクテリアと同様にアラビノース代謝遺伝子群と隣接しているのでアラビノース代謝の転写制御を行っていると考えられてきたが、この結果はイノシトール代謝への関与を示唆しており、現在も更なる検討を加えているところである。

Geobacillus kaustphillus, inositol, transcriptional regulation

講演番号：3B41a13
講演日時、会場：3 月 28 日 11:32～ B 校舎 41 会場

Fusarium graminearum のキシラナーゼ制御因子 Xyr1 の機能解析
Functional analyses of xylanase regulator Xyr1 in *Fusarium graminearum*
○古崎 貴大、前田 一行、中嶋 佑一、金丸 京子、小林 哲夫、木村 真 (名大院生命農)
○Takahiro KOSAKI, Kazuyuki MAEDA, Yuuichi NAKAJIMA, Kyouko KANAMARU, Tetsuo KOBAYASHI, Makoto KIMURA (Graduate Sch. of Bioagric. Sci., Nagoya Univ.)

【目的】 *Fusarium graminearum* は宿主植物に感染する際、細胞壁を構成するアラビノキシランを分解するのに必要なキシラナーゼやアラビノフラノシダーゼを分泌する。Xyr1 はこのような酵素遺伝子の発現を制御する $Zn(II)_2Cys_6$ 型転写因子であり、生じた五単糖の代謝に必要な遺伝子群の転写やさらにセルラーゼ遺伝子などの転写を制御し、植物細胞壁の分解に重要な役割を果たしていると考えられる。そこで Xyr1 による細胞壁分解酵素の制御機構について解析を進めることとした。

【方法と結果、考察】 まず *F. graminearum* 3 菌株を用い、RBB-xylan 寒天培地および CMC 寒天培地で培養してキシラナーゼおよびセルラーゼの産生についてそれぞれ調べた。JCM 9873 株と H3 株ではカーボンカタボライト抑制（CCR）がかかるが MAFF 111233 株ではかからず、CCR 感受性は JCM 9873 株の方が H3 株よりも高かった。JCM 9873 株と H3 株の *Fgxyr1* 遺伝子破壊株を作成してキシロース液体培地で培養したところ、培養上清のキシラナーゼ産生は予想通り著しく低下したがセルラーゼ（BGL と CBH）活性は逆に上昇していた。この傾向は特に H3 株の方で顕著に見られた。

MAFF 111233 株から細胞内タンパク質を抽出し Xyr1 抗体を用いてウエスタンブロットを行ったところ、キシロースの添加の有無によって量的な変化は観察されなかった。この結果は、Xyr1 が *A. nidulans* の XlnR と同様に常に細胞内に局在し、キシロース誘導によってタンパク質レベルで修飾を受け活性が調節されていることを示唆する。そこで Xyr1 をより高い感度で検出するため、ゲノムの元の位置のプロモーターとコード領域の間に強力な TEF プロモーターを挟み込み、構成的過剰発現株を構築した。キシロース存在下で培養すると Xyr1 のバンド全体がゲル上方にシフトしリン酸化による活性化が起きていることが示唆された。現在、Phos-tag™ を添加したゲルを用いてリン酸化状態の量的差異を検出できるかどうか試みているところである。

Xyr1 の C 末端領域は XlnR と相同性が高く、リン酸化を受けると考えられるセリン、スレオニン残基が高度に保存されている。そこで C 末端への部分的な欠損（75、166 aa）やリン酸化候補残基のアラニンへの置換を行い、キシラナーゼ産生への影響を調べているところである。これらの結果についても合わせて報告する予定である。

【謝辞】 本研究は農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業シーズ創出ステージ「ケミカルバイオロジーを基盤とした革新的な農薬等の探索研究」として行われているものである。

XlnR, xylanase regulator Xyr1, *Fusarium graminearum*

講演番号：3B41a14
講演日時、会場：3 月 28 日 11:43～ B 校舎 41 会場

Ralstonia sp.NT-80 株におけるリパーゼ転写調節因子 LipR80-4 の機能解析
Functional analysis of lipase transcription factor LipR80-4 in the *Ralstonia* sp.NT-80
○多勢 真大、関谷 麻美、赤沼 元気、石塚 盛雄（中央大学）
○Masahiro TASE, Mami SEKIYA, Genki AKANUMA, Morio ISHIZUKA (Chuo Univ.)

【背景と目的】
Ralstonia sp. NT80 のリパーゼ（LipA）はステアリルアルコール等の高級アルコールによって顕著に発現誘導される。その誘導効率は一般的にリパーゼの誘導剤として用いられるダイズ油と比較するとおよそ 17 倍にも及ぶ。しかしながら、この特殊な誘導機構に関する詳細な分子メカニズムは解明されていない。一方、*Pseudomonas alcaligenes* においては、リパーゼの発現が LipQR 二成分制御系によって制御されていることが見出されている。二成分制御系では、外界からのシグナルをリン酸化酵素 LipQ が感知し、転写調節因子 LipR をリン酸化することで活性化する。活性化された LipR は、*lipA* の転写調節領域に直接結合し、転写を促進する。
私たちは NT-80 においても *P. alcaligenes* と同様の転写因子が存在し、リパーゼ遺伝子の転写を制御しているのではないかと考え、*lipQR* ホモログ遺伝子を探索し、NT-80 ゲノム上に *lipR* ホモログがいくつか存在することを確認した。そこで本研究では *P. alcaligenes* の LipR と最も相同性の高い LipR80-4 が *lipA* の転写を誘導するのかを検証するとともに、その作用機構について解明することを目的とした。
【結果と考察】
lipR80-4 遺伝子破壊株を作製し、ステアリルアルコール添加時において、培養上清リパーゼ活性及び *lipA* 転写量を解析した結果、野生株と比較して活性、転写量ともに低下することが確認された。*lipR80-4* 破壊株では、*lipA* 転写量が野生株と比較して、約 90%低下した。このことから、LipR80-4 が *lipA* の転写促進因子として機能していることが示唆された。
このような結果をうけ、*lipA* 上流のプロモーター領域(200 bp)と転写因子 LipR80-4 との相互作用を検証するため、精製 LipR80-4 を用いた EMSA を行った。その結果、精製 LipR80-4 を添加したときのみ、シフトバンドが観察された。従って、LipR80-4 は *lipA* の転写を直接誘導していると考えられる。また、プローブ鎖長を限定することで、LipR80-4 が *lipA* 上流 41～119 bp 付近に結合することを明らかにした。現在、DNase I footprinting により LipR80-4 の結合配列特定を試みている。今回はその結果についても報告したい。

Ralstonia sp.NT-80, lipase, transcription factor

講演番号：3B41p02
講演日時、会場：3 月 28 日 14:11～ B 校舎 41 会場

糸状菌における鉄恒常性のマスターレギュレータ　HapX　の機能解析

Functional analysis of HapX, a master regulator of iron-homeostasis in filamentous fungi

○村田 俊輔、中村 隼人、金子 優平、志水 元亨、加藤 雅士 (名城大農)
○Shunsuke MURATA, Hayato NAKAMURA, Yuhei KANEKO, Motoyuki SHIMIZU, Masashi KATO (Meijo Univ.)

[背景・目的]
HapX は、我々の研究グループが初めて CCAAT-box 結合因子（HapB/C/E 複合体）と相互作用する因子として見出した真菌類に特有の転写因子である。HapX は鉄欠乏時に鉄を含むタンパク質の遺伝子発現を抑制するなどして、鉄の恒常性維持機構の中心的な役割を果たしている。我々は既に、HapB/C/E 複合体存在下での HapX の DNA 結合様式についての研究を詳細に進めてきた。今回は HapX の機能の解明を目的とし、HapX と HapB/C/E 複合体との相互作用の解析ならびに HapX と相互作用する因子の探索を試みた。

[方法・結果]
HapB/C/E 複合体との推定相互作用ドメイン（HCI ドメイン）を欠失させた変異 *hapX* 遺伝子を作製し、*hapX* 欠失株（*ΔhapX* 株）を形質転換することで、HapX の HCI ドメイン欠失株（*Δhcid* 株）を作製した。HCI ドメインを欠失させた *Δhcid* 株は、*ΔhapX* 株と同様に鉄制限下での生育が著しく悪くなった。この結果から、このドメインが HapX の機能に重要な働きをしていることが示された。さらに，HCI ドメインの機能を *in vitro* で詳細に調べるために、それぞれのリコンビナントタンパク質を大腸菌に発現させ精製した。精製したリコンビナントタンパク質を用いて、ゲルモビリティーシフトアッセイを行ったところ、HCI ドメインを欠失させた変異 HapX は、野生型の HapX に比べ HapB/C/E 複合体との相互作用が著しく低下していた。以上の結果より、HCI ドメインが HapB/C/E 複合体との相互作用に必要であることが強く示唆された。さらに、HapX と相互作用する因子を探索するために、HapX の C-末端部位に FLAG-His-tag を融合し、*ΔhapX* 株で発現させた。鉄存在および鉄制限条件下で培養後、それぞれの細胞抽出液を FLAG ビーズと Ni ビーズで二段階精製後、SDS-PAGE に供した結果、鉄制限条件下に特異的な相互作用タンパク質が複数見出された。現在これらの相互作用タンパク質の同定を進めている。

HapX, HapB/C/E complex, EMSA

講演番号：3B41p03
講演日時、会場：3 月 28 日 14:22～ B 校舎 41 会場

Molecular mechanisms underlying McmA-dependent discrimination of ManR/ClrB-regulated cellulase and mannanase genes in *Aspergillus*

○Nuo Li, Emi Kunitake, Kyoko Kanamaru, Makoto Kimura, Tetsuo Kobayashi (Nagoya Univ.)

Aspergillus nidulans produces high level of cellulolytic and hemicellulolytic enzymes, which are promising tools for industrial hydrolysis of cellulosic biomass. ManR/ClrB, a Zn_2Cys_6 transcription factor, was identified in both *A. oryzae* and *A. nidulans* independently, as a transcriptional activator involved in regulation of mannanase and cellulase genes. In the case of regulation of cellulase genes, another global transcription factor McmA that binds to CeRE (Cellulose Responsive Element, $CCGN_2CCN_6GG$) recruits ManR to the CeRE region. However, expression of the β-mannosidase gene (*mndB*) is dependent on ManR but not McmA. In this study, we provided more evidences for necessity of CeRE for recognition by McmA and ManR. And the McmA-independent regulation of mannanase gene expression by ManR was also confirmed at the level of DNA binding.

Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) using His_6-tagged McmA and Flag-tagged ManR-DNA binding domain with the *eglB* (Endoglucanase B) promoter regions as probes gave the results similar to those with the *eglA* (Endoglucanase A) promoter, that is, ManR could not bind to the *eglB* CeRE without assistance of McmA. The *eglB* promoter carries overlapped CeRE sequences in the opposite direction ($CCGN_2CCN_6GGN_2CGG$). As McmA binding consensus is CCN_6GG, the CCG/CGG triplets outside of the consensus might serve as sequences required for recruitment of ManR. To evaluate this possibility, probes with mutations in the CCG/CGG triplets were used for EMSA. Supershift assay with anti-Flag antibody was applied to examine whether ManR is in the DNA protein complex. As a result, the mutation of the both CCG/CGG sequences caused stronger binding of McmA but ManR recruitment was abolished. Results of mutation on either one of the CGG triplets indicated that the right side CGG is necessary for ManR to be recruited to CeRE on the *eglB* promoter. The expression of *mndB* was not McmA dependent and its promoter lacked CeRE, which suggested that ManR/ClrB can bind to the promoter without assistance of McmA. EMSA using various probes with intact and mutated sequences led to identification of three binding sites containing $CGGN_8CCG$. The repoter assay using the *taaG2* structural gene showed that ***CGG***AGCGAAAC***CCG*** that located at -547 ~ -560 relative to the translation start site of *mndB* works best as the recognition site of ManR *in vivo*.

本研究は生研センター「イノベーション創出基礎的研究推進事業」と農林水産省「農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業」の支援を受けて行われた。

cellulase and hemicellulase, ManR/ClrB, binding site

講演番号：3B41p04
講演日時、会場：3 月 28 日 14:33～ B 校舎 41 会場

ヘミセルロースの分解・代謝を制御する糸状菌転写因子 XlnR/AraR の DNA 結合特性

DNA-binding properties of XlnR/AraR, transcription factors regulating hemicellulose degradation in *Aspergillus oryzae*

○石川 香南、金丸 京子、木村 真、小林 哲夫 (名大院生命農)
○Kana ISHIKAWA, Kyoko KANAMARU, Makoto KIMURA, Tetsuo KOBAYASHI (Nagoya Univ.)

【目的】XlnR と AraR は *Aspergillus* 属糸状菌のもつ $Zn(II)_2Cys_6$ 型の転写因子である。これら因子の制御下遺伝子は特にペントース代謝系遺伝子群で重複しており、いずれの因子も発現を正に制御するにも拘らず、互いに競合するという現象が制御下遺伝子の転写解析で観察される。昨年度本大会では、XlnR と AraR が同一の配列に結合することがこの競合の一因であることを、*xyrA* と *larA* のプロモーター上の結合配列の同定で示唆した。そこで本研究では、両者の DNA 結合を巡る競合を *in vitro* で証明するとともに、ペントース代謝系酵素をコードする残りの遺伝子 *ladA*、*lxrA*、*xdhA*、*xkiA* のプロモーター領域に存在する XlnR、AraR の結合部位の同定、また、XlnR と AraR に制御される *larA* 及び XlnR のみに制御される *xynF1* の XlnR、AraR 結合配列の網羅的変異解析を行い、単独制御、競合制御を決定する塩基配列の特徴を探索した。

【結果・考察】大腸菌を宿主として生産した XlnR、AraR の DNA 結合ドメインを用い、*ladA*、*lxrA*、*xdhA*、*xkiA* プロモーターに存在する DNA 結合部位を同定したところ、AraR は *ladA* 及び *xdhA* ではそれぞれ 2 箇所、*lxrA* 及び *xkiA* ではそれぞれ 1 箇所の 5’-CGGNNA(A/T)(A/T)-3’に結合し、XlnR も同配列に結合することが示された。*xyrA*、*larA*、*xdhA* プロモーターに存在する XlnR と AraR の重複結合配列について、XlnR、AraR 共存在下での DNA 結合を解析したところ、両者の競合が実験的に示された。さらに、*larA* プロモーター内の AraR 結合配列と *xynF1* プロモーター内の XlnR 結合配列を用いて XlnR、AraR の結合配列の網羅的変異解析を行った結果、AraR 特異的、XlnR 特異的、ならびに両者共有の結合配列が存在することが明らかとなった。また、上記の解析の過程で XlnR の結合分子数が結合配列によって異なることが明らかとなった。おそらく *xynF1*-X1 部位、*xynG2*-X1、X2 部位に対しては 2 分子の、*xynG2*-X3 部位と上記ペントース代謝系遺伝子プロモーターの結合部位には 1 分子の XlnR が結合するものと考えられる。

本研究は、農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業の一貫として行われたものである。

Aspergillus oryzae, transcription factor, DNA-binding

講演番号：3B41p05
講演日時、会場：3 月 28 日 14:44～ B 校舎 41 会場

Taka-amylase 遺伝子三重破壊株を用いた麹菌アスパルテックプロテアーゼ遺伝子 *pepO* の上流域の解析

Analysis on the promotor rigion of aspartic protease gene *pepO* using α-amylase disruptant *A. oryzae*

○山崎 周平[1]、水谷 治[2]、前田 浩[1]、山形 洋平[1]、竹内 道雄[1]([1]東京農工大院・応生化、[2]独立行政法人酒類総合研究所)
○SHUHEI YAMAZAKI[1], OSAMU MIZUTANI[2], HIROSHI MAEDA[1], YOHEI YAMAGATA[1], MICHIO TAKEUCHI[1] ([1]Tokyo Univ. of Agriculture and Technology, [2]National Research Instisute of Brewing)

【目的】*A. oryzae* RIB40 を酸性領域で培養すると, プロテアーゼとしては, エンド型プロテアーゼである菌体外分泌型アスパルテックプロテアーゼ PepO を主に生産することが知られている。そのため PepO をコードする *pepO* 遺伝子上流には転写促進に寄与する *cis*-element が存在すると考えられた。本研究では, *pepO* プロモーターの *cis*-element の同定を目的として, Taka-amylase 三重破壊株を宿主に用い, α-amylase をレポーターとしたレポーターアッセイ法により *pepO* のプロモーター活性を調べるとともに, Taka-amylase 遺伝子三重破壊株を用いたレポーターアッセイ法を確立し, より簡便なプロモーター活性の解析方法を見出すことも目的とした。

【方法】*pepO* プロモーターの *cis*-element を明らかとするため, *pepO* ORF 上流 −2,000 bp, −1,500 bp, −1,400 bp, −1,300 bp, −1,200 bp, −1,100 bp, −1,000 bp, −500 bp の塩基配列と, *amyB* 遺伝子を連結したプラスミドを作製した。これらを用いて Taka-amylase 遺伝子三重破壊株を形質転換し, single copy の形質転換体である TF_P*pepO* シリーズを取得した。

pepO 遺伝子が高い発現量を示す窒素源としてダイズタンパク質を含む Czapek-Dox 液体培地で 3 日間振とう培養を行い, 24 h ごとに培養上清中の α-amylase 活性と, RT-PCR による *amyB* mRNA の存在量を測定した。

【結果・考察】培養 3 日目の各 TF_P*pepO* シリーズ株の α-amylase 活性を比較した結果, *pepO* 上流 1,300 bp を連結した TF_P1300 株が顕著に活性の上昇を示し, TF_P1400 株の約 2.5 倍, TF_P1200 株の約 4 倍の活性を示した。また, TF_P1000 株では TF_P1100 株の 1/4 にまで活性の減少を示した。これらの結果より, *pepO* 上流 −1,400 bp ~ −1,300 bp に repressor 結合領域, −1,300 ~ −1,200 bp と −1,100 bp ~ −1,000 bp に actovator 結合領域の存在が示唆された。

また *amyB* mRNA 量を測定した結果、各株の培養 2 日目の *amyB* mRNA 存在量と, 培養 3 日目の α-amylase 活性値に相関が認められた。したがって, 培養 3 日目の α-amylase 活性は, *pepO* プロモーターの転写活性を正しく反映しており, α-amylase と Taka-amylase 三重破壊株を用いたレポーターアッセイ法は, プロモーターの機能を解析する上で有効な手法であると考えられた。

なお、本研究の一部は、生研センター基板研究推進事業の一環として行われたものである。

Aspergillus oryzae, transcriptional regulation, acidic protease

講演番号：3B41p06
講演日時、会場：3 月 28 日 15:05～ B 校舎 41 会場

麹菌解糖系遺伝子の選択的転写開始に関わるプロモーターと 5′非翻訳領域の解析

Analyses of promoter and 5'untranslated region that involve in alternative transcription of glycolysis genes in*Aspergillus oryzae*

○井上 大志、田路 洋紀、高間 充、田中 瑞己、新谷 尚弘、五味 勝也（東北大農）
○taishi inoue, hiroki toji, mitsuru takama, mizuki tanaka, naohiro sintani, katsuya gomi (Tohoku Univ.)

［目的］

麹菌（*Aspergillus oryzae*）のゲノム解析データと EST 解析データの比較から、解糖系酵素遺伝子であるエノラーゼ遺伝子（*enoA*）とグリセルアルデヒド 3 リン酸脱水素酵素遺伝子（*gpdA*）は、培養条件の違いに応じて異なる２つの転写開始点を用いている可能性が見出された。特に *enoA* においては、グルコースやフルクトースのような主に解糖系で代謝される炭素源で生育させた場合はプロモーター下流から、一方エタノールや酢酸のような糖新生で代謝される炭素源で生育させた場合はプロモーター上流から転写開始が行われるという、炭素源の種類お違いによる選択的な転写開始機構が存在することが明らかとなった。また興味深いことに、*enoA* が上流から転写される際の 5’UTR 内に、下流からの転写開始点を含んだ 440 bp にも及ぶ長大なイントロンが存在することが認められた。解糖系という生物の基幹代謝に関わる遺伝子においてこのような現象は初めての発見であり、その転写開始に関わる詳細な分子機構やその生理的意義については不明である。本研究ではこれらの解明に向け、*enoA* 上流転写開始に関わる転写因子やプロモーター上のシスエレメントの同定と上流からの転写における 5’UTR 内イントロンの重要性について検討した。また、*enoA*, *gpdA* 以外の解糖系酵素遺伝子における選択的転写開始機構の有無についても検討した。

［方法・結果］

プロモーターの欠失変異シリーズと部位特異的変異導入を与えたプロモーターのレポーターアッセイおよびゲルシフト（EMSA）解析を行い、*Aspergillus nidulans* において糖新生の制御に重要であるとされている転写因子 AcuK, AcuM が *enoA* の上流からの転写に関与することが示され、そのシスエレメント配列を同定することができた。さらに、5’UTR 内イントロン欠失プロモーターのレポーターアッセイと定量 RT-PCR 解析により、5’UTR 内のイントロンが *enoA* プロモーターの上流から転写される mRNA 量の増加に関与している可能性が示された。また、５’SAGE と RNA-seq 解析によって異なる転写開始点が利用されていることが予想された解糖系遺伝子について、上流域と下流域それぞれから転写される mRNA を判別できるよう設計したプライマーを用いた定量 RT-PCR 解析により、解糖系遺伝子である *fbaA*, *pgkA* も同様な選択的転写開始機構を有する可能性が新たに示された。

Aspergillus oryzae, glycolysis, gluconeogenesis

講演番号：3B41p07
講演日時、会場：3 月 28 日 15:16～ B 校舎 41 会場

固体培養特異的発現を示す麹菌のグルコアミラーゼ遺伝子（*glaB*）の発現を制御する転写因子 FlbC の機能

Functional analysis of *Aspergillus oryzae* transcription factor FlbC involved in the expression of the gene, *glaB*, specifically expressed in solid-state culture

○吉村 緑[1]、田中 瑞己[1]、小川 真弘[2]、小山 泰二[2]、新谷 尚弘[1]、五味 勝也[1]（[1]東北大院農、[2]野田産研）
○Midori YOSHIMURA[1], Mizuki TANAKA[1], Masahiro OGAWA[2], Yasuji KOYAMA[2], Takahiro SHINTANI[1], Katsuya GOMI[1] ([1]Tohoku Univ., [2]NISR)

【背景・目的】

麹菌（*Aspergillus oryzae*）は、原料穀類や小麦ふすまなどを基質として用いた固体培養において液体培養よりも酵素生産が増加することが知られており、古くから醸造産業などにおいて固体培養が広く利用されてきた。特に、グルコアミラーゼの 1 つである GlaB は、液体培養ではほとんど発現しないが固体培養において大量に生産されることが知られている。しかし、その固体培養特異的な遺伝子発現制御機構についてはほとんど解明されていない。そのため、固体培養特異的な制御に関わる転写因子を同定し、それを利用した発現系を構築することにより、固体培養における有用物質の高生産が可能になるものと期待される。そこで本研究では、（公財）野田産業科学研究所などによって作製された麹菌転写因子遺伝子破壊株ライブラリーを利用し、GlaB 生産量が減少する株をスクリーニングすることで固体培養特異的遺伝子発現の制御に関わる転写因子を探索した。

【方法・結果】

麹菌のグルコアミラーゼ *glaB* の固体培養特異的な発現は、菌糸成長阻害条件、低水分活性条件、高温培養条件という 3 条件により誘導される。この条件を満たす培養条件として、50%マルトースを含む寒天培地（低水分活性）に載せたナイロン膜上（菌糸成長阻害）で麹菌を培養し、ナイロン膜に分泌吸着された GlaB を抗体反応で再現性高く検出することに成功した。この方法を用いて転写因子遺伝子破壊株ライブラリー434 株のスクリーニングを行い、選抜した株において小麦ふすまを用いた固体培養を行い，グルコアミラーゼ活性と α-アミラーゼ活性を測定した。その結果，α-アミラーゼ活性に対するグルコアミラーゼ活性が *glaB* 破壊株と同程度まで低下した株が 1 株得られた。この株について Northern blot 解析を行ったところ、*glaB* の発現が顕著に低下していた。この株は分生子形成に関わることが報告されている C_2H_2 型転写因子 FlbC の遺伝子破壊株であったことから，FlbC と同様の経路で機能する他の転写因子破壊株について GlaB 生産を調べたが，顕著な生産低下は認められなかった。さらに，GlaB と同様に固体培養で特異的に生産されるプロテアーゼとチロシナーゼを測定したところ，*flbC* 破壊株では酸性プロテアーゼ活性の低下がみられ，FlbC は GlaB の発現だけでなく酸性プロテアーゼ遺伝子の発現にも関与する可能性が示唆された。現在 *flbC* 破壊株について Northern blot による *pepA* や *melB* などの発現解析を行っている。

（本研究は「農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業」の支援を受けて行われた。）

Aspergillus oryzae, transcription factor, solid-state culture

講演番号：3B41p08
講演日時、会場：3 月 28 日 15:27～ B 校舎 41 会場

麹菌の転写因子 AtrR と SrbA のアゾール系薬剤耐性への関与と細胞内局在解析

Involvement in azole drugs resistance and subcellular localization analyses of transcription factors, AtrR and SrbA, in Aspergillus oryzae

○杉山 航平[1]、大場 歩[1]、萩原 大祐[2]、田中 瑞己[1]、新谷 尚弘[1]、川本 進[2]、五味 勝也[1]([1]東北大学院・農・生物産業創成科学、[2]千葉大・真菌センター)
○ KOHEI SUGIYAMA[1], AYUMI OHBA[1], DAISUKE HAGIWARA[2], MIZUKI TANAKA[1], TAKAHIRO SHINTANI[1], SUSUMU KAWAMOTO[2], KATSUYA GOMI[1] ([1]Div. Biosci. Biotechnol. Future Bioind., Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ., [2]MMRC, Chiba Univ.)

【目的】

医療上深刻な問題となっているアスペルギルス症の主な原因菌である *Aspergillus fumigatus* に対する有効な薬剤としてアゾール系薬剤が汎用されているが、糸状菌の示す多剤薬剤耐性が大きな障害となっている。近縁種である麹菌 *Aspergillus oryzae* が示すアゾール系薬剤耐性には ABC トランスポーターが関与しており、これら遺伝子群は $Zn(II)_2Cys_6$ 型転写因子 AtrR によって制御されている。また、*AfatrR* 破壊株の RNA-seq 解析により、AtrR は ABC トランスポーターのみならず、bHLH 型転写因子 SrbA 制御下のエルゴステロール生合成酵素遺伝子群(*erg* 遺伝子群)の発現にも関わっていた。このことは AtrR と SrbA が *erg* 遺伝子群を協調的に制御していることを示唆しており、その制御機構の解明を目指した。

【方法および結果】

AtrR の *erg* 遺伝子群への関与を調べるため、麹菌の *atrR/srbA* 二重破壊株を作製し、アゾール系薬剤を含む培地上で生育試験を行ったところ、二重破壊株は *atrR* 単独破壊株と同様の感受性を示した。次に、各転写因子破壊株の定量 PCR 解析を行ったところ、*srbA* 破壊株では *erg* 遺伝子群の発現量が低下していたが、*atrR* 破壊株では ABC トランスポーター遺伝子のみならず、*erg* 遺伝子群の発現量も低下していた。また、いずれの破壊株でも互いの転写因子の発現量には影響が認められなかったことから、一方の転写因子が他方の転写因子の発現を制御しているわけではないことが示された。

制御機構の全容解明には 2 つの転写因子の細胞内局在を観察する必要があったため、N 末端側と C 末端側それぞれに GFP を連結させたプラスミドを構築し、各転写因子破壊株に導入した。その結果、AtrR は構成的に核に局在し、SrbA は核周辺(小胞体/ゴルジ体)に局在していた。また、*gfp-srbA* 株において clotrimazole 処理後に局在観察を行うと、核に局在を示す菌糸がいくつか見られた。このことから、アゾール系薬剤の添加による細胞内エルゴステロール濃度の低下がシグナルとなり、SrbA の N 末端側の bHLH ドメインが核に移行していることが示唆された。現在、AtrR と SrbA の相互作用を調べるため、*atrR* 破壊株における SrbA の局在観察やタンパク質レベルでの挙動を解析中である。

transcription factor, azole drug resistance, ergosterol

講演番号：3B41p09
講演日時、会場：3 月 28 日 15:38～ B 校舎 41 会場

麹菌のアミラーゼ誘導生産におけるマルトース資化遺伝子（*MAL*）クラスターの役割
The important role of maltose-utilizing gene (*MAL*) cluster in inducible production of amylolytic enzymes in *Aspergillus oryzae*
○市川 昂典、長谷川-城 祥子、田中 瑞己、新谷 尚弘、五味 勝也（東北大院・農・産業創成）
○Takanori ICHIKAWA, Sachiko HASEGAWA-SHIRO, Mizuki TANAKA, Takahiro SHINTANI, Katsuya GOMI (Grad. Sch. Agric., Tohoku Univ.)

【研究背景】麹菌 *Aspergillus oryzae* は、古来より発酵産業に利用されてきた安全性の高い糸状菌であり、アミラーゼをはじめとするデンプン分解酵素を多量に生産することから清酒醸造に利用されている。麹菌のアミラーゼ遺伝子の発現は転写因子 AmyR が制御しており、AmyR はマルトース、もしくはイソマルトースによって活性化されると考えられている。そのため麹菌のアミラーゼ生産には、誘導基質であるマルトースの菌体内への取り込み、及び資化が重要な過程であると考えられる。麹菌においてマルトース資化は、マルトーストランスポーターMalP、菌体内α–グルコシダーゼ MalT、これらを制御する転写因子 MalR からなるマルトース資化遺伝子クラスター (*MAL* cluster) が主要な役割を果たしている。そこで *MAL* cluster と麹菌のアミラーゼ誘導生産への関与の解明を目指した。

【方法】*MAL* cluster の各遺伝子破壊株を作製し、マルトースまたはデンプンを炭素源に用いたプレートアッセイを行った。また *malP* 破壊株、*malR* 破壊株をマルトース液体培地で培養し、α-アミラーゼの誘導生産の解析を行った。同時にノーザンブロット解析によるアミラーゼ遺伝子の発現解析と、培地中のマルトース濃度測定による菌体内へのマルトースの取り込みの測定を行った。さらにイソマルトース培養時のアミラーゼ遺伝子の発現解析を行った。

【結果】プレートアッセイの結果、マルトース培地では *malP* 破壊株、*malT* 破壊株の生育の悪化が、デンプン培地ではすべての破壊株で生育の悪化が観察された。また *malP* 破壊株、*malR* 破壊株において、マルトース液体培地における培養初期のα-アミラーゼ誘導生産の低下が観察されると同時に、アミラーゼ遺伝子発現の遅延、および菌体内へのマルトースの取り込みの遅延が観察された。特にα-アミラーゼ生産の低下と発現・取り込みの遅延は *malP* 破壊株でより顕著であった。このことから、麹菌のアミラーゼ生産にはマルトーストランスポーターによるマルトースの取り込みが重要な過程であることが示唆された。
一方イソマルトースとマルトースによるアミラーゼ遺伝子の発現を観察すると、イソマルトースの方が発現誘導が早いことから、AmyR の誘導活性化基質はイソマルトースであることが示唆された。またマルトース培養とは異なり、イソマルトース培養では野生株と *malP* 破壊株においてアミラーゼ遺伝子発現に差は認められなかった。
これらのことから、マルトース培養時における麹菌のアミラーゼ生産は、マルトーストランスポーターMalP によって取り込まれたマルトースが、MalT などの菌体内α-グルコシダーゼによる糖転移を受け、生成されたイソマルトースによって転写因子 AmyR が活性化されると予想された。さらに、菌体内でイソマルトース生成に及ぼす *malT* の機能についても解析結果を報告する予定である。

Aspergillus oryzae, amilolytic genes, inducing sugar

講演番号：3B41p10
講演日時、会場：3 月 28 日 15:49～ B 校舎 41 会場

麹菌のカーボンカタボライト抑制関連因子 CreA・CreB 二重破壊株はセルロース系バイオマス分解酵素も高生産する

Hyperproduction of cellulolytic enzyme by double deletion of CreA and CreB involved in carbon catabolite repression in *Aspergillus oryzae*

○一瀬 桜子、田中 瑞己、新谷 尚弘、五味 勝也（東北大院農）
○Sakurako ICHINOSE, Mizuki TANAKA, Takahiro SHINTANI, Katsuya GOMI (Tohoku Univ.)

麹菌は多様な多糖類分解酵素群を生産するものの、その発現はグルコースによるカタボライト抑制を受ける。糸状菌におけるグルコース抑制は広域制御型転写因子 CreA によって制御されることが知られている。モデル糸状菌 *Aspergillus nidulans* では、CreA のユビキチン化・脱ユビキチン化によりグルコース抑制が制御されることが示唆されており、グルコース存在下では、脱ユビキチン化酵素 CreB によって CreA が脱ユビキチン化されると考えられている。我々はこれまでに、麹菌において *creA* と *creB* のそれぞれの単独破壊株及び *creA/creB* 二重破壊株を作製し、マルトースを炭素源とした液体培地では *creA/creB* 二重破壊株において顕著に高い α-アミラーゼ活性を示すことを明らかにした(1)。そこで本研究では、これらの破壊株におけるセルロース系バイオマス分解酵素であるセルラーゼ、キシラナーゼ及びβ-グルコシダーゼ活性を測定することで、*creA* と *creB* 遺伝子破壊による多様な酵素タンパク質の生産性への影響を解析した。

グルコースとキシロースをそれぞれ炭素源とする液体培地で培養した結果、野生株と *creB* 破壊株ではキシロース培養時に生育の悪化が観察されたが、*creA* 破壊株と *creA/creB* 二重破壊株では生育への影響は観察されず、乾燥菌体重量は野生株の約 3 倍になったことから、CreA は麹菌のキシロース資化にも抑制的に働くことが示唆された。さらに、各酵素の活性を測定した結果、セルラーゼは全ての破壊株で活性の増加が観察できなかったものの、キシラナーゼはキシロース培地において *creA* 遺伝子破壊株で活性が顕著に増加し、特に *creA/creB* 二重破壊株では野生株と比較して 100 倍もの活性を示すことがわかった。また、*creA/creB* 二重破壊株では高い β-グルコシダーゼ活性を示すとともに、*creA* 遺伝子を破壊することでグルコース培地でも β-グルコシダーゼが生産されることがわかった。以上の結果から、*creA* 及び *creB* 遺伝子を破壊することでアミラーゼのみならず、セルロース系バイオマス分解酵素の生産性も向上することが明らかになった。現在、プロテアーゼの生産性についても解析しており、その結果についても報告する。

（本研究は「農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業」の支援を受けて行われた。）

(1) Ichinose et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **98**, 335–343 (2014)

Aspergillus oryzae, carbon catabolite repression, hyperproduction

講演番号：3B41p11
講演日時、会場：3 月 28 日 16:10～ B 校舎 41 会場

ゲノムデザインに向けた人工オペロンの構築

Construction of artificial operons for genome designing

○柘植 謙爾[1]、富樫 貴[1]、長谷部 雅子[1]、冨田 勝[1,2]、板谷 光泰[1,2]（[1]慶應大先端生命研、[2]慶應大環境情報）
○Kenji TSUGE[1], Takashi Togashi[1], Masako Hasebe[1], Masaru Tomita[1,2], Mitsuhiro Itaya[1,2] ([1]Inst. Adv. Biosci., Keio Univ., [2]Environ. Info. Studies, Keio Univ.)

ゲノムをデザインすることで、エネルギーや有用物質の生産に特化したバクテリアを構築しようというアイデアは、バクテリアゲノム DNA の全塩基配列が明らかとなり、ゲノムの全容が明らかになるにつてより具体性を増してきた。実際に、米国ベンター研究所のグループによりゲノムレベルの長鎖 DNA の構築しそれを機能させることが可能であることが示された際には、ゲノムデザインが現実可能な時代の到来を思わせたが、しかし未だにデザインしたゲノムが構築されたという報告はない。ゲノムをデザインするということは、ゲノム上の全ての遺伝子について時間的・量的にその発現を制御するようにプログラムすることに他ならない。これが現時点で達成されていない理由は、多数の遺伝子の発現量を制御する術がないからと言えよう。我々は、ゲノムをデザインするための方法、すなわち多数の遺伝子を制御する方法として、バクテリアのゲノム中に良く見出されるポリシストロニックオペロン構造に注目している。オペロン構造は、少ないプロモーター数で多数の遺伝子を制御可能であるという点で、制御機構を単純化できることを期待している。我々は、それぞれの代謝経路の遺伝子群を人工オペロンにまとめ、これらを積み上げることが、ゲノムデザイン進展の突破口となるのではないかと考えている。そこで、この方法理論検証の一環として、大腸菌の解糖系に関わる一連の遺伝子群を人工オペロンに集積することとを行った。解糖系の各遺伝子断片を枯草菌のプラスミド形質転換系を利用した遺伝子集積法の OGAB によりポリシストロニックな人工オペロンの形を構築し、これをプラスミドの形で大腸菌に導入することで、本来大腸菌が持つ解糖系の遺伝子回路を相補できるかどうかを検証してきた。その結果、ポリシストロニックなオペロン内では、プロモーターに近い遺伝子ほど良く発現し遠ざかるにつれその発現量が減少するため、野生型の大腸菌の解糖系の各遺伝子の発現量を参考に発現量の多い順から唯一のプロモーターに近くなるように人工オペロンを構築すればよいことを見出した。我々は、この知見、即ちオペロン構築原理について本原理の一般性を示すべく、他の代謝経路の人工オペロン化を行った。選んだ代謝経路は、解糖系と同様に一次代謝系で、イソペンテニル２リン酸の合成に関わる大腸菌の非メバロン酸経路である。その結果、大腸菌の非メバロン酸経路を相補する、人工非メバロン酸経路の構築に成功した。現在、我々はこのように作製した代謝経路毎に構築したオペロンを組み合わせることにより、より長い代謝経路が作製可能であることを示すことを目標に、グルコースから色素性化合物のカロテノイドまでの一連の代謝経路の人工オペロン化に取り組んでいる。発表では、このオペロン化の進展状況を交えて、人工オペロンの構築によるゲノムデザインの可能性について議論したい。

Artificial operon, OGAB, Metabolic pathway

講演番号：3B41p12
講演日時、会場：3 月 28 日 16:21～ B 校舎 41 会場

合成生物学的アプローチに基づく２細胞の相互遺伝子発現制御システムの構築

Construction of mutual gene regulation system of two cells based on the synthetic biological approach

○木賀 大介[1,2]、西田 暁史[1]、鮎川 翔太郎[3] ([1]東工大総理工、[2]東工大地球生命、[3]東工大情報生命)
○Daisuke KIGA[1,2], Akifumi NISHIDA[1], Shotaro AYUKAWA[3] ([1]Tokyo Tech, [2]Tokyo Tech ELSI, [3]Tokyo Tech ACLS)

遺伝子の発現制御は、個々の遺伝子の制御として理解するだけでなく、遺伝子が相互作用するネットワークである「遺伝子回路」の動態として理解することが重要である。そして、遺伝子回路の動態を理解するために、生物から得られる実際のデータと数理モデルとを相補的に活用することが重要になっている。しかしながら、天然の遺伝子回路は多要素が複雑に相互作用するシステムであるため、適切な数理モデル化の手法は未だ確立していない。そのため、比較的少数の遺伝子によって構成されるモデル人工遺伝子回路を生きた細胞内に構築し、その動態を数理モデルによって記述する、合成生物学的アプローチが注目されている。

本研究では、合成生物学的アプローチを用いて、２種類の細胞が細胞間コミュニケーション分子を介して、お互いの遺伝子発現を制御し合うというシステムを設計、構築した。このシステムは、それぞれ異なる人工遺伝子回路を導入された２種類の大腸菌細胞 A と B から構成される。細胞 A と B はそれぞれ、相手の合成する細胞間コミュニケーション分子を感知して、自身の細胞間コミュニケーション分子合成遺伝子の発現を誘導する、という機能を持つ。つまり細胞 A は、細胞 B の合成するコミュニケーション分子 β を感知した際に、コミュニケーション分子 α を合成する。反対に細胞 B は、細胞 A の合成するコミュニケーション分子 α を感知した際に、コミュニケーション分子 β を合成する。このシステムでは、細胞 A と細胞 B を混合した場合にのみ、両方の細胞間コミュニケーション分子の量が増加し続ける、ポジティブフィードバックが発動する。

上記のような機能を持つ人工遺伝子回路を実装するにあたって、細胞間コミュニケーション分子の合成や感知に関わる遺伝子群は、*Pseudomonas aeruginosa* などの quorum sensing に関わる遺伝子群を用いた。この人工遺伝子回路を導入した細胞 A と B を共培養することで、２種類の細胞を混合した場合にのみポジティブフィードバックが発動し、両方の細胞間コミュニケーション分子が増加することを確認した。

synthetic biology, genetic circuit, cell-cell communication

講演番号：3B41p13
講演日時、会場：3 月 28 日 16:32～ B 校舎 41 会場

人工遺伝子回路を用いた微生物共生システムの構築

Construction of a synthetic microbial ecosystem by using synthetic genetic circuits

○鮎川 翔太郎[1]、西田 暁史[2]、木賀 大介[2,3] ([1]東工大情報生命、[2]東工大院総理工、[3]東工大地球生命研)
○Shotaro AYUKAWA[1], Akifumi NISHIDA[2], Daisuke KIGA[2,3] ([1]ACLS, Tokyo Tech, [2]Tokyo Tech, [3]ELSI, Tokyo Tech)

微生物の多くは互いにコミュニケーションを取り合うことで複雑な機能を持つ共生システムを形成することが知られている。こうしたシステムの性質を知るためには、システムの一部を改変したり、摂動を与えたりした時に、システムがどのような挙動を示すかを調べることが有効である。しかし、天然のシステムを改変することは、その系の複雑さから困難である。一方、実験者がタンパク質コード配列や制御配列を組み合わせて構築する人工遺伝子回路は、系の成り立ちを実験者が理解しているゆえに、系内の相互作用の強さが変化したシステムを構築することが容易である。

本研究では、人工遺伝子回路を用いて２種類の大腸菌が、お互いが存在するときのみ生存が可能となる共生システムを設計、構築した。このシステムでは、異なる人工遺伝子回路を導入された大腸菌同士が、細胞間コミュニケーション分子を介してお互いの状態を感知し合い、相手からのコミュニケーション分子が存在するときのみ生存が可能になる。このために、以下の３条件を満たした人工遺伝子回路を大腸菌に導入した。1.）２種類の大腸菌 A と B は異なる細胞間コミュニケーション分子を合成する。2.）細胞 A は細胞 B の合成するコミュニケーション分子 β を感知して、コミュニケーション分子 α の合成を行う。同様に、細胞 B は細胞 A の合成するコミュニケーション分子 α を感知して、コミュニケーション分子 β を合成する。3.）細胞 A 内では、コミュニケーション分子 β によって抗生物質耐性遺伝子の発現が誘導される。同様に細胞 B 内では、コミュニケーション分子 α によって抗生物質耐性遺伝子の発現が誘導される。この人工遺伝子回路の働きにより、細胞 A と B が、お互いが存在するときのみ生存が可能となる共生システムが形成される。本研究では、この人工遺伝子回路を実際に大腸菌に導入して作製した細胞 A と B が抗生物質存在下で共存することを確認した。また、初期菌密度や抗生物質濃度などを変えることによって、集団内の２種類の細胞の割合が変化することも確認された。さらに人工遺伝子回路の数理モデルを作成し、数値シミュレーションにより、設計した共生システムが実現するパラメータ範囲を調べ、２種類の細胞の共存の可能性なども調べている。本研究の成果は、異種細胞の分業による物質生産人工遺伝子回路の一般化につながると期待される。例えば、多数の外来遺伝子の導入は細胞の増殖に負の効果を与えるため、代謝経路を２つの細胞に分割する、という系への適用が期待される。とくに、別々の部分経路で合成された２種類の中間産物が反応する、という系に適していると考えられる。

synthetic biology, genetic circuit, cell-cell communication

講演番号：3B41p14
講演日時、会場：3 月 28 日 16:43～ B 校舎 41 会場

Streptomyces 属で機能する誘導型高発現ベクターのシャトル化

Construction of an inducible shuttle vector for *Streptomyces*

○松本 雅子、齋藤 結希、橋本 義輝、熊野 匠人、小林 達彦（筑波大院　生命環境）
○Masako MATSUMOTO, Yuki SAITOH, Yoshiteru HASHIMOTO, Takuto KUMANO, Michihiko KOBAYASHI (Grad. Sch. Life and Environ. Sci., Univ. of Tsukuba)

放線菌、特に *Streptomyces* 属は二次代謝産物として抗生物質を生産することで知られ、我々の生活に欠かせない重要な微生物である。本属は工業的にも非常に有用な生物資源であることから、放線菌における大量発現系の構築が期待されている。我々は、これまでに放線菌 *Rhodococcus rhodochrous* J1 株由来のニトリラーゼ発現機構 [1]を基に、*Streptomyces* 属放線菌で機能する誘導型発現ベクターpSH19 の開発に成功している [2]。しかし、本ベクターは *Streptomyces* 属のみでしか複製せず、プラスミドの構築に時間がかかる。そこで本研究では、pSH19 ベクターを改変し、大腸菌と *Streptomyces* 属放線菌の両方で複製するシャトルベクターの開発を目的とした。

大腸菌用のプラスミド複製起点 (*ori*) および薬剤耐性マーカー遺伝子を PCR で増幅した。誘導型発現ベクター pSH19 上のプラスミド複製領域および薬剤耐性マーカー遺伝子を切断により破損しない位置に存在する制限酵素で処理し、PCR 断片と連結し、大腸菌を宿主としてプラスミドを構築した。本プラスミドは、大腸菌内、*Streptomyces* 属放線菌内いずれでも、3 回の継代培養後も安定して保持されることを確認した。構築した本シャトルベクターにレポーター遺伝子を導入したプラスミドを *Streptomyces* 属放線菌に導入し、機能の検討を行った。その結果、誘導剤を添加した培地で生育した菌のみ、レポータータンパク質の発現を確認した。

1) PNAS, 93, 10572-10577 (1996)
2) PNAS, 101, 14031-14035 (2004)

Streptomyces, *E. coli*, shuttle-vector

講演番号：3B41p15
講演日時、会場：3 月 28 日 16:54～ B 校舎 41 会場

Streptomyces 属で機能する構成型高発現ベクターのシャトル化

Construction of constitutive shuttle vectors for *Streptomyces*

○齋藤 結希、松本 雅子、橋本 義輝、熊野 匠人、小林 達彦（筑波大院　生命環境）
○Yuki SAITOH, Masako MATSUMOTO, Yoshiteru HASHIMOTO, Takuto KUMANO, Michihiko KOBAYASHI (Grad. Sch. Life and Environ. Sci., Univ. of Tsukuba)

放線菌、中でも特に *Streptomyces* 属（以下、本属放線菌）は、抗生物質をはじめとした有用物質の生産菌として非常に重要な菌群である。本属放線菌を対象とした遺伝子組換え技術の開発および改良の重要性を鑑みて、我々は先行研究においてニトリル分解性放線菌 *Rhodococcus rhodochrous* J1 株の有する強力なタンパク質発現機構[1, 2]を基に、本属放線菌で機能する誘導型高発現ベクターpSH19[3]および構成型高発現ベクターpHSA81 を開発した。しかし、両ベクターとも本属放線菌でしか複製せず、かつ本属放線菌の生育は大腸菌と比べて遅いため、発現プラスミドの構築までに要する時間も長い。この問題を解消するべく、本研究では、先行研究で開発した pHSA81 を生育の早い大腸菌で保持・複製が可能な大腸菌-放線菌シャトルベクターに改良することを目的とした。

まず、大腸菌用のプラスミド複製領域と薬剤耐性遺伝子を含む DNA 断片を PCR により増幅した。次に、本属放線菌を宿主とする構成型発現ベクターpHSA81 を、発現ベクターとしての機能上必須な遺伝子や領域を破壊しない位置に認識部位がある制限酵素で処理し、PCR で増幅した DNA 断片をそれぞれに連結させ、大腸菌を宿主としてプラスミドを構築した。本プラスミドは、大腸菌および本属放線菌の両方において、３回の継代培養の中で安定して保持されていた。本手法により、３つの異なる薬剤マーカーを持った複数の大腸菌-放線菌シャトルベクターシリーズの構築に成功した。

【文献】

(1) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 10572 (1996)
(2) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* **93**, 4267 (1996)
(3) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 14031 (2004)

Streptomyces, *E. coli*, shuttle vector

講演番号：3B41p16
講演日時、会場：3 月 28 日 17:15～ B 校舎 41 会場

油糧性微生物 *Mortierella alpina* 1S-4 株における新規プロモーターの探索および評価
Selection and functional characterization of promoters in an oleaginous fungus *Mortierella alpina* 1S-4

○奥田 知生[1]、安藤 晃規[2]、櫻谷 英治[1,3]、鎌田 望[4]、落合 美佐[4]、小川 順[1,2] ([1]京大院・農・応用生命、[2]京大・生理化学、[3]徳島大院・ソシオ、[4]サントリーグローバルイノベーションセンター)
○Tomoyo OKUDA[1], Akinori Ando[2], Eiji Sakuradani[1,3], Nozomu Kamada[4], Misa Ochiai[4], Jun Ogawa[1,2] ([1]Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]Res. Unit Physiol. Chem., Kyoto Univ., [3]Inst. Technol. Sci., Univ. Tokushima, [4]Suntory Global Innovation Center Ltd.)

【背景】

Mortierella alpina 1S-4 株はアラキドン酸、エイコサペンタエン酸をはじめとする長鎖多価不飽和脂肪酸（PUFA）を著量蓄積する油脂生産糸状菌である。本研究室ではこれまでに 1S-4 株の分子育種法を開発し、遺伝子操作によって脂肪酸生合成経路を改変することにより、多彩な機能性 PUFA の生産を実現してきた。しかし、より精密な分子育種に向け、使用可能なプロモーターを多様化する必要がある。そこで本研究では、本株の分子育種に有用な新規プロモーターの取得を目的とし、本株におけるプロモーター評価系の確立および確立した評価系を用いたプロモーター解析を行なった。

【方法と結果】

Escherichia coli 由来 GUS(β-glucuronidase)遺伝子をレポーターとするプロモーターアッセイ系を確立すべく、GUS 遺伝子上流のプロモーター領域を容易に置換できるようデザインしたアッセイ用ベクターを構築した。このベクターを *M. alpina* 1S-4 ウラシル要求性株にアグロバクテリウム法にて導入した。得られた形質転換体において、GUS 発現カセットが染色体上に 1 コピーで挿入されていること、GUS 活性値を 4-nitrophenyl-β-D-glucuronide を基質とする酵素アッセイによって定量的かつ再現性良く測定できることを確認した。続いて、本株のゲノム情報及び EST 解析結果をもとに約 30 種類の有用プロモーター候補を選抜し、上述の評価系を用いて活性を評価した。その結果、従来のプロモーターの約 5 倍の活性を示す高発現プロモーター、時期特異的発現プロモーター等、分子育種に有用と考えられる特徴を示す新規プロモーターを多数見いだした。

Mortierella alpina, promoter, molecular breeding

講演番号：3B41p17
講演日時、会場：3 月 28 日 17:26～ B 校舎 41 会場

プラスミド pCAR1 上の転写開始点とプロモーター領域の網羅的解析
Global analyses of transcriptional start sites and promoter regions on plasmid pCAR1

○舘 はる香[1]、水口（鈴木） 千穂[1]、高橋 裕里香[2]、大坪 嘉行[3]、津田 雅孝[3]、岡田 憲典[1]、野尻 秀昭[1] ([1]東大・生物工学セ、[2]富山県大生工科・生工研セ、[3]東北大院生命科学)
○Haruka TACHI[1], Chiho SUZUKI-MINAKUCHI[1], Yurika TAKAHASHI[2], Yoshiyuki OHTSUBO[3], Masataka TSUDA[3], Kazunori OKADA[1], Hideaki NOJIRI[1] ([1]The Univ. of Tokyo, [2]Toyama Prefectural Univ., [3]Tohoku Univ.)

【背景】プラスミドは可動性遺伝因子の一つであり、宿主間を接合伝達によって水平伝播することが可能な遺伝因子として知られている。当研究室ではプラスミドと宿主の相互作用の解明を目指しており、過去に 3 種の *Pseudomonas* 属細菌 (*P. putida* KT2440 株、*P. aeruginosa* PAO1 株、*P. fluorescens* Pf0-1 株) を宿主としたカルバゾール分解プラスミド pCAR1 のトランスクリプトーム比較が行われた。この結果から、全 74 個の転写単位中 17 個の転写単位が宿主ごとに異なる転写プロファイルを示すことが示唆されている (1)。この原因として、プラスミド上の遺伝子が宿主染色体由来の因子による制御も受けることが考えられる。このようなプラスミドと宿主間の相互作用を理解することは、宿主に与えるアドバンテージとそれに依存するプラスミドの伝播を理解する上で重要である。そこで本研究では、このメカニズム解明の足がかりとして、上述の 17 個の転写単位の転写プロファイルの確認、および pCAR1 上の転写開始点とプロモーター領域の網羅的同定を行った。【方法】上記のトランスクリプトーム解析 (対数増殖期から定常期の 4 経時点でサンプリング) よりも細かく経時点を振り、17 個の転写単位に対して定量 RT-PCR による転写プロファイルの取得を行った。また、プロモーター領域の詳細な情報を得る為、KT2440(pCAR1)株の対数増殖期と、定常期の細胞を用いて次世代シーケンサーを用いた dRNAseq 法 (5'末端に 3 リン酸をもった RNA を濃縮したサンプルと濃縮していないサンプルの比較から転写開始点を決定する手法) により、pCAR1 上遺伝子の転写開始点の網羅的同定を行った。なお、今回は両方の生育時期あわせて一定数以上のリードが得られた領域を転写開始点と判断した。

【結果】定量 RT-PCR の結果から、上記 17 個中 4 個の転写単位において特に宿主間の違いが大きいことを明らかとした。その一例として、ORF37a (ファージのリプレッサーに相同な配列が見出されている) では、KT2440 (pCAR1)株特異的な転写 (図) が確認されており、この結果は先行研究とも一致していた。また、dRNA-seq 法から、196 個の転写開始点候補を同定し、このうち 187 個の上流配列には σ^{70} 依存的プロモーターと予測される配列が、4 個には σ^{54} 依存的プロモーターと見られる配列が見出された。なお、上述の ORF37a の転写開始点の決定にも成功し、その上流配列から σ^{70} 依存的プロモーターの制御下にあることが示唆された。

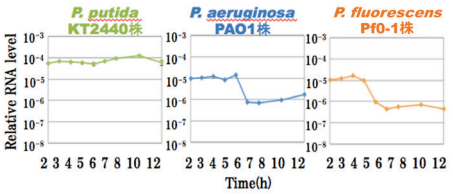


図. ORF37a の転写プロファイル
定量 RT-PCR により測定した。

1) Takahashi *et al.*, 2014, Environ. Microbiol., doi: 10.1111/1462-2920.12515

RNA-seq, plasmid, *Pseudomonas*

講演番号：3B41p18
講演日時、会場：3 月 28 日 17:37～ B 校舎 41 会場

標的遺伝子の 5’ 末端周辺配列が大腸菌発現系に及ぼす影響

Influence of 5'-terminal region sequence of target gene on *Escherichia coli* expression system

○安保 紘高[1]、原 啓文[2]、石田 尚之[1]、今村 維克[1]、今中 洋行[1] ([1]岡山大院・自然、[2]マレーシア日本国際工科院)
○Hirotaka Abo[1], Hirofumi Hara[2], Naoyuki Ishida[1], Koreyoshi Imamura[1], Hiroyuki Imanaka[1] ([1]Grad. Sch. of Nat. Sci. & Tech., Okayama Univ., [2]Malaysia-Japan Int. Inst. of Tech.)

【目的】

大腸菌は増殖速度が速く，多様な遺伝子ツールの利用が可能で，取扱いも簡便なことから，組換えタンパク質の発現用宿主として最も汎用されている．しかし組換えタンパク質を発現させる際，遺伝子のコドン使用頻度，翻訳効率やポリペプチド鎖の折り畳み特性が異なるため，発現量の低下や凝集体形成などの問題がしばしば生じる. 我々のグループでは, これまで, 放線菌 *Streptomyces mobaraensis* 由来の新規 ε -リジンアシラーゼ(Sm-ELA)を見出し，その組換え体発現系の構築に関する研究を行ってきた．その結果，野生型 *Sm-ela* は大腸菌を宿主とした活性体発現が困難であることがわかった．しかし，培地の改良及びコドン改変（同義コドンへの置換）により，発現量および活性体収量の顕著な向上が可能であることがわかった．そこで本研究では，汎用性の高い組換えタンパク質発現システムを確立すべく，ポリペプチド鎖合成の初発段階に着目し，プロモーターから遺伝子の 5’末端近傍にわたる領域における塩基配列が組換えタンパク質発現に及ぼす影響について調べた.

【方法・結果】

各種目的遺伝子を発現ベクターに挿入後，*E. coli* BL21(DE3)を宿主とし，IPTG 添加による各種タンパク質の発現誘導を行った．まず，発現タンパク質のモデルとして Sm-ELA を用いた．*Sm-ela* の 5’末端近傍のレアコドン 1 つを最も使用頻度の高い同義コドンに置換したサイレント変異体(計 3 種類)およびペプチドタグ配列を *Sm-ela* の 5’末端に連結した変異体をそれぞれ調製した．これらにコドン最適化 *Sm-ela* を加え, SDS-PAGE 及び酸性ニンヒドリン法による発現量および活性の比較評価を行った. その結果, コドン最適化 *Sm-ela* で発現量および培地あたりの活性が最も高かったが，レアコドン置換変異体も野生型と比べ, 発現量は若干増加し, mRNA 二次構造形成自由エネルギー依存的な活性の向上が見られた. また, タグ連結 *Sm-ela* の発現量は野生型に比べて多く，活性もコドン最適化 *Sm-ela* とほぼ同程度であった. そこで, これらの結果を基に, 一本鎖抗体(scFv)や超好熱菌由来 Esterase (EstAf)の組換え体についても発現タンパク質のアミノ酸配列を変えない形で発現検討を行った．scFv については 5’UTR の改変，EstAf については mRNA 二次構造予測に基づくサイレント変異(2 塩基置換)を施した．その結果，いずれについても発現量の顕著な向上が可能であることが確認できた．これらの検討を通じ, UTR を含めた 5’末端領域配列の mRNA 二次構造の検討が，組換えタンパク質の発現量を増加させる上で重要なことが強く示唆された.

Escherichia coli, recombinant protein, expression

講演番号：3B41p19
講演日時、会場：3 月 28 日 17:48～ B 校舎 41 会場

標準ＲＮＡを用いた mRNA 調製手順評価法に関する研究

Evaluation of mRNA preparation procedures using a standard RNA

○平松 大典[1]、岩橋 均[1]、高橋 淳子[2] ([1]岐阜大学、[2]独立行政法人産業技術総合研究所)
○hironori hiramatsu[1], hitoshi iwahashi[1], yunnko takahashi[2] ([1]Gifu Univ., [2]National Institute of Advanced Industrial Science and Technology)

【目的】遺伝子発現解析等の RNA 解析実験において、RNA は分解されやすく、実験の再現性に影響を及ぼす。このため、精度管理の為に RNA 試料がどの程度分解を受けているのかを把握する必要がある。現状として、RNA の分解性評価は 28S rRNA と 18S rRNA のリボソーム RNA の量比が指標として用いられている。また、Bioanalyzer 2100(agilent)を用いることで、rRNA の分解性を数値化する RNA integrity number (RIN)の数値を見ることにより RNA 分解性の評価をする指標の 1 つとされている。しかし、何れも RNA の大部分を占める rRNA を評価するため、測定対象である mRNA の状態を反映しているとは限らない。また、Bioanalyzer を用いた評価にはそれなりの費用もかかってしまう。そのため、客観的に mRNA を評価する「ものさし」としての核酸標準物質が有効であると考えられる。その、「ものさし」となりうる mRNA である外部標準 RNA はすでに開発されている。外部標準 RNA は直接サンプルに添加することで客観的な評価方法を提供できる可能性がある。本研究の目的は、様々な要因による mRNA の分解を想定し、現状での RNA 分解性の評価方法と核酸標準物質である標準 RNA の分解性の評価を比較することで、標準 RNA の利用法を考察する。
【方法・結果】本研究では *Saccharomyces cerevisiae* S288c 株を用いた。RNA 抽出の前に外部標準である標準 RNA（RNA500-B、産業技術総合研究所）を添加し、RNA の分解を想定した条件検討を行い、total RNA を抽出した。分解性の評価は、変成アガロースゲル電気泳動又は Bioanalyzer 2100(agilent)を用いた。また、遺伝子発現量は、RT-PCR 後のアガロースゲル電気泳動、又は定量 PCR を用いて評価した。RNA の分解を想定した条件として、例えば、異なる温度で保存した酵母細胞から RNA を抽出した。すなわち、集菌した酵母に標準 RNA を添加した後、室温、－20 ℃、そして－80 ℃で三日間保存し RNA 抽出を行った。抽出した RNA は、rRNA 量を観察することで分解性を評価した。－80 ℃及び－20 ℃保存では、顕著な分解は認められなかったが、室温では、顕著な分解が、上記電気泳動において認められた。標準 RNA においてもこれと同じ挙動を示した。さらに、内在指標遺伝子としてよく利用される *ACT1* の発現量を観察したところ、3 条件で見かけ上変化がない結果を示していた。以上の結果から、RNA の分解性評価は rRNA で評価するのと同様に標準 RNA を用いても評価できると考えた。また、標準 RNA は内在遺伝子より感度の良い可能性がある。他にも、種々の条件で RNA 抽出試験を実施し、標準 RNA の有効性を検討した。

Standard RNA, Evaluation of mRNA preparation procedures, Gene expression analysis

講演番号：3B41p20
講演日時、会場：3 月 28 日 17:59～ B 校舎 41 会場

新規酵素の探索を目指した、土壌 DNA 抽出法の検討
Development of a simple extraction method for isolating soil DNA
○小林 慶紀、藤井 克彦、横山 和平（山口大農）
○Yoshiki KOBAYASHI, Katuhiko HUJII, Kazuhira YOKOYAMA (Yamaguchi Univ.)

【目的】
土壌 DNA の抽出では界面活性剤、アルカリ、ガラスビース等を用いて試料中の微生物細胞を破砕するという方法が一般的であり、抽出キットも多数市販されている。
しかし未知微生物の酵素遺伝子を探索する場合、酵素遺伝子が必ずしもマルチコピーではないこと、そして DGGE で解析対象となる 16S rRNA 遺伝子の部分配列よりも酵素遺伝子の配列の方が長いことから、より穏やかな条件で DNA を抽出する工夫が求められる。そこで本研究では、①なるべく長鎖の DNA 断片が回収でき、なおかつ、②土壌から細菌のみならず糸状菌 DNA も抽出できる、の両条件を満たすような土壌 DNA 抽出法を模索した。
【実験方法】
ブナ林から落葉・落枝を除去した A 層土壌（深さ 0-10 cm 程度）を採集し、1 mm ふるいに通して砂利や石を除いた。このようにして調製した土壌に滅菌水を加え、ブレンダーで撹拌（20,400 rpm）した。土壌懸濁液をガーゼで濾過し、9,000×g で遠心分離することで微生物と土壌の両者を含む沈殿を得た。次に沈殿を Ficoll で懸濁し、密度勾配遠心分離により微生物と土壌を分画した。微生物画分からアルカリ SDS 法および CTAB 法で DNA の抽出を行った。得られたゲノムを鋳型として 16S および 18S rRNA 遺伝子部分配列を増幅し、D-Code DGGE システムを用いて微生物組成を解析した。
【結果】
細胞を破壊しない方法としてブレンダーで土壌から微生物を回収できるかを撹拌時間 10～120 秒の範囲で検討したところ、30 秒までは回収される生菌の数が増加傾向にあった。また、微生物と土壌を分離できる Ficoll 濃度を検討したところ、Ficoll の終濃度を 40% (w/V)とし、4,900×g で遠心分離する条件が最適であることがわかった。
次に、微生物画分から上述の方法で DNA 抽出を試みたところ、どちらの抽出法でも約 20 kbp の DNA を回収することができた。アガロースゲル電気泳動で観察する限りでは、腐植質の混入は少ないと考えられた。他方 rRNA 遺伝子の DGGE 解析から、CTAB 法で抽出した場合の方が、土壌 DNA に含まれる微生物の多様性は保存されていると示唆された。
さらに、同じ土壌に Avicel、chitin、またはオガクズを混ぜて 2 ヶ月間静置培養したところ、DGGE パターンの変化が観察され、土壌中で分解微生物の集積が進んでいることが示唆された。

Soil DNA, Soil microbes, Density- gradient centrifugation

講演番号：3B33a01
講演日時、会場：3 月 28 日 09:00～ B 校舎 33 会場

実バイオマスを微生物変換するための新しい酵母プラットフォームの探索

Exploration of new yeast platform capable for high yield bioconversion of lignocellulosic biomass

○Kahar Prihardi、李 載みん、荻野 千秋、近藤 昭彦 (神大工)
○Prihardi Kahar, Jaemin Lee, Chiaki Ogino, Akihiko Kondo (Kobe Univ.)

【概要】 実バイオマス（リグノセルロース系）から様々な化成品に効率よく微生物変換するために、バイオマスの前処理および糖化過程に生じる発酵阻害物質（主としてフルフラールとそのアルデヒド化合物、酢酸、ギ酸レブリン酸）と酵素糖化温度に耐えられる発酵ストレスに強い微生物、特に酵母の獲得が重要な解決課題である。今まで微生物にバイオマス利用への適合性を付与する試みが多数行っており、微生物の分子育種による特異的機能改変は、バイオマスの多様性や複雑な成分構成に対応する普遍的機能の導入を達成しておらず、新たなアプローチが求められている。そこで本研究では多数の国内の酵母株に対して網羅的スクリーニングを行い、高濃度の発酵阻害物質耐性好熱酵母（クラッブツリ陰性酵母を含み）を獲得し、実バイオマスを微生物変換するための新しい酵母のプラットフォームの構築を目指す。
【方法】 本研究に用いられた酵母株は国内 NBRC にすべて登録されている BSL1 の酵母であり、その数は約 3000 株である。これらの酵母株は高圧熱糖化処理によるサトウキビバガス糖液（BSL）および酵母スクリーニング培地(YS、フルフラール含量約 60 mM、5-HMF 含量約 10mM、酢酸含量約 60 mM、ギ酸含量約 30 mM、レブリン酸含量約 2 mM)を用いて 30℃と 35℃の検討に分けて増殖と発酵試験を行い、どちらの温度でも増殖し発酵する酵母だけを選抜した。多検体一斉分析を可能にするために、ディップウェル形式で発酵を行い、UPLC による高速発酵分析を行った。また、FACS を用いて細胞内の全体代謝活性評価と ROS ストレス応答の解析も行ってみた。
【結果と考察】 検討の結果、エタノール発酵酵母を複数株選抜した。更に、その中の 1 株は BSL および YS 培地で高速でかつ高濃度でエタノールを生成することができる酵母であり、初発菌体量を 0.2（OD_{600}）にして発酵 24 時間で糖変換率約 0.8 g-EtOH/g-グルコース以上を容易に得ることができた。本酵母はキシロース発酵機能をもっておらず、キシロース発酵代謝遺伝子を導入することによりグルコースだけでなくキシロースから発酵することも可能である。本酵母は BSL 糖液および YS 培地に含まれる発酵阻害物質、さらに高温度により生じる発酵ストレスに強い酵母であることが FACS 解析により確認できた。また、非エタノール発酵酵母（クラッブツリ陰性）も多数存在し、その中に発酵基質を高速に消費し酢酸とエタノールを生合成せず菌体増殖のみに使う酵母（例えば F65 株）も発見した。こちらの酵母株は、初発菌体量を 0.2（OD_{600}）にして発酵 24 時間で最終菌体濃度は初発の約 100 倍までである。

fermentation inhibitor, yeast, screening

講演番号：3B33a02
講演日時、会場：3 月 28 日 09:11～ B 校舎 33 会場

膜濃縮したソルガム搾汁液からのエタノール発酵

Increased ethanol production from sweet sorghum juice concentrated by a membrane separation process

○佐々木 建吾[1]、柘植 陽太[1]、佐々木 大介[1]、寺村 浩[2]、川口 秀夫[2]、荻野 千秋[2]、春日 重光[3]、佐塚 隆志[4]、近藤 昭彦[2] ([1]神戸大・自然科学、[2]神戸大院・工・応化、[3]信州大・農学部附属アルプス圏フィールド科学教育センター、[4]名古屋大・生物機能開発利用研究センター)
○ Kengo SASAKI[1], Yota TSUGE[1], Daisuke SASAKI[1], Hiroshi TERAMURA[2], Hideo KAWAGUCHI[2], Chiaki OGINO[2], Shigemitsu KASUGA[3], Takashi SAZUKA[4], Akihiko KONDO[2] ([1]Org. Adv. Sci. Technol., Kobe Univ., [2]Dept. Chem. Sci. Eng., Kobe Univ., [3]AFC, Shinshu Univ., [4]Biosci. Biotechnol. Center. Nagoya Univ.)

【背景と目的】ソルガムは収穫量が高く搾汁液には高濃度の糖が含まれているため、搾汁液からのバイオエタノール生産が注目されている。バイオエタノール生産プロセスにおける蒸留・脱水のエネルギー消費を抑えるために発酵後のエタノール濃度を上げる事が望まれる。一方、圧力駆動型の膜プロセスは低コストであり、稲わらの水熱処理液中の糖を選択的に濃縮できる事を既に報告している [1)]。そこで本報告ではソルガム搾汁液を膜濃縮する事で糖濃度を増加させて、*Saccharomyces cerevisiae*(BY4741 株)からのエタノール生成濃度を高める事を目的とした。
【結果と考察】ソルガム搾汁液は限外ろ過膜（分画分子量：150000g/mol）でろ過して残渣を取り除いたものを使用した。ソルガム搾汁液中には 61.0, 38.0, 28.4g/L のスクロース、グルコース、フルクトースが含まれていた。10g/L の酵母エキスおよび 20g/L のポリペプトンを添加して *S. cerevisiae* よりエタノール発酵した結果、6 時間後に 46.1g/L のエタノールを生産した。搾汁液中の糖濃度を高めるためにナノフィルトレーション膜（分画分子量：150g/mol）により 2.8 倍に濃縮した。膜濃縮したソルガム搾汁液を上記の条件でエタノール発酵した結果、48 時間後に糖を消費して 133.5g/L のエタノールを生産する事に成功した。さらに、酵母エキスやポリペプトンを非添加の条件において膜濃縮したソルガム搾汁液よりエタノール発酵を行った結果、48 時間後に糖を消費して 132.8g/L のエタノールを生産した。以上より、窒素源非添加の条件においても好適なエタノール生産が維持される事が示唆された。本研究は、文部科学省先端融合領域イノベーション創出拠点形成プログラム・バイオプロダクション次世代農工連携拠点の形成の支援を受けて実施した。
1)2014 年度日本生物工学会

sweet sorghum, membrane, ethanol

講演番号：3B33a03
講演日時、会場：3 月 28 日 09:22～ B 校舎 33 会場

組換えコリネ型細菌による 3-hydroxy-4-aminobenzoic acid 発酵におけるソルガム搾汁液の促進作用
Enhanced effects of sweet sorghum juice on 3-hydroxy-4-aminobenzoic acid fermentation by recombinant *Corynebacterium glutamicum*

○川口 秀夫[1]、佐々木 建吾[2]、寺村 浩[1]、柘植 陽太[2]、中村 聡子[1]、菅井 佳宜[3]、勝山 陽平[3]、大西 康夫[3]、平野 恒[4]、佐塚 隆志[4]、北野 英己[4]、春日 重光[5]、荻野 千秋[1]、近藤 昭彦[1] ([1]神戸大院・工・応化、[2]神戸大・自然科学、[3]東大院・農生命科学、[4]名古屋大・生物機能開発利用研究セ、[5]信州大・農付属アルプス圏フィールド科学教育研究セ)
○ Hideo KAWAGUCHI[1], Kengo SASAKI[2], Hiroshi TERAMURA[1], Yota TSUGE[2], Satoko NIIMI-NAKAMURA[1], Yoshinori SUGAI[3], Yohei KATSUYAMA[3], Yasuo OHNISHI[3], Ko HIRANO[4], Takashi SAZUKA[4], Hidemi KITANO[4], Shigemitsu KASUGA[5], Chiaki OGINO[1], Akihiko KONDO[1] ([1]Dept. Chem. Sci. Eng., Kobe Univ., [2]Org. Adv. Sci. Technol., Kobe Univ., [3]Grad. Sch. Agric. Life Sci., Univ. Tokyo, [4]Biosci. Biotechnol. Center, Nagoya Univ., [5]Fac. Agri., Shinshu Univ.)

【背景と目的】3-Hydroxy-4-aminobenzoic acid (3,4-AHBA)は、高強度・耐熱性のエンジニアリングプラスチック原料であり、微生物発酵によって生産することができる。イネ科の C4 植物であるソルガムは、主茎部にショ糖を含む高濃度の糖を蓄積し、エネルギー作物として注目される。ソルガムの搾汁液を原料とするバイオエタノール生産についてはこれまで多くの研究が報告されているが、バイオ化成品生産に関する研究例は少ない。そこで本研究では、組換えコリネ型細菌を用いてソルガム搾汁液から 3,4-AHBA を発酵生産すると共に、搾汁液による 3,4-AHBA 代謝の促進作用について調べた。

【結果と考察】コリネ型細菌を宿主に、放線菌由来の 3,4-AHBA 合成酵素をコードする 2 遺伝子(*griHI*)を発現させた組換え株を作製した。作製した組換え株は、ソルガム搾汁液の主要な糖であるショ糖を単一炭素源とする最少培地で 3,4-AHBA の生産が可能であり、またソルガム搾汁液を炭素源とする最少培地を用いた発酵において顕著な生産促進が認められた。搾汁液に含まれる 3,4-AHBA 代謝促進作用物質を明らかにするため、ナノフィルトレーション膜（分画分子量：150）を用いて成分分離を試みた。すなわち、搾汁液を限外ろ過したろ液を、ナノフィルトレーション膜を用いて、濃縮画分と透過画分に分離した。得られた濃縮画分と透過画分のショ糖濃度を等しく調製して 3,4-AHBA の発酵を調べた結果、濃縮画分では発酵促進作用が認められたのに対し、透過画分では顕著な発酵阻害作用が認められた。以上の結果より、ソルガム搾汁液に含まれる分子量 150 以上の化合物（群）が、3,4-AHBA 代謝促進作用を有する可能性が示唆された。

本研究は、文部科学省「植物 CO2 資源化研究拠点ネットワーク（NC-CARP）」の支援を受けて実施した。

sweet sorghum, biomass, *Corynebacterium glutamicum*

講演番号：3B33a04
講演日時、会場：3 月 28 日 09:33～ B 校舎 33 会場

ハロモナス菌を用いた木材糖化液からの 3-ヒドロキシ酪酸の生産の最適化
Optimal (R)-3-hydroxybutyric acid secretion from *Halomonas* sp. KM-1 cells cultured with saccharified Japanese cedar under fed-batch cultivation
○河田 悦和[1]、野尻 昌信[2]、松下 功[3]、坪田 潤[3] ([1]産総研、[2]森林総研、[3]大阪ガス)
○ Yoshikazu Kawata[1], Masanobu Nojiri[2], Isao Matsushita[3], Jun Tsubota[3] ([1]AIST, [2]FFPRI, [3]OSAKA GAS)

【目的】国内外で、非可食の木材・草本等を原料として、バイオエタノールの生産、研究が進んでいる一方で、C5糖の利活用が課題となっている。我々のハロモナスKM-1株は、このC5糖キシロース、アラビノースをC6糖グルコースと同速度で利用し、菌体内にバイオプラスチックPHBを蓄積し、微好機条件にすると培地に3-ヒドロキシ酪酸を分泌する。本研究ではスギを糖化したサンプルを用いて、3-ヒドロキシ酪酸の高生産を目的に実験を実施した。

【方法】国内の杉をパルプ化し、糖化した木材糖化液を用いて、*Halomonas* sp.KM-1を好気条件で培養し、バイオプラスチックPHBを蓄積した。その後、供気条件を、微好気条件に変更し、培養を継続した。菌体内のPHB量、培地中の3-ヒドロキシ酪酸の量をそれぞれGC、HPLCで分析した。従来は、窒素源として、硝酸ナトリウムを用いていたが、加えて尿素、塩化アンモニウムを検討し、それぞれの生育特性、PHB、3-ヒドロキシ酪酸の生産量を確認した。

【結果】木材糖化液を用いて、それぞれの窒素源を用いて好気条件で 36 時間培養し、PHB の蓄積を分析したところ、硝酸ナトリウムを用いた場合は、乾燥菌体重量、PHB 重量それぞれ、36g/L、18g/L であったものが、尿素を用いた場合は、44g/L、24g/L に改善した。塩化アンモニウムを用いた場合は生育が見られなかった。さらに、これを微好気条件に移行した場合は、8g/L 程度の 3-ヒドロキシ酪酸の分泌しか得られず、16g/L 程度の PHB が分解されず、菌体内に残存した。そこで、微好気条件に移動させる前に、窒素添加を行ったところ、3-ヒドロキシ酪酸の分泌の分泌量は 21g/L と顕著に上昇し、蓄積したほとんどの PHB を分解させることに成功した。我々は、20%のグルコースを用いて 40.3g/L の 3-ヒドロキシ酪酸の分泌があったことを報告しているが、木材糖化液の糖濃度は 11%程度であるので、糖濃度からの生産効率・対糖収率としては、最適化されたものと判断され、糖化液に含まれるキシロースが、グルコースの代謝抑制無しに利用される背景から、将来の間伐材のリファイナリー生産への有効利用に端緒を開いたものと思われる。

Halomonas, 3-hydroxybutyric acid, Japanese cedar

講演番号：3B33a05
講演日時、会場：3 月 28 日 09:44～ B 校舎 33 会場

前処理なしの草本系バイオマス（稲ワラ）より微生物複合酵素系による直接糖化並びに直接アルコール発酵生産

Direct Saccharification of Rice Straw without pretreatment by Bioconsortia Energies and Direct Alcohol Fermentation

○伊藤 雅貴、勝田 泰明、八木 友己、倉根 隆一郎（中部大学）
○Masaki ITO, Yasuaki KATUDA, Tomomi YAGI, Ryuichiro KURANE (Chubu University)

（背景）現在、世界的なエネルギー問題と環境汚染が石油燃料に代わる環境に優しいバイオ燃料の普及を加速させている。第 1 世代と呼ばれる糖化が容易なサトウキビやトウモロコシの可食部を利用したバイオエタノール生産が、アメリカやブラジル等で既に生産されている。しかし、食物の価格上昇や食糧問題等の問題から第 2 世代バイオエタノール生産に向けてリグノセルロース系バイオマスの研究開発が注目を集め多くの研究例が報告されてきている。

草本系・木質系バイオマス中に存在するリグノセルロースを加水分解することがファーストステップであり、含有されるセルロース及びヘミセルロースからグルコース、キシロース等の糖が得られ、発酵に利用可能となるが、これにはリグノセルロースの前処理、加水分解、発酵を含んだ多段階の工程が必要となる。リグノセルロースの効率的な加水分解には、基質の前処理が非常に重要なステップであるが、現行の前処理は酸・アルカリによる前方法が主流となっている。しかしながら、酸・アルカリ前処理法では廃水（黒液）処理で総合すると使用エネルギーが膨大に上り、かつアルコール発酵阻害物質の副生等の実用化を阻む問題点が数多く指摘されている。

（研究目的）現行の酸・アルカリ等脱リグニン工程を前処理として施した際に実用化への大きな壁の一つとなる可溶性リグニン廃水の処理、糖化酵素必要量膨大、使用エネルギー膨大、高コスト等が存在する。我々はこのリグニンを微生物処理できないかと考え、リグニン分解に関与すると考えられる酵素の活性を指標にリグニン分解微生物の探索を行い、KS1025A2-4 株生産酵素はラッカー様活性を持っていることを既に報告している。今回、KS1025A2-4 株によるリグニン分解とセルロース・ヘミセルロース様分解菌を組み合わせ複合酵素系を行い、草本系バイオマス稲ワラから直接糖化を行い、その糖化液から直接アルコール発酵が可能であるかを研究目的とした。

（方法及び結果）粉砕処理した稲ワラに KS1025A2-4 株及びセルロース・ヘミセルロース様分解菌の酵素液を加え 4 日間の培養を行い直接糖化を行った。次にアルコール発酵菌を加えて２－４日間のアルコール発酵を行いアルコール発酵後に蒸留を行い糖を取り除きアルコール濃度を測定した。

以上のことより、草本系バイオマスとしての前処理なしの稲ワラより２種の微生物酵素系（リグニン分解及びセルロース・ヘミセルロース分解）による直接糖化に成功し、その直接糖化液より直接アルコール発酵が可能であることを示した。

Direct saccharification, Direct alcohol fermentation, Biotechnology ethanol

講演番号：3B33a06
講演日時、会場：3 月 28 日 10:05～ B 校舎 33 会場

Stenotrophomonas maltophillia を用いた発酵法によるキチン糖化

Saccharification of chitin by the fermentation method using *Stenotrophomonas maltophillia*

○高橋 愛実[1]、坂田 有里[2]、佐々木 銀河[2]、平野 貴子[2]、袴田 航[1,2]、西尾 俊幸[1,2] ([1]日大院生資科、[2]日大生資科)
○NARUMI TAKAHASHI[1], YURI SAKATA[2], GINGA SASAKI[2], TAKAKO HIRANO[2], WATARU HAKAMATA[1,2], TOSHIYUKI NISHIO[1,2] ([1]Graduate School of Bioresource Sciences, Nihon Univ., [2]Dept. Chem. and Life Sci., Bioresource Sciences. Nihon Univ.)

【目的】

キチンは、*N*-アセチルグルコサミン(GlcNAc)が β-1,4 グリコシド結合で連なった多糖であり、甲殻類の殻などを構成している。これらは、セルロースに次いで多く存在するバイオマス多糖である。キチンを加水分解することで得られる単糖 GlcNAc やキチンオリゴ糖は、さまざまな生理機能を有することが知られている。現在、キチンの分解には主に化学分解法が用いられている。この方法は、安価かつ大量にキチンを分解することができるが、副産物が生成されることや環境への負荷が大きいことが問題である。一方、酵素分解法は、副産物が精製されず環境への負荷が少ないため、化学法の欠点をカバーしている。しかし、酵素の抽出にコストがかかることや、キチンの分解に時間がかかるため、酵素が失活してしまうという新たな問題を生じる。そのため、酵素の抽出や部分精製が不要であり、酵素を連続的に生産しながらキチン糖化を行うことができる発酵法によるキチン糖化が有効であると考えられる。そこで我々は、発酵法を用いてキチン糖化を行うこととした。本研究では、*Stenotrophomonas maltophillia* を用いた準固相発酵法によるキチンの糖化を検討した。

【方法・結果】

糖化発酵槽に基材としてセライトとスルメイカ中骨由来 β-キチンを混合したキチン糖化床を入れ、*Stenotrophomonas maltophillia* の培養液を糖化床へ添加した。発酵層上部に経時的に液体培地を添加し、溶出液をサンプリングし、溶出液中の糖を TLC にて確認を行った。その結果、主に GlcNAc および$(GlcNAc)_2$ が確認された。この糖溶液からカラムクロマトグラフィーにより各糖を精製し収率を算出したところ、良好な結果を得た。また、準固相発酵法によるキチン糖化により主に GlcNAc と$(GlcNAc)_2$ が生成されたことから、発酵槽内でのキチンの分解には複数の酵素が関与していると考えられた。そこで、本菌株培養液中からキチナーゼを精製し、キチナーゼを β-キチンと反応させたところ$(GlcNAc)_2$ が生成された。さらに、本菌株を培養後、上清と菌体にわけそれぞれ$(GlcNAc)_2$ に作用させたところ、上清との反応では分解物が確認されず、菌体との反応では GlcNAc の生成を確認した。このことから準固相発酵槽内では、本菌が精製する分泌性のキチナーゼがキチンを分解し$(GlcNAc)_2$ を生成し、生成された$(GlcNAc)_2$ が菌体内の β−*N*−アセチルヘキソサミニダーゼにより分解され GlcNAc が生成すると考えられた。

β-chitin, saccharification, semi-soild state fermentation

講演番号：3B33a07
講演日時、会場：3 月 28 日 10:16～ B 校舎 33 会場

Kluyveromyces marxianus DMB1 株の高温での同時糖化発酵特性

Properties of *Kluyveromyces marxianus* DMB1 for simultaneous saccharification and fermentation at high temperatures

○矢野 伸一、滝村 修、星野 保 (産総研バイオマスリファイナリー研究センター)
○Shinichi YANO, Osamu TAKIMURA, Tamotsu HOSHINO (BRRC/AIST)

【緒言】リグノセルロース系バイオマスからのエタノール生産において、酵素糖化と発酵を並行して行う同時糖化発酵方式は、糖化により生成した糖が酵母によりすぐ消費されるため、生成糖による酵素反応の阻害を避けることができる優れた技術である。しかし通常用いられる糖化酵素の至適温度が50℃程度であるのに対し、通常エタノール発酵に用いられる酵母*Saccharomyces cerevisiae*の生育至適温度は30～35℃である。このため実際の同時糖化発酵は、糖化、発酵それぞれの至適温度から外れる中間の温度で行わざるを得ない。このためより高温でエタノール発酵ができる酵母の開発が望まれている。*Kluyveromyces marxianus* は高温性の酵母として知られており同時糖化発酵での利用が期待されているが、我々は最近48℃でのエタノール発酵が可能な新規酵母 *K. marxianus* DMB1株を単離した。本発表では、この菌株の高温での同時糖化発酵特性を、既に高温での発酵が報告されている他の *K. marxianus* 株との比較により明らかにすることを目的に行なった実験の結果について報告する。

【実験方法】サトウキビバガスを 1% NaOH 溶液中で、130℃、20 分処理し、中和・洗浄後乾燥したものを 10%(w/v)の濃度で調製し、これに糖化酵素 Cellic CTec2 (10FPU/ｇ基質) と前培養した各酵母株の培養液を加え、37、42、45、48℃の各温度で 4 日間培養した。実験には、45℃での発酵が報告されている *K. marxianus* の菌株(IMB-3、HUT7182、ATCC8544)も用い、DMB1 株との同時糖化発酵特性の比較を行った。

【結果】*K. marxianus* の 4 種の菌株において、培養温度 37℃、42℃ではエタノール濃度に大きな差はみられなかったが、45℃、48℃では DMB1 株が最も高いエタノール生産能を示し、IMB-3 株の生産量はこれよりわずかに低かったが、HUT7182 株、ATCC8544 株の 48℃でのエタノール生産量は DMB1 株の半分以下であり、多量のグルコースが消費されずに残存した。また DMB1 株の 48℃におけるエタノール生産量は 37℃での生産量の 80%であった。なお *K. marxianus* はキシロースを資化できるがエタノールには変換できないので、生成したエタノールはセルロースが糖化されて生成したグルコース由来と考えられる。以上の結果から、*K. marxianus* DMB1 株は、糖化酵素の反応至適温度に近い高温でもエタノール発酵ができる、同時糖化発酵に適した菌株であることが示された。

（本研究成果は、独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構（NEDO）の委託業務により得られたものです。）

Kluyveromyces marxianus, Simultaneous saccharification and fermentation, Ethanol

講演番号：3B33a08
講演日時、会場：3 月 28 日 10:27～ B 校舎 33 会場

オイルパーム古木から生産されるエタノールのエネルギー収率に関する研究

Energy efficiency on bioethnaol production in sap from old oil palm trunk

○村田 善則[1]、Hatairat Danjarean[1,5]、藤本 清彦[2]、小杉 昭彦[1]、荒井 隆益[1]、Wan Asma Ibrahim[3]、Othman Suliman[3]、Rokiah Hashim[4] ([1]国際農林水産業研究センター、[2]森林総合研究所、[3]マレーシア森林研究所、[4]マレーシア理科大、[5]カセサート大学農業・農工業生産改良研究所)

○Yoshinori MURATA[1], Danjarean Hatairat[1,5], Kiyohiko Fujimoto[2], Akihiko Kosugi[1], Takamitsu Arai[1], Ibrahim Wan Asma[3], Suliman Othman[3], Hashim Rokiah[4] ([1]Japan International Research Center for Agricultural Sciences (JIRCAS), [2]Forestry and Forest Products Research Institute (FFPRI), [3]Forest Research Institute Malaysia (FRIM), [4]Universiti Sains Malaysia (USM), [5]Kasetsart Agricultural and Agro-Industrial Product Improvement Institute (KAPI))

【はじめに】

オイルパームは最も迅速に生産地が拡大した作物のひとつであり、西アフリカ、中南米および東南アジアの赤道付近に分布している。特にマレーシア、インドネシア両国はオイルパーム生産の 8 割以上を担っている。油脂の生産以外にも、オイルパーム産業からはフロンドや空果房を始めとする多様なバイオマスが廃棄される。オイルパームには経済寿命があり、およそ 23 年で切り倒される。その際に、オイルパーム古木が廃棄される。我々はこのオイルパーム古木に大量の遊離糖が含まれること、及びそこからの燃料エタノール生産技術について明らかにしてきた。ここでは、異なる糖濃度のオイルパーム樹液において発酵したときのエネルギー収支について報告する。

【方法】

我々が開発したオイルパーム古木からの搾汁システム（シュレッダー及びミル）を用いてマレーシアにて搾汁試験を行った。樹液の糖濃度をグルコース測定キットを用いて測定し、防腐のためすぐに冷凍処理を施した。濃縮には平膜フィルターを用いた限外濾過を行い、その際の消費電力を測定し、濃縮の投入エネルギーとした。

【結果】

オイルパームには様々な品種があり、搾汁液に含まれる糖の種類や濃度が異なる。平膜フィルターによる限界濾過機を用いて濃縮した場合の電力を測定した。更にオイルパームトランクの破砕から搾汁までの工程、及びエタノール発酵までに要する電力も測定し、全ての電力の合計を投入エネルギーとした。濃縮した樹液を用いて 37 度～50 度の温度条件下でエタノール発酵を行ったところ、耐熱酵母 *Kluyveromyces marxianus* による発酵が 45 度まで安定した発酵状態を示した。オイルパーム樹液から得られたエタノールの熱量を生産エネルギーとして計算した。投入エネルギーは糖の初期濃度に、生産エネルギーは得られたエタノール量にそれぞれ依存したことから、投入エネルギーを超えない生産エネルギーを示す糖濃度を求めた。また、搾汁後のオイルパームトランク残渣を燃焼して、生産エネルギーとして用いると、エネルギー効率の改善が見られた。

bioresoueces, bioethanol, yeast

講演番号：3B33a09
講演日時、会場：3 月 28 日 10:38～ B 校舎 33 会場

熱溶菌性糸状菌を用いたグルコース生産 ～最適培地とその産生効率の評価～

Glucose production from heat lytic filamentous: selection of suitable growth medium

○森 慶太、佐々木 裕起、向 真樹、アディカリ ディネシュ、荒木 希和子、久保 幹（立命館大学）
○Keita MORI, Yuki SASAKI, Masaki MUKAI, Dinesh ADHIKARI, Kiwako S ARAKI, Motoki KUBO (Ritsumeikan Univ.)

【背景・目的】

食料と競合しないエネルギー資源として期待される木質バイオマスは、分解が困難であり、再資源化がほとんど行われていない余剰バイオマスである。木質バイオマスに生育し、高温で熱溶菌する糸状菌の探索を行ってきたところ、木質バイオマスを基質とし旺盛に生育する *Fusarium* sp. 72-1 (以降、72-1 株)が分離・同定された。この菌株は熱を加えると自己溶解する熱溶菌性糸状菌であり、オオカナダモ（葉）と米ぬかを 15：25 で配合した培地（C/N 23、C/P 9）にて最大グルコース濃度 5.87 g L^{-1} を示した。本研究では、新規の熱溶菌性糸状菌を様々な土壌から単離し、これらがより多くのグルコースを放出する生育培地の最適条件を、余剰バイオマスを用いて検討した。

【方法・結果】

糸状菌の生育には培地に含まれる炭素、窒素、リンの割合を調節することが重要であると考え、余剰バイオマスを用いて有機的に、糸状菌の生育培地を調製した。余剰バイオマスとしてオオカナダモ、米ぬかを用いて、これらの配合を検討した。作製した培地で生育させた菌株を採取して 50 mM リン酸バッファーに添加し、55℃で 1 時間振盪後、グルコース定量キット（テストワコーCⅡ、和光純薬工業、大阪）を用いて放出されたグルコース濃度を測定し、菌体ごとの放出グルコース濃度の順位を決定した。この結果、37-1 株においてオオカナダモと米ぬかを 1：3 で配合した培地（C/N 16、C/P 10）にて最大グルコース濃度 4.90 g L^{-1} を示した。一方、水草のみの培地で生育した菌体からは、グルコースがほとんど放出されなかった。このことから、取得した菌株の生育には炭素、窒素、リンの割合の調節が重要であることがわかった。また、培地に米ぬかを用いると糸状菌の生育が良くなることが明らかになった。さらに菌体あたりのグルコース放出量を評価するため、quantitative PCR を用いて培地中に含まれる糸状菌の菌体量を測定することを試みている。

glucose, wood biomass, heat lytic fungi

講演番号：3B33a10
講演日時、会場：3 月 28 日 10:49～ B 校舎 33 会場

エタノール発酵糸状菌のイオンビーム変異による高温耐性化およびリグノセルロースの同時糖化発酵への応用

Construction of thermo-tolerant ethanol producting fungi by ion-beam mutation and its application to simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulose

○角田 貴一[1]、高野 真希[2]、畑下 昌範[3]、星野 一宏[2] ([1]富山大工、[2]富山大院理工・ナノ新機能、[3]若狭湾エネ研)
○Kiichi TSUNODA[1], Maki TAKANO[2], Masanori HATASHITA[3], Kazuhiro HOSHINO[2] ([1]Dpt. Eng., Univ. Toyama, [2]Grad. Sch. Sci. Eng., Univ. Toyama, [3]WERC)

【目的】リグノセルロース系バイオマスからの効率的なエタノール生産法として、加水分解酵素とエタノール発酵微生物を組み合わせた同時糖化発酵が期待されている。しかし、通常このバイオプロセスは加水分解酵素の至適温度に対し、エタノール発酵菌の至適発酵温度が低いため、培養温度を発酵至適温度に合わせる必要があり、律速段階である加水分解段階の改善は望めない。それ故、高温度で増殖でき、さらにエタノール発酵が可能な菌株の開発が望まれる。しかし、エタノール発酵菌の耐熱化は、膜構造変化や代謝関連酵素の機能変化など複雑な要素が絡むため、従来の薬剤や放射線照射による変異や遺伝子組換えでは容易に達成させることは難しい。そこで本研究では、変異領域が広域かつ変異頻度が高いイオンビームを照射することにより、高温発酵型のエタノール生産菌の構築を試みた。さらに、リグノセルロース系バイオマスに対して本変異株とセルラーゼ剤を組み合わせた高温同時糖化発酵を実施し、エタノール生産の可能性を検討した。
【方法と結果】エタノール発酵糸状菌である *Mucor circinelloides* に対しカーボンおよびプロトンイオンビーム照射（(公財)若狭湾エネルギー研究センター: 各 2,000 Gy）を実施し、高温条件下で選択・育種することで、48℃で増殖可能な I-48 株を得た。本菌株の増殖速度は 40℃でグルコースの初期濃度 50 g/L で培養を行った際、28˚C で親株(WT)の増殖速度の約 2 倍に向上でき、エタノール生産性も 40℃の培養では 0.46 g/L/h となり、親株を 28˚C で培養した時の約 2 倍となった。さらに、本菌株を 45˚C で培養を行った際にもエタノール発酵の生成が確認できた。次に、本菌株を用いて 40℃で 50 g/L のグルコースの繰り返し回分培養を 5 回行った結果、培養 48 時間でそれぞれ約 17.0～26.8 g/L のエタノールを繰り返し生産できた。本菌株は、40℃で安定にエタノール発酵に利用できることがわかった。これらを踏まえ、100 g/L のもみがらおよび木粉（糖質含量 58%および 49%）に対してセルラーゼ剤と本菌株組み合わせた同時糖化発酵を 40˚C で実施した結果、培養 96 h で、それぞれ 19.84 g/L および 13.16 g/L のエタノールを生成できた。

ethanol fermentation, thermotolerant, simultaneous saccharification and fermentation

講演番号：3B33a11
講演日時、会場：3 月 28 日 11:10～ B 校舎 33 会場

葉面酵母 *Cryptococcus flavus* からの生分解性プラスチック分解酵素の生産量の高い変異株の取得
Isolation of a mutant from phyllosphere yeast *Cryptococcus flavus* which highly produces biodegradable plastic degrading enzyme
○渡部 貴志、鈴木 健、小板橋 基夫、吉田 重信、北本 宏子（農環研）
○Takashi WATANABE, Ken SUZUKI, Motoo KOITABASHI, Shigenobu YOSHIDA, Hiroko K. Kitamoto (NIAES)

【背景・目的】環境負荷と回収労力の低減のため、農業用プラスチック資材に生分解性プラスチック（生プラ）の導入が図られている。これまで我々は、植物常在菌から、*Pseudozyma* 属酵母や *Cryptococcus* 属酵母を生プラ分解酵素生産候補株として取得した。その単離には、大豆油と生プラ基質として用い poly butylene sucinate-*co*-adipate (PBSA)エマルジョンを含む平板培地で、PBSA を分解してハロを形成する特性を利用した。この特性でイネから単離した *Cryptococcus flavus* GB-1 株は、グルコースと PBSA を含む培地上ではハロを形成しないことから、生プラ分解酵素の生産が抑制されている可能性が考えられた。そこで、グルコースを炭素源とした場合でも、ハロを形成するようになった *C. flavus* GB-1 株の変異株は、親株に比べて生プラ分解酵素の生産量が高くなるのではないかと考えた。また、*C. flavus* 近縁種の *Cryptococcus* sp. S-2 株（CS2 株）が分泌する生プラ分解酵素（CLE）の遺伝子配列情報が報告されている。今回我々は、*C. flavus* GB-1 株の生プラ分解酵素（CfCLE）の遺伝子配列の取得と CfCLE 高生産変異株の取得、Jar fermentor を用いた CfCLE の大量生産の検討、酵素の基本的特性の解析を行った。
【方法・結果】まず、CS2 株の CLE の遺伝子配列情報を基に primer を設計し、*C. flavus* GB-1 株のゲノムから CfCLE 遺伝子配列を取得した。その結果、*C. flavus* GB-1 株の CfCLE は、アミノ酸配列で、CS2 株の CLE と 93%の相同性を有していた。次に、UV 照射により突然変異誘発処理を行った *C. flavus* GB-1 株の培養液を、グルコースを炭素源とした PBSA エマルジョン寒天培地に塗布したところ、生育してきた約 3 万コロニーから、ハロを形成するようになっていたものは 1 株のみであった。グルコースを炭素源とした液体培養を行ったところ、96 時間後には親株 GB-1 株の PBSA 分解活性は 0.58 U/ml であったのに対し、変異株 DMC1 株は 1.53 U/ml と約 3 倍の活性を示した。なお、DMC1 株のプロモーター領域を含む CfCLE 遺伝子配列の変異は認められなかった。さらに、炭素源の種類による CfCLE 生産に与える影響を調べたところ、キシロースを用いることによって、GB-1 株、DMC1 株ともに 5 倍以上に CfCLE 生産量が上昇した。そこで、Jar fermentor を用いたキシロース流加培養による CfCLE の大量生産を試みた。結果、72 時間の培養で GB-1 株は 12.1 U/ml、DMC1 株は 21.2 U/ml の活性を示す CfCLE を得た。PBSA エマルジョン吸着特性を利用して精製した CfCLE は、至適 pH7.8、至適温度 45℃であり、幅広い脂肪鎖エステルの合成基質と生プラを分解した。
【謝辞】本研究の一部は、農林水産業・食品産業科学研究推進事業で実施した。

Cryptococcus flavus, Biodegradable plastic degrading enzyme, Jar fermentor

講演番号：3B33a12
講演日時、会場：3 月 28 日 11:21～ B 校舎 33 会場

2,3-ブタンジオール高生産菌の選択と生産条件の最適化

Screening of bacteria with high 2,3-butanediol production and the optimization of culture condition on minimal medium

○大槻 隆司[1]、望月 隆一[1]、青木 信雄[2]、宇井 定春[1]（[1]山梨大院・総研・生命工、[2]JX 日鉱日石エネ・中研・先端領域研）
○Takashi Ohtsuki[1], Ryuichi Mochizuki[1], Nobuo Aoki[2], Sadaharu Ui[1] ([1]Dept. Biotechnol., Fac. Life Environ. Sci., Univ. Yamanashi, [2]Central Tech. Res. Lab., JX Nippon Oil & Energy Corp.)

【目的】近年、原油の供給不安により代替エネルギー源の開発が進められているが、原油に由来する化成品の代替原料の開拓はあまり進んでいない。合成ゴムやプラスチック原料として重要な1,3-ブタジエンは、微生物により生産可能な2, 3-ブタンジオール（2,3-BD）の脱水により容易に製造が可能である。本研究ではバイオマス由来グルコースを炭素源として2,3-BDを高効率で生産する細菌を選抜し、最少培地において高い生産性を得ることを目的とした。

【方法】土壌分離菌あるいは保存機関株より、まず天然培地において高糖濃度に寛容かつ 2,3-BD 生産性の高いものを選抜した。さらに、基本培地として Davis 最少培地を用い、試験管、坂口フラスコでの振盪培養からジャーファーメンターへスケールアップしながら最適条件を探索した。

【結果および考察】生産菌の選抜において、15%グルコースを含むブイヨン培地による試験管培養で 51.7 g/L の 2,3-BD 生産を示した *Serratia marcescens* NBRC3735 株を選択した。窒素源原料コストの低廉化を目的として最少培地による検討を行った結果、窒素源を$(NH_4)_2SO_4$ とし、さらに $FeSO_4$ を添加することで高い生産性が得られることが明らかとなった。2.5 L スケールのファーメンター培養での検討の結果、培養温度 30℃にて NaOH 添加により pH 7 を維持し、通気 1 L/min で 300 rpm 撹拌にて OD_{660} = 6 まで菌体を生育させたのち、通気を停止して低酸素条件に移行させることで最も高い 2,3-BD 生産が得られた。選抜株は高濃度グルコースに寛容ではあるが、2,3-BD 生産においては本培養開始時に培地中グルコース濃度を 10%以上にすることは好ましくなく、初発グルコース濃度 5%から減少に応じ流加で補うことが有効であった。複数回のグルコース流加を検討した結果、現在までに、最大 28.4 g/L（99.5 g in 3.5 L）の 2,3-BD 生産、および最大 0.394 g BD/g consumed glucose の収率が得られている。これを踏まえ、代謝変異株の取得も含めさらなる高収量・高収率を達成すべく検討中である。

2,3-butanediol production, *Serratia marcescens*

講演番号：3B33a13
講演日時、会場：3 月 28 日 11:32～ B 校舎 33 会場

セルロース由来基幹化学品レブリン酸の微生物変換

Microbial conversion of levulinic acid, a cellulose-derived building block

○羽部 浩[1]、佐藤 俊[1]、森田 友岳[1]、福岡 徳馬[1]、小林 慶一[2]、桐村 光太郎[2]、北本 大[1]([1]産総研・環境化学、[2]早大理工・応化)
○ Hiroshi HABE[1], Shun SATO[1], Tomotake MORITA[1], Tokuma FUKUOKA[1], Keiichi KOBAYASHI[2], Kohtaro KIRIMURA[2], Dai KITAMOTO[1] ([1]AIST, [2]Waseda Univ.)

【目的】現在、非食糧バイオマスで、かつ規模感の大きい木質系の利用においては、原料中の主成分であるリグノセルロースの酵素糖化に関する研究が行われている。一方で、セルロース酵素糖化の高効率化を目指した技術開発には、コスト面など未だ課題も多い。近年、Lewis 酸と Brønsted 酸のハイブリッド酸触媒など、木粉をレブリン酸（LA）やその誘導体へと 1 段階で変換可能な化学触媒が開発されている[1,2]。また、マイクロ波やイオン液体を使ってセルロースから LA を製造する論文も発表されるなど、基幹化学品としての LA は注目されつつある。一方、LA やフルフラールのような糖の過分解物は、一般に微生物の生育阻害を引き起こすため、微生物変換の原料とする研究はこれまであまり報告がなく、LA の微生物代謝についても未だ知見が少ない。本研究では、環境中から新たに LA 分解菌を単離し、培養液中に蓄積する LA 代謝物を解析することを目的とした。
【方法と結果】土壌等の環境サンプルを 2%（w/v）の LA を唯一の炭素源とする合成培地[0.5%（w/v）硫酸アンモニウム、0.2%（w/v）リン酸水素二カリウム、0.05%（w/v）硫酸マグネシウム 7 水和物、pH 7]5 mL の入った試験管に適量加え、30℃で好気的に 5～7 日間培養した。得られた培養液の一部を新しい同培地に植え継ぎ、さらに好気的に培養した。菌の増殖が見られたサンプルを、寒天培地に塗布し、単一コロニーを形成させた。単離した菌株の中から、4%（w/v）LA を含む栄養培地[0.5%（w/v）ポリペプトン、0.5%（w/v）酵母エキス、0.05%（w/v）硫酸マグネシウム 7 水和物]で良好な生育を示し、かつ高速液体クロマトグラフィー（HPLC）解析にて LA 分解能および代謝物のピークが確認された 3 細菌株（LA6W、LA18T、LA20W）を選抜し、16S rRNA 解析による同定を行った。3 菌株は、それぞれ *Rhodococcus hoagie*, *Pseudomonas* sp., *Burkholderia stabilis* であることが明らかとなった。
7%（w/v）LA を含む栄養培地を用いて、LA18T 株の高菌体濃度培養を行い、HPLC 解析により培養液中の代謝物濃度を経時的に測定したところ、4 日後の培養液から 13.6 g/L の酢酸が検出された。また、LA6W 株を用いて同様な実験を行ったところ、4 日後の培養液から 9.1 g/L のプロピオン酸が検出された。一方、LA20W 株培養液の HPLC 解析において唯一ピークが検出された化合物について、分離精製して各種分析を行ったところ、トレハロースであることが明らかとなった。4%（w/v）LA を含む栄養培地を用いて、LA20W 株の高菌体濃度培養を行ったところ、3 日後の培養液から約 2 g/L のトレハロースが検出された。

1) Tominaga et al.(2011)Green Chem.,13,810; 2) Nemoto et al.(2014)Chem. Lett.,43,1327

Levulinic acid, Lignocellulose, Trehalose

講演番号：3B33a14
講演日時、会場：3 月 28 日 11:43～ B 校舎 33 会場

高濃度レブリン酸分解菌の単離と解析

Isolation and analysis of bacteria capable of degrading high concentration of levulinic acid

羽部 浩[1]、○佐藤 俊[1]、森田 友岳[1]、福岡 徳馬[1]、小林 慶一[2]、桐村 光太郎[2]、北本 大[1]([1]産総研・環境化学、[2]早大理工・応化)
Hiroshi HABE[1], ○ Shun SATO[1], Tomotake MORITA[1], Tokuma FUKUOKA[1], Keiichi KOBAYASHI[2], Kohtaro KIRIMURA[2], Dai KITAMOTO[1] ([1]AIST, [2]Waseda Univ.)

【目的】リグノセルロースから酸触媒により一段階で合成可能なレブリン酸（LA）は、蒸留による精製が可能であり、米国エネルギー省によりバイオマス由来基幹化学品の TOP12 化合物にも選定されている。これまでに、化学触媒を用いて、LA から各種機能性化学品だけでなく、ブタジエン等の C4 化合物や芳香族化合物等の基礎化学品を製造する技術も論文等で発表され始めている。仮に、将来 LA が化学品製造原料として広く利用された場合には、各種環境中へ広く拡散することも考えられる。その際、LA は微生物の生育阻害を引き起こすことも報告されているため、環境中に存在する微生物の LA 分解能に関して知見を得ておくことは必要である。本研究では、環境中から新たに高濃度 LA の耐性菌あるいは分解菌を単離し、微生物種や LA 分解能を解析することを目的とした。
【方法と結果】土壌等の環境サンプルを 5%（w/v）の LA を含む栄養培地[0.5%（w/v）ポリペプトン、0.5%（w/v）酵母エキス、0.05%（w/v）硫酸マグネシウム 7 水和物]5 mL の入った試験管に適量加え、30℃で好気的に 5～7 日間培養した。高速液体クロマトグラフィー（HPLC）解析により集積培養液中の LA 分解が確認されたサンプルについて、培養液の一部を 10%（w/v）の LA を含む栄養培地に植え継ぎ、さらに 30℃で好気的に 5～7 日間培養した。微生物の増殖が見られたサンプルについて、寒天培地に塗布し、単一コロニーを形成させた。単離した細菌株の中から、LA を含む栄養培地で良好な生育を示し、かつ HPLC 解析にて LA 分解能が確認された 19 株を選抜し、16S rRNA 解析による同定を行った。得られた LA 分解細菌は 5 属に渡り、これまで LA 分解菌として報告のない *Rhodococcus erythropolis*, *Brevibacterium epidermidis*, *Cellulosimicrobium cellulans*, *Granulicatella adiacens*, *Aeromonas sobria* などが含まれていた。

8%（w/v）LA を含む栄養培地を用いて、*B. epidermidis* LA39-2 株の高菌体濃度培養を行い、HPLC 解析により培養液中の LA 濃度を経時的に測定したところ、8 日間の反応で 78.3% の LA が分解された。さらに、LA39-2 株の高菌体濃度培養により、9%（w/v）および 10%（w/v）LA の分解能を確認したところ、10 日間の反応でそれぞれ 84.3%および 53.3% の LA が分解された。本結果は、LA 濃度 8%（w/v）以上の微生物分解に関する初めての報告である。

Levulinic acid, Lignocellulose, *Brevibacterium* spp.

講演番号：3B33a15
講演日時、会場：3 月 28 日 11:54～ B 校舎 33 会場

ラクトースやグリセロールを炭素源として用いたプロピオン酸菌による有機酸生産

Organic acid production by *Propionibacteria* using lactose and glycerol as a carbon source

○布川 玲奈[1]、松井 徹[2]、上田 誠[1]、高屋 朋彰[1] ([1]小山高専物質、[2]東京工科大応生)
○Reina NUNOKAWA[1], Toru MATSUI[2], Makoto UEDA[1], Tomoaki KOUYA[1] ([1]NIT. Oyama Col., [2]Tokyo Univ. of Tech.)

【背景・目的】牛乳からチーズを製造する際，約 90%はホエーとして排出される．ホエーは BOD が高く（30,000～60,000 ppm），処理や有効利用には大型設備が必要であるため，いまだ産業廃棄物として廃棄されている現状がある．一方，バイオディーゼル燃料（BDF）製造のプロセスで副生する廃グリセロールもまた，未反応のアルカリを多く含んでおり精製にコストがかかるなどの問題から，その多くが廃棄されている．

本研究では，産業廃棄物であるホエーを炭素源，廃グリセロールを炭素源および pH 調整剤として用いたプ有機酸（プロピオン酸，酢酸）の生産を目的とした．具体的には，ホエー中の炭素源であるラクトースおよび乳酸 Na，廃グリセロール中の炭素源であるグリセロールを資化するプロピオン酸菌の検索および有機酸生産性の評価を行った．

【方法】微生物の分離源としてウシ生乳・ヤギ生乳を用いた．プロピオン酸菌の単離用培地として，YEL 培地を使用した．生乳を単離用寒天培地に塗布し， 30℃で 3～7 日間の嫌気培養を行った．得られたコロニーに対してカタラーゼ試験を行い，カタラーゼ陽性の候補株を釣菌して液体培地で静置培養した. また, 培養液中のプロピオン酸濃度を HPLC で測定し, 得られたプロピオン酸菌候補株を-80℃で保管した．単離菌の推定は 16S rRNA 系統解析により行った．

次に，単離した候補株の炭素源の資化性試験を行った．炭素源として，ラクトース，乳酸ナトリウム，およびグリセロールを用いた．初期炭素源濃度を 10 g/L に調整した YE 培地に候補株を初期濁度（O．D．$_{660\,nm}$）≒0.05～0.1 となるように接種し，一定時間ごとに吸光度（O．D．$_{650\,nm}$）を測定した．また，遠心分離（20，000×*g*，20 min）によって培養 72 時間目の培養上清を回収し，培養上清中の有機酸濃度を Shim-Pack SCR-102H カラム（島津製作所）と電気伝導度検出器（島津製作所）を備えた HPLC により測定した．

【結果】生乳から, プロピオン酸菌候補株を 8 菌株単離した. 単離した株はそれぞれ, *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* や *Propionibacterium* sp. JCM 6434，および *Propioniciclava* sp.と高い相同性を示した．次に，これらの候補株に対して炭素源の資化性試験を行った．その結果，複数のプロピオン酸菌候補株（ONCT 1007 株など）がラクトース，グリセロール，および乳酸 Na を炭素源として増殖してプロピオン酸や酢酸を生産したことから，ホエーと廃グリセロールを炭素源とした有機酸生産に利用できることが示唆された．

Propionibacteria, lactose, glycerol

講演番号：3B33p01
講演日時、会場：3 月 28 日 14:00～ B 校舎 33 会場

界面活性剤を用いた *Rhizopus oryzae* の乳酸生産性の向上

Improvement of lactic acid productivity of *Rhizopus oryzae* by surfactants

○壺井 雄一、西村 祐美、高橋 史員、澤田 和久、尾崎 克也、五十嵐 一暁、萩原 浩（花王（株）・生物科学研究所）
○Yuichi TSUBOI, Yumi NISHIMURA, Fumikazu TAKAHASHI, Kazuhisa SAWADA, Katsuya OZAKI, Kazuaki IGARASHI, Hiroshi HAGIHARA (Kao corp. Biol. Sci. Res.)

乳酸は、バイオケミカルスの中で市場規模、成長率ともにトップクラスの物質である。乳酸を高生産する微生物は複数知られ、安価高生産の観点から糸状菌 *Rhizopus oryzae* が優れていると考えるが、実生産を考慮した場合、安定的なペレット形態への制御が大きな課題となる。形態制御の方法は複数知られるが、今回は界面活性剤に着目し検討を行った。

培地に添加する界面活性剤のスクリーニングを行った結果、数種の界面活性剤にて安定的なペレット形成が認められ、特に起泡性の観点からソルビタンモノラウレートが優れると考えられた。ソルビタンモノラウレート添加条件にて作製した菌体ペレットを用い乳酸生産性を確認したところ、予想外に乳酸生産速度が約 1.7 倍に向上した。また、最大乳酸生産速度は 20 g/L/h を超え、さらに、同じ菌体ペレットを用いて少なくとも 3 バッチは生産速度を落とさず、連続的に乳酸を生産することを確認した。

網羅的な遺伝子発現量解析及び酵素活性解析を行ったところ、乳酸生産速度向上の要因は、乳酸生産に重要な乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子の発現量及び酵素活性が特異的に向上したためであることが示唆された。また、ソルビタンモノラウレート以外の界面活性剤においても検討したところ、乳酸デヒドロゲナーゼの酵素活性の向上と乳酸生産速度の向上は概ね相関していることが認められた。

lactic acid, *Rhizopus oryzae*, surfactant

講演番号：3B33p02
講演日時、会場：3 月 28 日 14:11～ B 校舎 33 会場

PCB/ビフェニル分解菌を利用した環境汚染物質からの PHA 生産

PHA production from environmental pollutants by a PCB/biphenyl degrading bacterium

○矢島 泰斗、前田 理久 (明治大学)
○Taito Yajima, Michihisa Maeda (Meiji Univ.)

ポリヒドロキシアルカン酸(PHA)は、様々な種類の微生物によって生産される脂肪族ポリエステルであり、生分解性をもつプラスチックとしても知られる。これまでに PHA を生産する微生物として 300 種以上もの細菌や古細菌が報告されてきた。しかし、これらの中で環境汚染物質として知られる PCB/ビフェニルを原料にした PHA 生産の報告はない。

Alcaligenes denitrificans A41 株は、PCB/ビフェニル分解能をもち、またそれらを炭素源として PHA を生産することができる。これまでの研究で A41 株が、窒素制限下でコハク酸あるいはビフェニルを単一炭素源として加え培養することで PHA を生産することが既に確認されている。また、はじめに富栄養培地(LB 培地)を用いて十分な菌体量を確保し、次いで窒素源を制限した無機塩培地を用いることで PHA 生産を向上させた。われわれは、炭素源から PHA までの炭素の流れを詳細に解析し、代謝系を再構築することで、さらに生産性を上げることを目指している。

A41 株におけるビフェニルから PHA 生産までの炭素の流れをさらに詳しく解析するために、窒素源を制限しない単一炭素培地で培養して菌体量を確保し、窒素源を含まない同一の単一炭素によって培養して PHA を生産させた。このとき炭素源としてビフェニル、コントロールとしてコハク酸を用いた。PHA 生産特性は、蓄積率、モノマー組成(C4：3-ヒドロキシ酪酸および C5：3-ヒドロキシ吉草酸)の経時変化として解析した。

LB 培地で培養した菌体に比べ、単一炭素源で培養した菌体では、ビフェニルを炭素源にした場合、PHA の蓄積率が大幅に上昇したが、最大蓄積率を示す時間はかなり遅くなった。また、モノマー組成は一貫して C4 モノマーが高い傾向を示した。一方、コハク酸では、12 時間後に最大蓄積率を示した後、速やかに下降し、モノマー組成も低蓄積時によく見られるように C4 モノマー分率が低下した。

本実験で用いた単一炭素源・窒素源制限による培養では、細胞増殖にあまり使用されないことから、炭素の流れがアセチル CoA を主要とする代謝経路になっていると予想される。しかしながら、コハク酸からの合成では 12 時間以内に最大蓄積率を示す一方、ビフェニルでは 48 時間程度を要する理由として、単に炭素源としての“使いやすさ”というだけでは説明できないため、さらなる解析を行っている。

Polyhydroxyalkanoate, PHA, Biphenyl degradation

講演番号：3B33p03
講演日時、会場：3 月 28 日 14:22～ B 校舎 33 会場

フェイシンタンパク質による PHA 重合反応の促進効果
Activation of polyhydroxyalkanoate synthesis by phasin proteins

○牛丸 和乗、柘植 丈治（東工大院総理工）
○Kazunori USHIMARU, Takeharu Tsuge (Tokyo Institute of Technology)

【諸言】ポリヒドロキシアルカン酸（PHA）は糖や植物油などの炭素源を原料としてある種の微生物が合成する脂肪族ポリエステルで、熱可塑性や生分解性・生体適合性などの特徴を有している。これらの特徴から PHA は微生物合成可能な環境調和型高分子材料としての応用が期待されている。PHA 重合反応において最も重要な役割を担っているのが PHA 重合酵素（PhaC）である。PhaC の興味深い性質のひとつとして、精製酵素を用いた *in vitro*（細胞外）反応時に非イオン性界面活性剤を添加することで基質消費速度が向上することが知られている。このような基質消費速度の向上効果を *In vivo*（細胞内）での PHA 生産に応用することができれば、PHA 生産効率の向上において有用となる可能性がある。本研究では *In vivo* における PhaC の基質消費向上因子として PHA 顆粒結合タンパク質（PhaP）に注目し、PhaP が PhaC による重合反応に与える影響を *in vitro*、*in vivo* の両実験から評価・解析した。

【方法および結果】化学合成したモノマーと精製した *Aeromonas caviae* 由来 PhaC（$PhaC_{Ac}$）および PhaP（$PhaP_{Ac}$）を用いた *in vitro* 重合反応では $PhaP_{Ac}$ の濃度に依存して基質消費速度が向上することが確認された。また、異なる PHA 合成細菌である *Ralstonia eutropha* 由来の PhaP（$PhaP1_{Re}$）を用いた実験でも同様の $PhaP1_{Re}$ 濃度依存的な基質消費速度の向上が確認された。これら二種類の PhaP は分子量やアミノ酸配列が大きく異なるにも関わらず、いずれも基質消費速度の向上効果を示したことから、この基質消費速度の向上には特定の立体構造に基づくタンパク質-タンパク質間相互作用ではなく、PhaP の PHA 吸着能が関与していると考えられる。

続いて、上記の基質消費速度の向上効果を *in vivo* で検証するために、$PhaC_{Ac}$ をコードする遺伝子と *R. eutropha* 由来のモノマー供給遺伝子群（$phaA_{Re}$ および $phaB_{Re}$）を有するプラスミドと、L-アラビノース濃度依存的に $PhaP_{Ac}$ を発現できるプラスミドを *E. coli* TOP10 株に導入し、グルコースを炭素源とした培養を行った。この結果、$PhaP_{Ac}$ 遺伝子を導入していない株では L-アラビノース濃度を変化させても PHA 蓄積は一定であったのに対して、$PhaP_{Ac}$ 遺伝子導入株では L-アラビノース濃度依存的（$PhaP_{Ac}$ 濃度依存的）な PHA 蓄積向上が確認された。PHA 生産量は最大で 4.2 倍（0.20 g/L → 0.83 g/L）の向上を示した。

本研究は *in vivo* における PhaP の新たな機能を見出すと共に、微生物を用いた PHA の高効率生産において有用な知見を与えるものと考えられる。

Polyhydroxyalkanoate, PHA synthase, Phasin

講演番号：3B33p04
講演日時、会場：3 月 28 日 14:33～ B 校舎 33 会場

高温高圧水処理によるイカ中骨からのβキチン調製

beta-chitin production from squid pens by high-temperature water treatment

○長田 光正[1]、古関 健一[2]、古川 滉人[2]、中川 裕子[2]、渡邊 崇[2]、二階堂 満[2]、戸谷 一英[2]([1]信州大繊維、[2]一関高専物化工)
○Mitsumasa Osada[1], Kenichi Koseki[2], Hiroto Furukawa[2], Yuko Nakagawa[2], Takashi Watanabe[2], Mitsuru Nikaido[2], Kazuhide Totani[2] ([1]Shinshu Univ., [2]Ichinoseki Coll.)

【目的】三陸の地域資源であるスルメイカの中骨（腱）には，βキチン（30wt%），タンパク質（70wt%），および灰分（1wt%以下）が含まれているが、有効利用されずに年間数百トン規模で廃棄されている．キチンの結晶構造は，多糖鎖が互いに逆方向に配向し分子間水素結合により熱力学的に安定なαキチンと，多糖鎖が同じ方向に配向しており緩やかな結晶構造をとっているβキチンに分類される．αキチンはカニ殻など自然界に広く分布しているが，βキチンはイカ中骨など分布が限られている．一方でβキチンは緩やかな結晶構造のため，生体親和性がαキチンよりも高く，αとは違った機能性素材として期待されている．現在のイカ中骨からのβキチン調製法は，酸による脱灰およびアルカリよる脱タンパクが必要である上，その際にタンパク質部分はアルカリ廃液となってしまうことが問題である．そこで本研究では，高温高圧水を用いた新たなβキチン調製法を開発し，同時に従来は廃棄されていたタンパク質もポリペプチドとして有効利用する方法を検討した．

【実験方法】(1) βキチンおよびポリペプチド生成　洗浄・乾燥済みのイカ中骨 100 mg，蒸留水 3.0～5.0 g を高温高圧対応の回分式反応器（SUS316 製，内容積 6 cm^3）に仕込み，それを反応温度 150～300 °C に設定した溶融塩炉に入れることで反応を開始させた．1～60 min 処理後，反応器を溶融塩炉から取り出し，冷水浴に浸すことで反応を停止させた．その後，反応器からβキチンを含む中骨を固体として，タンパク質はポリペプチドを含む水溶液として回収した．

(2) βキチンおよびポリペプチドの分析　上記(1)で回収した固体の重量を測定し，βキチンの残存量と，ポリペプチドの抽出量の目安とした．ポリペプチド抽出量は，上記の水溶液 0.1 mL を 70 倍希釈し Lowry 法により求めた．また，処理後の固体を IR 測定し，βキチンと比較した．

【結果】250°C の高温高圧水処理後のイカ中骨の残渣重量（固体）は，反応時間の増大とともに減少し約 30wt%で一定となった．またポリペプチド抽出率は，反応時間とともに増大し，15 min 以降で約 70wt%となった．これは高温高圧水処理により，イカ中骨中のタンパク質のみが加水分解（低分子化）されポリペプチドとして水可溶分となり，βキチンは固体として安定に残ったためと考えている．一方，300°C ではβキチンの加水分解も進行した．250°C で処理後のイカ中骨の残渣を IR 測定したところ，処理時間の増大とともに試薬の純βキチンの波形に近づいた．以上より，イカ中骨を高温高圧水で処理することで，従来の酸・アルカリを用いずに，固体としてβキチンが回収でき，水溶液としてポリペプチドが得られることを明らかにした．　*本研究は JST 復興促進プログラムで行われた．

chitin, peptide, glucosamine

講演番号：3B33p05
講演日時、会場：3 月 28 日 14:44～ B 校舎 33 会場

β-キチンナノファイバーの調製と物性評価

Preparation of β-chitin nanofiber, and evaluation of its properties

○二階堂 望[1]、古関 健一[1]、二階堂 満[1]、長田 光正[2]、伊藤 良仁[3]、高橋 亨[3]、小浜 恵子[3]、川崎 一則[4]、谷口 隆雄[5]、成廣 和枝[5]、山下 和彦[5]、野村 義宏[6]、戸谷 一英[1]([1]一関高専・物化工、[2]信州大・繊維、[3]岩手工技セ・食品技術、[4]産総研・関西センター、[5]ヤエガキ醗酵技研、[6]農工大・農)
○Nozomi NIKAIDO[1], Kenichi KOSEKI[1], Mitsuru NIKAIDO[1], MItsumasa OSADA[2], Yoshihito ITO[3], Toru TAKAHASHI[3], Keiko KOHAMA[3], Kazunori KAWASAKI[4], Takao TANIGUCHI[5], Kazue NARIHIRO[5], Kazuhiko YAMASHITA[5], Yoshihiro NOMURA[6], Kazuhide TOTANI[1]([1]National Institute of Technology, Ichinoseki College, [2]Faculty of textile science and technology, Shinsyu univ., [3]Iwate Industri. Res. Inst., [4]AIST Kansai, [5]YAEGAKI Bio-industry, Inc., [6]Faculty of Agriculture, Tokyo university of agriculture and technology)

【背景および目的】　キチンは、カニ殻などを希塩酸で脱灰、希 NaOH で除タンパクすることで製造される *N*-アセチルグルコサミン(GlcNAc)が β-1,4 結合した多糖類である。GlcNAc 残基の 5～10%は脱アセチルしており、グルコサミン(GlcN)として正電荷を有する。一般にカニなどの α キチン(キチン鎖が逆平行)は解繊(ナノファイバー化)しにくいが、イカ中骨などの β キチン(平行構造)は比較的容易に解繊可能である。キチンナノファイバー(キチン NF)は通常のキチンに比べ表面積が飛躍的に増大しており機能性が期待される。α キチン NF は皮膚再生、潰瘍性大腸炎に対する抗炎症効果、バイオ農薬(エリシター活性)などへの応用が検討されているが、β キチン NF の用途展開はこれからである。我々はイカ中骨からアルカリ・酸処理により β キチンを調製し、乾式粉砕工程を経て、ウォータージェットによる湿式解繊処理を行い NF とする技術を確立した。本研究では β キチンの製造方法と NF 物性の関係を評価した。また β キチンのアルカリ処理により β キトサンを調製、NF 化し物性を評価した。
【材料および方法】　イカ中骨より希塩酸処理、希アルカリ処理、水洗浄を経て精製した β-キチンを各種乾式粉砕した後、ウォータージェットによる湿式解繊処理(スギノマシン社製 Star Burst)を施すことで β-キチン NF (0.5～10 wt. %)を調製した。酸処理とアルカリ処理の順序を変えた NF も調製した。また、β-キチンを濃アルカリ処理してから乾式粉砕、湿式解繊処理を施すことで β-キトサン NF を試作した。物性評価について、透過率は NF の 600 nm および紫外・可視領域で、粘度は B 型回転粘度計で、分子量は HPLC-GPC で測定した。更に SEM、TEM、急速冷凍ディープエッジ・レプリカ法にて表面構造を観察した。NF に様々な機能性素材を担持させたハイブリッド NF を調製し評価した。
【結果】　酸処理で終了した β-キチン由来の NF は透明度(透過率)、粘度、保水性が高く、アルカリ処理で終了した β-キチン由来の NF や β-キトサン NF は透明度などが低く白濁していた。SEM および急速冷凍ディープエッジ・レプリカ法による観察で、酸終わり β キチン由来の NF の直径は 5～10 nm で、ナノ分散した 3 次元ネットワーク構造を有していた。アルカリ終わり β キチン由来の NF や β-キトサン NF はファイバー径が大きく、ナノ分散しているとは言えなかった。β キチン NF は高い保水性と正電荷により機能性素材やウイルス阻害剤等を静電的に吸湿水中に担持可能と考えられ、生物学的な効果が期待される。　*本研究は JST 復興促進プログラムで行われた。

squid pen, β-chitin, nanofiber

講演番号：3B33p06
講演日時、会場：3 月 28 日 15:05～ B 校舎 33 会場

コポリ（L-乳酸/グリコール酸）のステレオコンプレックスの生分解性

Biodegradation study on sterecomplex of copoly(L-lactic acid/glycolic acid)

○中山 敦好、川崎 典起、山野 尚子、上垣 浩一（産総研関西）
○Atsuyoshi NAKAYAMA, Norioki KAWASAKI, Naoko YAMANO, Koichi Uegaki (AIST)

【目的】ポリ乳酸ステレオコンプレックス(Sc)は高い融点と優れた結晶性を持つバイオベースポリマーとして研究されている。しかしながら、Sc 化により生分解性は大きく低下してしまう。一般にコポリマー化すると生分解性が向上することが知られており、コポリマー化による結晶性の低下がその主な理由と考えられる。そのため、乳酸コポリマーを含む Sc では生分解性が向上することが予想され、昨年度本大会にて想定した結果となることを報告した。しかしながら、コポリマー化すると Sc の高融点、高結晶性が犠牲になり、この優れた特徴を生かすことができない。そこで分子鎖構造が乳酸と類似したグリコール酸を用いてコポリマー化し、Sc が本来持つ優れた熱的性質を維持しつつ、生分解性を改善することを試みた。
【方法】L-乳酸コポリマーはラクチドとグリコリドとの開環共重合により各種組成のものを合成した。Sc は L 体コポリマーと D 体ホモポリマーを等重量ずつクロロホルム溶液としてから混合し、溶媒キャスト法にてフィルムとして得た。Sc 生成の確認は DSC による熱分析で行った。生分解性の評価は各種加水分解試験、酵素分解試験等により行い、水溶性成分、残存試料の分析により評価した。
【結果】グリコール酸系コポリマーでの Sc 形成は他の長鎖ヒドロキシ酸系コポリマーの場合と比べて幅広い組成で確認された。また、Sc の融点は短時間熱処理するとキャストフィルムでの融点に比べて上昇し、ホモポリマー(PLLA)の Sc とあまり変わらない高い融点を示した。このことはグリコール酸が乳酸と同じ鎖長を持つため結晶の欠陥を生じないということ、しかしながら、S 配置のメチル基が連続することによる結晶化能を持たないため積極的な結晶化は起こらず熱処理によってはじめて結晶化が促進されるということ、の 2 つの相反する性質を持つことを示しており、グリコール酸コポリマーの Sc が PLLA/PDLA の Pseudo-SC 状態にあるといえる。コポリマーの Sc の 70℃蒸留水中での加水分解試験ではグリコール酸含率が高くなるほど高い加水分解性を示すが、グリコール酸含率がわずか 5%であっても 1 週間で 15%以上が分解し、元のポリ乳酸(PLLA)を越える速い加水分解性を示した。37℃蒸留水での長期加水分解試験でも同様の傾向が確認された。プロテネース K による酵素加水分解試験の場合、グリコール酸含率 10%以下では Sc 化により生分解は抑制されるが、20%の場合は Sc 化されても良好な生分解性を示した。非酵素的な加水分解試験の場合と結果がやや異なったのは、非酵素加水分解では作用部位が L-、D-乳酸、及びグリコール酸のエステル結合全てであるのに対し、プロテネース K の場合は L-乳酸部位にのみ活性を持つことに帰因すると考えている。

biomass, biomaterial, glycolic acid

講演番号：3B33p07
講演日時、会場：3 月 28 日 15:16～ B 校舎 33 会場

生分解の ON/OFF を切り替え可能にしたポリマー系ナノコンポジットの開発
Novel biodegradable polymer nanocomposite with an on/off switch function of biodegradation
○安藤 仁、中山 敦好、山野 尚子、川崎 典起、上垣 浩一（産総研関西）
○ Hitoshi ANDO, Atsuyoshi NAKAYAMA, Naoko YAMANO, Norioki KAWASAKI, Kouichi UEGAKI (AIST)

【目的】生分解性ポリマーを汎用用途向けのポリマーとして利用するためには、生分解性を制御し、安定性を高めることが求められる。しかし、生分解性ポリマーは保管中や使用中でも随時、微生物などの作用を受け、生分解が進行して劣化する。そのため、これら生分解性ポリマーは、使用中は微生物などによる作用を受けずに汎用ポリマーと同等の機能を維持し、さらに廃棄後は速やかに分解される「生分解の ON/OFF 切り替え機能」を有することが望ましい。我々は生分解性ポリマーに抗菌性を付与することで生分解を制御できる新たな技術について検討し、光照射によって抗菌性が発現するポリマー系ナノコンポジットを昨年度大会で報告した[1)]。本報告では、光照射によって抗菌性を制御できるポリマー系ナノコンポジットの生分解性について検討した。
【方法】生分解性ポリマーはε-カプロラクトンと L-ラクチドの組成比を 80/10 として、テトラフェニルスズを開始剤とした開環重合法により合成した。合成したコポリマーに可視光応答型の酸化チタンを混合し、溶媒キャスト法によりコンポジットフィルムを作製した。コンポジットフィルムの生分解性を微生物由来リパーゼによる酵素分解と土壌分解試験を用いて評価した。
【結果】光照射下（蛍光灯 8000 lux）と暗所下（0.5 lux）で酵素分解試験を 4 日間おこない、比較した結果、酸化チタン濃度 0.5 wt%のコンポジットフィルムでは、暗所下に比べ光照射下での生分解が 20%以上抑制された。次に、光照射と暗所を 12 h 毎に切り替えて試験したところ、酸化チタン濃度が増加するにつれて生分解が抑制され、また試験期間が経過するのに従って分解率に差が生じた。これらの結果から、コンポジットフィルムの生分解は、常に光を照射し続けなくても抑制されることが明らかとなった。また、土壌表面で太陽光に曝露して試験した場合、コンポジットフィルムは 7 日目以降から生分解が抑制され、14 日目では酸化チタンを含まないフィルムに比べて 10%以上、21 日目では 17%以上分解率に差が生じた。一方、土壌表面で遮光した場合は酸化チタン濃度に関わらず、すべてのフィルムで生分解に明確な差は認められなかった。コンポジットフィルムを土壌中に埋設しても土壌表面で遮光した場合と同様の傾向が見られた。これらの結果から、生分解性ポリマーに低濃度の酸化チタンをコンポジット化するだけで、光照射によって生分解が抑制され、遮光することで生分解が進行する、生分解の ON/OFF 切り替え機能を付与することに成功した。

1）日本農芸化学会 2014 年度大会講演要旨集, 2A01p22（2014）

biodegradation, nanocomposite, titanium dioxide

講演番号：3B33p08
講演日時、会場：3 月 28 日 15:27～ B 校舎 33 会場

卵殻膜によるチロシナーゼ活性阻害とその応用

Inhibition of tyrosinase activity by egg shell membrane and its application.

○谷藤 尚貴、田中 美樹、小西 那奈、田原 早央利（米子高専）
○NAOKI TANIFUJI, MIKI TANAKA, NANA KONISHI, SAORI TABARA (NIT, Yonago College)

卵は殻を割らなければ中身が常温で数日間腐らない事実から，我々はこれまでに「卵殻が卵の中身を腐敗から守る機能は，他の対象物を守る機能として応用ができる」と考え，卵殻の中でも内側にある皮の部分である卵殻膜を有効利用する様々な応用法を検討している．本発表では，食品の劣化防止剤へ応用できる新しいリサイクル手法を開発した成果について報告する．

我々は劣化の著しい青果の中でも加工した果肉において変色による劣化の速く、加工品を市場に出しにくいアボカドに注目し，この品質の保持に卵殻膜を役立てるための検討を行った．まず，アボカドを加工して得られた果肉切片に生じる褐変を卵殻膜の被覆によって抑制させることに成功した．これは卵殻膜が有する化学物質を吸着する性質が，アボカド果肉表面で生じるメラニン等の有色成分を果肉から卵殻膜へ移動させることにより生じた現象であることを吸収スペクトルおよび拡散反射スペクトルから明らかにした．また，卵殻膜の吸着特性は添加物を追加する作用としても利用できるため，あらかじめ食品色素水溶液に浸漬して色素を吸着させた卵殻膜を用いて，アボカド果肉に対し同様のパッチテストを行ったところ，一部の色素を添加した膜については果肉の劣化は更に抑制された．この中で色素の分子構造の似た緑色 3 号と青色 1 号を吸着させた膜を用いた試験の結果を比較することで，青色 1 号では劣化抑制効果が無く，緑色 3 号では劣化抑制効果が見られたため，2 つの分子の構造の違いであるフェノール性水酸基の有無がアボカド果肉の劣化を抑制に効いていると予想して，着色に影響しているチロシナーゼ活性に関する阻害試験を行ったところ，緑色 3 号の水溶液がチロシナーゼ活性を有していた．この知見をもとに，他の食品色素等の添加物のチロシナーゼ活性阻害についても検討を行ったところ，予想通りフェノール性水酸基が酵素活性の阻害に作用していることが明らかとなり，先のパッチテストの結果との相関が見られた．次に卵殻膜が示す劣化抑制に関する機能を明らかにするために，殻から丁寧にとりだした卵殻膜を SEM で観測したところ，これまでに報告例の無い表面構造が観測され，これは物理刺激や水洗で剥がれ落ちる層であることが分かった．この成分について水で抽出を行い，この成分についてもチロシナーゼ活性阻害試験を行うと，明確な阻害活性が確認された．これらの結果から，今回卵殻膜をアボカド果肉へ被覆することで得られた果肉の劣化が抑制された現象は，卵殻膜が着色に関与する化学成分を吸着する性質と卵殻膜の成分にチロシナーゼ活性阻害を示す成分に由来した現象であることと，その作用は卵殻膜が添加物を吸着作用により添加物を蓄えて，それを放出する働きによって膜が示す劣化抑制作用を強められることが明らかとなった．

egg shell menbrane, tyrosinase inhibition, avocado

講演番号：3B33p09
講演日時、会場：3 月 28 日 15:38～ B 校舎 33 会場

熱特性に優れた新規フェニル基導入型微生物ポリエステルの合成

Biosynthesis and Thermal Characterization of Polyhydroxyalkanoates Bearing Phenyl Groups in Side Chains

○水野 匠詞、柘植 丈治（東工大院・総理工）
○Shoji MIZUNO, Takeharu TSUGE (Tokyo Tech)

【目的】

微生物により生合成可能なポリヒドロキシアルカン酸 (PHA) は再生可能資源であるバイオマスから合成でき、生分解性能を有している。この点から、PHA は石油由来プラスチックに代わる高分子材料として注目されている。しかしながら、代表的な PHA である poly(3-hydroxybutyrate) [P(3HB)] はガラス転移温度 (T_g) が 4 °C と室温以下であるため、二次結晶化により脆化することが知られている。一方で、PHA 合成細菌に種々の前駆体を添加して培養することで、PHA 側鎖に中鎖長の炭化水素、多重結合やフェニル基などを導入し、多様な物性を発現させることができる。

そこで本研究では、3-hydroxy-3-phenylpropionate (3H3PhP) または 3-hydroxy-4-phenylbutyrate (3H4PhB) のような側鎖にフェニル基を有するモノマーを PHA に導入することで、PHA の熱的特性を向上させることを目的とした。

【方法】

遺伝子工学的手法により、PHA 重合酵素 PhaC の欠損株である *Ralstonia eutropha* PHB^{-}4 株に、*Pseudomonas* sp.61-3 由来の PHA 重合酵素 PhaC1$_{Ps}$ と *R. eutropha* H16 由来のモノマー供給酵素 PhaAB$_{Re}$ の遺伝子を導入した *Re* PHB^{-}4/pBBR1"C1$_{Ps}$AB$_{Re}$ を作製した。培養の際、3H3PhP または 3H4PhB ユニットの前駆体となる脂肪酸を添加することで、フェニル基を導入した PHA 共重合体の生合成を試み、合成された PHA の熱的特性評価を行った。

【結果と考察】

Re PHB-4/pBBR1"C1$_{Ps}$AB$_{Re}$ を cinnamic acid (CA)および 3-hydroxy-3-phenylpropionate (3H3PhP) を添加して培養することで、3H3PhP を 4～12 mol%含有した PHA を合成した。また、4-phenylbutyrate (4PhB) を添加して培養した際に、3H4PhB を 7～14 mol%含有した PHA を合成した。今までに 3H3PhP 含有 PHA の合成が報告されていなかったが、本研究では基質特異性が幅広いことで知られている PhaC1$_{Ps}$ を用いたことで、3H3PhP 含有 PHA の合成に初めて成功した。次に、CA および 3H3PhP を添加することで得られた 3H3PhP 含有 PHA の熱的性質を解析した。P(3HB)ホモポリマーの T_g が 7.9 °C であったのに対して、4.1 または 8.9 mol% 3H3PhP を含む PHA の T_g は、それぞれ 10.7 と 14.6 °C であった。この結果から、側鎖にフェニル基を導入することで PHA 分子鎖の運動性が変化し、T_g が上昇することが示唆された。

polyhydroxyalkanoates, phenyl group, thermal properties

講演番号：3B33p10
講演日時、会場：3 月 28 日 15:49～ B 校舎 33 会場

バイオイメージングを応用した炭化水素生産微細藻類が生産する脂肪酸の簡易評価系の検討

A study of the simple evaluation system applying bioimaging of fatty acids produced by microalgae

○大城 龍之助、池松 真也（沖縄高専・専・生資工）
○Ryunosuke OSHIRO, Shinya IKEMATSU (ONCT)

【目的】

多くの微細藻類は体内に脂質を生産することが知られており,その中でも *Botryococcus* 等が生産する炭化水素は,燃料として使用可能であることから新たなエネルギー源としての研究がなされている。一方で産業的に実用化するには微細藻類の成長速度や脂質生産能,コスト等の問題があり,脂質生産能に優れた微細藻類のスクリーニングが世界中でなされている。脂質生産能を評価する方法としては様々な方法があるが,評価可能量に培養し,抽出,脂質量の測定まで行うには約 3～4 週間程が必要となる.そのため,脂質生産能評価を迅速に行うことは高脂質生産能を有する微細藻類の探索を行う上で非常に大きなアドバンテージとなる.そこで,本研究では少量の藻体を用いて迅速かつ簡易に藻体が含有する脂質をバイオイメージング技術を用いて定量する系の開発を検討した。

【方法・結果】

沖縄工業高等専門学校周辺の河川から採取したサンプルを,寒天希釈法により単離した。単離後 AF-6 液体培地が分注されたガラスねじロビンで 25℃,蛍光灯下で培養を行い,単離した 5 株の微細藻類にはそれぞれアルファベットを割り振りａ株,ｂ株,ｃ株,ｄ株,ｅ株とし,脂質簡易定量の対象とした。次にこれらの微細藻をナイルレッドで染色し,プレパラートを作成,蛍光顕微鏡にて検鏡し画像撮影を行った。その画像をもとに画像処理ソフトウェアを用いてナイルレッドに染色された部分のみの定量化を行った。また,簡易評価法の信頼性を検討するため,サンプルから tert-ブチルメチルエーテル法により粗脂肪を抽出,定量し,簡易定量結果との比較を行った。

簡易定量の結果,ａ株,ｂ株,ｃ株,ｄ株,ｅ株が細胞 1 個あたりで生産する脂質はそれぞれ 280.22pl/cell, 281.28pl/cell, 318.69pl/cell, 114.76pl/cell, 187.25pl/cell となった。粗脂肪定量では,それぞれ 30.66pl/cell, 0.27pl/cell, 133.16pl/cell, 16.6pl/cell, 6.36pl/cell となった。両値の相関をグラフにして求めたところ,相関係数 R^2=0.3 であった。これは,本簡易定量法の脂質量予測ファクターとして,脂質の蛍光強度が含まれていないこと,群体を形成する株に関しては群体ごとに脂質生産状態が異なることが大きな要因だと考えられる。これらの要素を考慮して脂質量を予測することにより実際の粗脂肪量と簡易定量値の相関を高め,簡易定量系による粗脂肪量の予測が可能だと考えた。

microalgae, hydrocarbon, evaluation

講演番号：3B33p11
講演日時、会場：3 月 28 日 16:10～ B 校舎 33 会場

竹バイオマスのバイオリファイナリーの研究

Study of bamboo biomass biorefinery

○新井 一斗[1]、椎葉 究[1]、幾竹 美奈子[1]、平木 純[2]、内園 浩幸[2]、吉田 周平[2]([1]東京電機大学、[2]JNC 株式会社)

○Kazuto ARAI[1], Kiwamu SHIIBA[1], Minako IKUTAKE[1], Jun HIRAKI[2], Hiroyuki UCHIZONO[2], Syuhei YOSHIDA[2] ([1]Tokyo Denki Univ., [2]JNC Corp.)

竹はイネ科に属していて、国内では大量の繁茂が環境問題を引き起こすほどバイオマスとして多く存在しており、成長が２～３年と早く、リグニンが木質と比較して少ない点から、バイオ資源として注目されている。実際、竹からバイオエタノール原料として研究が行われ、JNC(株)ではパイロットプラントも動き始めている。しかしながら、硫酸や高アルカリを用いるようなエタノール発酵前の前処理と糖化処理については、生産コスト高や廃液処理、残渣処理などの環境的な課題もある。更に、効率的なエタノール化技術も求められている。本研究では、竹を高温と圧力により処理することにより、ヘミセルロースの加水分解物（ＢＯＳ）を採取し、有価物成分として回収したのち、その残渣から強酸や強塩基を用いることなくホロセルロース部分を抽出・糖化しバイオエタノールを生産する方法について検討した。

（方法）

- 孟宗竹の粗粉砕物を水洗し、圧力と高温(120℃、150℃、180℃、5 分)により撹拌処理後、吸引ろ過し、分離したろ液をヘミセルロース分解物（BOS）とした。
- BOS 中の成分の抗酸化性を DPPH 法により求めた。
- その残渣は H_2O_2+NaOH を用いたアルカリ性過酸化水素前処理の後、植物細胞壁崩壊酵素（セルラーゼオノズカ、ヤクルト薬品工業）で処理し、遠心分離により水溶液(CBS)を回収した。
- CBS を凍結乾燥させ粉末状にした後培地調製し、海洋水から分離した *Candida parapsilosis*（5 炭糖ｴﾀﾉｰﾙ化選抜株）を用いてエタノールを生産した。
- 液体サンプルの糖組成は 2N TFA、固体サンプルは 72%硫酸により加水分解後、HPLC（LiChroCART ｶﾗﾑ、RI）により測定した。

（結果）

・高温で処理するほど抗酸化性が強く、アスコルビン酸換算で 1078AAkmol 程の抗酸化能をもつ BOS 成分が得られた。

・BOS 回収後の残渣から糖を抽出し、海洋から新たに単離した酵母を用いてエタノールを生産した。

・竹を高温処理した後の BOS 抽出残渣から、強酸や強塩基を用いることなくホロセルロース部分を抽出・糖化しバイオエタノールを生産する効率的な方法を見出した。

本研究は、平成 25 年度 JST 研究成果展開事業 A-step の研究課題の一環である。

bamboo, ethanol, refinery

講演番号：3B33p12
講演日時、会場：3 月 28 日 16:21～ B 校舎 33 会場

竹由来フェルラ酸を含むオリゴ糖のマウス血しょうコレステロールと腸内細菌叢に与える影響

Effects of bamboo oligosaccharides containing ferulic acids on mice plasma cholesterol via intestinal microbial activities

○椎葉 究[1]、前村 美樹[2]、新倉 大貴[2]、内園 浩幸[3]、吉田 周平[3]、平木 純[3]、岡田 ひとみ[4]、齋藤 香織[4]、西村 裕志[4]、渡辺 隆司[4]([1]東京電機大学　理工学研究科、[2]東京電機大学　理工学部、[3]JNC 株式会社　水俣研究所、[4]京都大学生存圏研究所)

○kiwamu shiiba[1], Miki Maemura[2], Daiki Niikura[2], Hiroyuki Uchizono[3], Syuhei Yoshida[3], Jun Hiraki[3], Hitomi Okada[4], Kaori Saito[4], Hiroshi Nishimura[4], Takashi Watanabe[4] ([1]Tokyo Denki Univ. Department of Science and Engineering, [2]Tokyo Denki Univ. School of Science and Engineering, [3]JNC Corporation, [4]Kyoto Univ. RISH)

（目的・方法）竹は成長が早く、リグニンが木質と比較して少ない点から、バイオエタノール原料として注目され、そのﾊﾟｲﾛｯﾄﾌﾟﾗﾝﾄ(JNC㈱)も建設されているが、現状の低コスト化技術が求められている。竹から付加価値の高い成分をバイオリファイナリーとして調製することでバイオエネルギー生産コストを下げる研究において、孟宗竹の熱水抽出成分（BOS）成分に含まれる抗酸化成分の特性（構造分析）と高脂肪食を摂食したマウスの血しょうコレステロール上昇の抑制効果、腸内細菌叢の影響とその脂質代謝改善の機構解明に関して研究を行った。

・孟宗竹を機械的に粗粉砕した粉砕物を水洗し、ｵｰﾄｸﾚｰﾌﾞにより圧力(121℃、10 分)処理後、植物細胞壁破壊酵素により酵素処理（50℃、2 時間）した。その後、遠心分離した上清を凍結乾燥して竹オリゴ糖（BOS）とした。

・BOS の成分を shephadexLH-20 で分画し、抗酸化性が最も強い画分から糖ｱﾌｨﾆﾃｨｰｶﾗﾑ（Cellufine PB、JNC㈱）により糖成分を精製し、HPLC 等により精製し MS 分析した。

・自由摂食できる環境下で、高脂肪食のみ（コントロール区）と高脂肪食に BOS を 5%混合した食餌（テスト区）をマウス（オス各６匹）に１か月間与え、その間、体重測定、採血及び糞を採取した。

・採血後、血しょう中の全コレステロール濃度を測定（Cholesterol Ester Quantitaion Kit）した。

・採取した糞は、ｐH 測定および全細菌の DNA 抽出し、２種類の GC タグ付きプライマー（ﾕﾆﾊﾞｰｻﾙおよび乳酸菌のﾌﾟﾗｲﾏｰ）を用いて PCR で増幅、DGGE 法により菌叢を比較した。DGGE 電気泳動結果は DGGE 画像解析 PC ﾌﾟﾛｸﾞﾗﾑにより similarity 検索した。

・糞中の低級脂肪酸量を GLC により、糞中の脂質は Bligh－Dyer 法により抽出後 TLC により分析した。また、その脂質画分の全コレステロール値を上記ｷｯﾄにより測定した。

（結果・考察）・BOS 中の抗酸化成分はフェルラ酸を含むキシログルカンのオリゴ糖が主成分であった。

・体重の増加は、テスト区でやや低かったものの有意差はなかった。血しょうコレステロール値は、コントロール区では高脂肪食摂食により明らかに増加したが、テスト区では、その増加率は有意に低く、血中コレステロール上昇抑制効果が認められた。

・糞ｐH はテスト区で低くプロピオン酸が多く検出された。DGGE 結果は、コントロール区で高脂肪食投与により腸内菌叢が大きく変化したが、テスト区では、菌叢を維持している傾向があった。乳酸菌でも同様の傾向があった。テスト区で糞中にコレステロールの排泄が認められた。

Bamboo, Biorefinary, Bioproduct

講演番号：3B33p13
講演日時、会場：3 月 28 日 16:32～ B 校舎 33 会場

Aurantiochytrium 生産スクアレンによる抗炎症効果の検証

Evaluation of the anti-inflammatory effects of Squalene derived from *Aurantiochytrium*.

○坂巻 碧[1]、本嶋 秀子[2]、VILLAREAL Myra[2,3]、吉田 昌樹[3]、出村 幹英[3]、渡邊 信[3]、礒田 博子[2,3] ([1]筑波大学生命環境、[2]筑波大学北アフリカ研究センター、[3]筑波大学生命環境系)
○ Midori SAKAMAKI[1], Hideko MOTOJIMA[2], Myra VILLAREAL[2,3], Masaki YOSHIDA[3], Mikihide DEMURA[3], Makoto WATANABE[3], Hiroko ISODA[2,3] ([1]School of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba, [2]ARENA, [3]Faculty of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba)

【研究目的】

近年、食物と競合せず、エネルギー生産能力が高い藻類バイオマスへの関心が高まっている。藻類の一種である *Aurantiochytrium* は、付加価値の高いオイルであるスクアレンを大量に生産する。スクアレンは、抗酸化作用、鎮痛作用、殺菌作用、浸透作用、細胞賦活作用、保湿効果があるとされ、化粧品や健康サプリメントなどに用いられている。しかし現在、スクアレンは絶滅危惧種である深海サメから主に抽出されており、*Aurantiochytrium* が産生するスクアレンにも上記のような付加価値を見出せれば、深海サメ生産スクアレンの代替資源となり、安定的供給も可能になる。

本研究では、マクロファージを用いて、スクアレンの抗炎症効果を検証した。炎症反応は、外界から侵入する病原菌や異物などに対する生体防御機構において重要な役割を担っているが、異常な炎症反応は組織障害を引き起こし、様々な疾病を誘導する。

そこで本研究では、起炎時にマクロファージから産生される NO や炎症性サイトカインといった炎症性物質を指標として、*Aurantiochytrium* 産生スクアレンの抗炎症効果を検証した。

【方法】

藻類の一種である *Aurantiochytrium* から抽出・精製したスクアレンを、細胞毒性の無い範囲でマクロファージ様細胞である RAW264.7 細胞に 24 時間処理後、炎症刺激として LPS を 12 時間処理した。その後培地上清を回収し、産生された NO 量・炎症性サイトカイン TNF-α の産生量を測定した。

【結果・考察】

スクアレンを添加した RAW264.7 細胞に LPS 刺激を与え、その後産生された NO 量を測定したところ、スクアレン処理をした細胞はスクアレン処理をしていない細胞に比べて、有意に NO 産生量が減少した。これらのことから、スクアレンには炎症を抑える効果があり、スクアレンにはバイオマスエネルギーとしての有用性だけではなく、医薬品としての付加価値も見出せる可能性があると考えられる。

現在 Real-time PCR によって、スクアレンによる TNF-α の遺伝子発現制御を検証している。今後は、より網羅的な炎症性サイトカイン産生量の変動を検証し、さらに作用機序の解明を行う予定である。

inflammatory, *Aurantiochytrium*, Squalene

講演番号：3B33p14
講演日時、会場：3 月 28 日 16:43～ B 校舎 33 会場

青森ヒバ油の乳化と抗菌活性

Emulsification and antibacterial activity of Aomori Hiba oil

○山田 陸、小川 俊介、下村 美文（東京工科大学）
○Riku YAMADA, Shunsuke OGAWA, Mifumi SHIMOMURA (Tokyo University of Technology)

【背景・目的】

現在私たちは地球温暖化、資源枯渇、環境汚染等の問題を抱えている。それらの環境問題を解決するために、再生可能資源の利用を促進する必要がある。その一つにバイオマス資源の有効活用が挙げられる。そこで本研究では青森ヒバ廃材に 0.01%含まれ、強い抗菌活性を持つヒノキチオールに注目した。ヒノキチオールの抽出過程に発生するヒバ油にもヒノキチオールが含有される。希少なヒバ油の利用効率の向上を目指してヒバ油の乳化を提案し、ヒバ油の乳化溶液の抗菌性の有無を評価した。

【実験方法】

ヒバ油は水に対して難溶性であるため、乳化剤として水中油滴型で HLP 値が比較的高い Polysorbate20 を用いて乳化を行った。乳化方法は食用ミルサー、マグネティックスターラ、シェーカを用いた、3 種類の方法で行った。乳化状態と乳化安定性の評価を、顕微鏡観察で油滴粒径を経時的に測定した。さらに、*E. coli* K-12 を用いた抗菌性試験を行い、ハロー法によって乳化溶液の抗菌性を確認した。

【結果・考察】

3 種類の方法で、ヒバ油が乳化できた。ヒバ油の乳化状態評価では、図に示したように食用ミルサーによるものが最も粒径が小さく、乳化後 8 時間平均で 4.52 μm であり安定していた。マグネティックスターラ、シェーカでは、乳化溶液の分離がみられ、経時的に粒径が大きくなることが確認された。3 種類の乳化溶液でプレート上に阻止帯が観察され、大腸菌に対する抗菌性が確認された。

【結論】

ヒバ油の乳化により抗菌成分の希釈が可能となり、乳化による物理的容積が増加し、利用効率を上げることができる。油滴粒径をさらに小さくすることができれば霧化技術への応用やジェット噴霧などが可能となり、実用的な応用範囲が広がると考えられる。

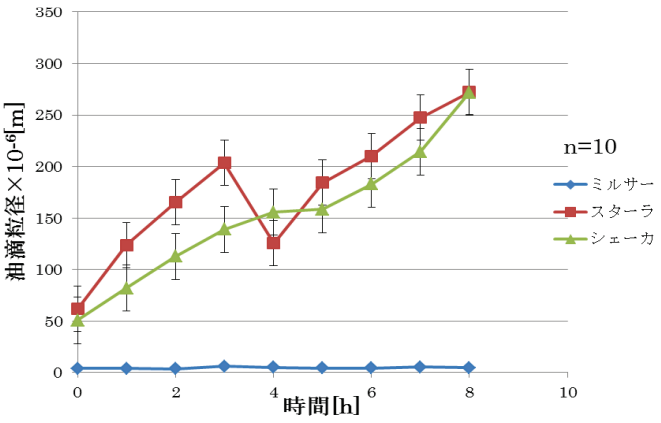


図　油滴粒径の経時的変化

Aomori Hiba oil, Emulsification, antibacterial activity

講演番号：3B33p15
講演日時、会場：3 月 28 日 16:54～ B 校舎 33 会場

茶葉から抽出した カテキン溶液による抗菌性試験

Antimicrobial activity of Catechin extracted from tea-leaf

○小川 俊介、山田 陸、下村 美文（東京工科大学）
○Shunsuke OGAWA, Riku YAMADA, Mifumi SIMOMURA (Tokyo University of Technology)

【背景・目的】

環境問題対策の一つとしてバイオマスの利活用が注目されている。バイオマス資源は堆肥や燃料などに利用されているが、その利用率は十分でない。そこで本研究では、大量に発生する未利用の食品廃棄物性バイオマスからカテキンを抽出し、将来的にはカテキンの抗菌活性を活かして、マスクや衛生キャップなどの衛生用品に有効利用することを目指している。今回は、茶葉中に含まれている成分とカテキンの抽出、抗菌性の確認を行った。

【実験】

茶葉から表 1 に示す条件で 80℃のお湯で抽出した溶液と高温高圧により抽出した溶液から凍結乾燥技術で溶液内の成分を採取した。採取した物質の量を目視で確認した。また、抽出溶液に含まれている成分の分析を行った。茶葉から抽出した溶液を用いて、JIS L 1902「繊維製品の抗菌性試験方法及び抗菌効果」を参考に細菌に対するハローの有無によって評価する定性試験（ハロー法）を行った。細菌は黄色ブドウ球菌及び大腸菌を用いた。また、ハロー法では抗菌活性が顕著に確認できない可能性を考慮し、抽出した溶液に菌液を加えたものと菌液のみの培地の濁度を測定し、その値から対数増殖曲線を作成した。作成した曲線より増殖遅延時間を算出し、生存率を求める増殖遅延曲線法を行った。

表 1 抽出溶液の作成

	温度	抽出時間	気圧
溶液①	80℃	3 分間	1 気圧
溶液②	120℃	20 分間	2 気圧
溶液③（溶液①の再抽出）	80℃	3 分間	1 気圧
溶液④（溶液②の再抽出）	120℃	20 分間	2 気圧

表 2 ハローの形成

	黄色ブドウ球菌	抽出時間
溶液①	有	無
溶液②	有	無
溶液③（溶液①の再抽出）	有	無
溶液④（溶液②の再抽出）	有	無

【結果・考察】

茶葉からの抽出溶液は、高温高圧での抽出の方が 80℃のお湯での抽出よりも多量の成分を得ることができた。ハロー法、増殖遅延曲線法によりカテキンの抗菌性の試験を行った。その結果を表 2 に示す。抽出溶液は黄色ブドウ球菌に対して抗菌活性を確認できたが、大腸菌には抗菌活性を確認できなかった。このことから、本研究で作製したカテ+キン溶液は抗菌活性に必要な濃度に達さなかったと考えられる。また、茶葉より抽出した溶液が黄色ブドウ球菌に対して抗菌活性を示したのは、カテキン以外の茶葉に含まれている別の成分が抗菌作用を示していると推測した。

tea-leaf, Catechin, Antimicrobial activity

講演番号：3B33p16
講演日時、会場：3 月 28 日 17:15～ B 校舎 33 会場

こんにゃく飛粉加水分解物が乳酸菌やビフィズス菌の増殖に及ぼす影響

Effect of Tobiko protein hydrolysates on the growth of lactic acid bacteria and bifidobacteria

○田中 雅幸、臼井 祥悟、高屋 朋彰（小山高専物質）
○Masayuki TANAKA, Syogo USUI, Tomoaki KOUYA (NIT, Oyama Col.)

【背景・目的】こんにゃく製造時に副産物として生じるこんにゃく飛粉は，年間 4000 トン程度排出される農産廃棄物である．飛粉は多くのタンパク質や糖質を含んでいる一方，えぐみや刺激臭があることなどから有効な利用法が確立されておらず，焼却による CO_2 の増加，焼却コスト増による農家への負担，悪臭などが問題となっている．本研究では，こんにゃく飛粉の有効利用を目的として，乳酸菌やビフィズス菌に対するこんにゃく飛粉加水分解物の添加の影響を評価した．

【方法】湿熱滅菌処理（121℃，20 min）した飛粉と 50 mM phosphate buffer (pH 7.0)を 5:100(w/v)で混合し, プロテアーゼ 2 種類をそれぞれ飛粉タンパク質あたり 1%(w/w)の濃度となるように添加した．40℃，3 h の酵素反応後に酵素失活処理（95℃，10 min）を行い，さらに遠心分離（20,000×*g*， 10 min）により上澄み液を回収した．上澄み液は限外ろ過膜（MWCO 10,000）を用いて高分子成分を除去し，こんにゃく飛粉加水分解物を調製した．

乳酸菌やビフィズス菌に対するこんにゃく飛粉加水分解物の添加の検討は，以下の培養条件で行った．乳酸菌として *Lactobacillus rhamnosus* や *Lactobacillus plantarum*，ビフィズス菌として *Bifidobacterium bifidum* NBRC 100015^T を用いた．培地として，MRS 培地（pH 6.5）を用いた．初期濁度を O. D. $_{660nm}$ ≒0.1，初期基質濃度を 10 g/L，こんにゃく飛粉加水分解物または 50 mM phosphate buffer (pH 7.0)（コントロール）を培地あたりそれぞれ 1%，5%，10%添加し，乳酸菌は 24 h、ビフィズス菌は 48 h の嫌気培養を行った．増殖性の評価は，濁度法(O. D. $_{660nm}$)で行った．

【結果】こんにゃく飛粉加水分解物を培地あたり 10%添加した場合，*Lactobacillus rhamnosus* の濁度は O. D. $_{660nm}$ ＝5.58 となり，コントロール（O. D. $_{660nm}$ ＝5.33）と比較して有意に増殖した．また，*Lactobacillus plantarum* の濁度はこんにゃく飛粉加水分解物を培地あたり 10%添加した場合，に O. D. $_{660nm}$ ＝4.93 となり，コントロール（O. D. $_{660nm}$ ＝4.71）と比較して有意に増殖した．現在，こんにゃく飛粉加水分解物をエタノール不溶性画分と可溶性画分に分画し，乳酸菌やビフィズス菌に対する添加の影響を評価している．

Tobiko, lactic acid bacteria, bifidobacteria

講演番号：3B33p17
講演日時、会場：3 月 28 日 17:26～ B 校舎 33 会場

アカテガニ消化管からのバイオマス分解細菌の単離

Isolation and properties of biomass-degrading bacteria from the alimentary canal of *Chiromantes haematocheir*

○裏 佳織[1]、北原 隆志[2]、柳井 清治[2]、三宅 克英[1] ([1]石川県大資源研、[2]石川県大環境)
○ Kaori URA[1], Takashi KITAHARA[2], Kiyoharu YANAI[2], Katsuhide MIYAKE[1] ([1]Res.Inst.Biorechnol.,Ishikawa Pref. Univ, [2]Dept.Environ.Sci.,Ishikawa Pref. Univ)

日本の海岸に面した森林、いわゆる水辺林では甲殻類のアカテガニやヨコエビなどの生息がよく観察される。これらの甲殻類は落ち葉や木片などのバイオマスを食料として利用する。アカテガニ類は森林物質循環と河口域の生態系（特に魚類生産）の中で重要な役割を果たしているが、そのバイオマス分解メカニズムはほとんどわかっていない。本研究ではアカテガニを材料として、バイオマス分解システムを明らかにし、バイオマス有効利用技術への応用をはかることを目的としている。これらのアカテガニ類は木や葉といったバイオマスのみで生育可能であり、強力なバイオマス分解能力を持っている可能性が高い。本研究ではアカテカニの消化管からバイオマス中のセルロースやリグニンを分解できる細菌群の単離を試みた。

加賀地方の水辺林に生息するアカテガニから新規バイオマス分解細菌を単離、解析するため実験を行ったところ、アカテガニの消化管から 15 種類の細菌が得られた。これらの菌を同定するために 16S rRNA の塩基配列を決定し、同定を行った。バイオマス分解活性を持つ菌のスクリーニングは、セルラーゼ活性に関しては CMC（カルボキシメチルセルロース)-congo-Red 法、リグニン分解活性に関しては Remazol Brilliant Blue R(RBBR)法とリグニン含有 LB プレートを用いてプレート上でのハロの形成を指標として一次スクリーニングを行った。バイオマス分解活性結果として、得られた菌株中 14 株がセルロース分解活性を示し、TLC で活性を調べたところ、いずれの場合も CMC はグルコースにまで分解され、またセルラーゼは分泌型酵素である可能性が示唆された。一方でリグニンの分解に関しては RBBR 法では 5 株、リグニン含有 LB プレートで 6 株ハロの形成を確認することが出来た。また、RBBR プレートとリグニン含有 LB プレートでの分解実験においては CMC を添加したプレートでは添加していないものと比べハロがよりはっきり大きくなることが明らかになった。このことは、単離菌のリグニン分解活性は CMC（セルロース）の存在によって誘導されている可能性があることを示している。また、CMC やリグニンの存在によって菌体がプレート面に強く接着する傾向が観察されており、この現象がリグニンの分解活性に影響を与えているのではないかと考えている。現在、最も強くリグニン分解活性を示しているものは *Bacillus licheniformis*、及び *Shewanella xiamenensis* と推定される単離菌株である。今後、トランスポゾンを利用した変異株を取得し、分解酵素遺伝子のスクリーニングを行っていく予定である。

biomass, lignin degradation, cellulase

講演番号：3B33p18
講演日時、会場：3 月 28 日 17:37～ B 校舎 33 会場

リュウキュウアイおよびタデアイからの沈澱藍の製造に関わる微生物

Microorganisms Related to Production of Indigo Paste from *Strobilanthes cusia* and *Persicaria tinctoria*

○常盤 豊[1]、世嘉良 宏斗[2]、市場 俊雄[2]([1]グリーン・プロダクツ・ラボラトリー有限会社、[2]沖縄県工業技術センター)
○Yutaka TOKIWA[1], Hiroto YOKARYO[2], Toshio ICHIBA[2] ([1]Green Products Laboratory Ltd., [2]Okinawa Industrial Technology Center)

【目的】琉球地域の藍染料は、リュウキュウアイの新鮮な葉と幹を浸漬して短期間発酵させた液に消石灰を加えて、染料成分（主としてインジゴ）を回収した沈澱藍（泥藍）である。一方、徳島県や北海道の藍染料は、タデアイの乾燥葉を長期間（約 3 カ月）発酵して製造される蒅（スクモ）である。今回、天然の藍染料として、短期間に製造できて経済的評価の高い沈澱藍に注目して、屋外にてリュウキュウアイおよびタデアイから沈澱藍の製造を行い、そこに関わる微生物について検討した。なお、研究室における小スケールの沈澱藍の調製につては、既に報告した[1)]。

【方法】リュウキュウアイおよびタデアイは、2013 年の夏期に収穫したものを用いた。リュウキュウアイおよびタデアイを水に 2 日～3 日間、重しを載せて浸漬した。その抽出液に消石灰を 0.1%程度添加して、激しく撹拌しながら染料成分を回収・濃縮して沈澱藍を製造した。
微生物の特性を調べるために、グルコース、酵母エキス、ペプトン等を含む寒天平板培地を pH 7 および pH10 に調整して用いた。リュウキュウアイとタデアイの浸漬液および沈澱藍を滅菌水で希釈し、寒天平板に 0.1 ml 塗布して 30 ℃で数日間培養した後、形成されたコロニーを計数することにより検討した。分離した微生物については、16SrRNA 遺伝子解析による簡易同定を行った。

【結果と考察】浸漬液の微生物数(c.f.u./ml) は、リュウキュウアイを 52 時間浸漬した場合、pH 7 および pH10 でそれぞれ 4.9×10^4、9.4×10^4 であった。また、タデアイを 52 時間浸漬した場合、pH 7 および pH10 でそれぞれ 4.5×10^7、2.4×10^4 であった。

リュウキュウアイを 52 時間浸漬した抽出液からは、*Enterococcus* 属、*Lactococcus* 属、*Weissella* 属などに属する乳酸菌を分離することができた。沈澱藍からは *Enterococcus* 属の他に *Proteiniclasticum* 属や *Clostridium* 属などに属する微生物を分離することができた。一方、タデアイの抽出液からは、浸漬 52 時間で *Oceanobacillus* 属、*Lactobacillus* 属などに属する乳酸菌を分離することができた。また、タデアイの沈澱藍からは、*Enterococcus* 属や *Cedecea* 属に属する微生物を分離することができた。これら沈澱藍の微生物については、スクモおよび藍染め液の微生物との関係を考察した。

1）常盤、世嘉良、市場、沖縄県工業技術センター平成 23 年度研究報告書、14, 11-16 (2012)

indigo paste, *Strobilanthes cusia*, *Enterococcus*

講演番号：3B33p19
講演日時、会場：3 月 28 日 17:48～ B 校舎 33 会場

稲わらの高効率糖化酵素の探索と解析

Screening and characterization of highly efficient saccharification enzymes for rice straw using locust guts and symbiotic microorganisms

○小野田 絵理[1]、藤井 桃子[1]、札 達央[1]、金子 愛唯[1]、三浦(鈴木) 彩子[1]、相澤 朋子[2]、野口 章[1]、長谷川 功[1] ([1]日大、生資科、[2]日大、短大)
○Eri ONODA[1], Momoko FUJII[1], Tatsuo FUDA[1], Ayu KANAKO[1], Ayako MIURA(SUZUKI)[1], Tomoko AIZAWA[2], Akira NOGUCHI[1], Isao HASEGAWA[1] ([1]College of Bioresource Sciences,Nihon Univ., [2]Junior College Department of Bioresource Science,Nihon Univ.)

わが国のエネルギー問題における課題は、化石燃料や原発依存から脱却して、地域資源を活用した安全・安定した地域ごとのエネルギー生産技術の開発である。

その一つに、バイオエタノール生産があり、海外では、その原料としてサトウキビやトウモロコシ・ソルゴーなどの食料資源が使われている。わが国では間伐材などの利用が検討されているが、バイオエネルギーの原料としては、未利用有機物資源の利活用が重要と考えている。

わが国では、年間 9 百数十万トンが発生している稲わらは、その殆どは焼却か土壌鋤込みされている未利用のバイオマス資源である。

一方、安全な食料生産のため、農耕地の汚染物質の除去、すなわちファイトレメディエーション技術の開発が進められており、中でも、Cd については、すでに日本各地で Cd 高吸収性イネを用いたファイトレメディエーションの実証試験が行われている。

しかし、収穫される Cd 高濃度稲わらは焼却処理されているが、ファイトレメディエーション技術の普及や農用地の経済生産性面から稲わらの有効利用が重要であると考え、バイオエタノールへの転換技術の開発を検討している。

稲わらのバイオエタノールへの転換には、まず糖化し、さらに発酵する必要があるが、稲わらは市販の酵素では糖化され難いが、その理由として稲わらのセルロース・ヘミセルロースは、高濃度に含有されるケイ素が絡み合った複雑な構造をしているためと推定した。そこで、演者らは、イネを主食とするイナゴの腸内にこの仮説を解決する Key があると考えて、本研究を行っている。

イナゴの腸をすり潰したものを粗酵素として稲わら粉砕物の糖化を検討したところ、高効率で還元糖が生成した。また、この粗酵素の至適温度は 50℃、至適 pH が 7.0 であった。このことから、イナゴの腸内には高い稲わら分解能をもつ腸内酵素あるいは腸内細菌の存在が示唆された。

そこで、イナゴの腸内粗酵素を硫安分画によりタンパク質の粗分画を行い、その分画試料の稲わら分解能の測定を行った結果、硫安濃度が 40%、50%のとき高い分解活性が得られた。その画分をゲル濾過クロマトグラフィーによりタンパク質の精製を行い、特に活性の高かったフラクションの SDS-PAGE から、分子量は約 30～50KDa であった。また、ザイモグラムや LC/MS/MS 分析によって活性の高い酵素の同定を行った。

次に、集積培養によって高効率で稲わらを分解する細菌の探索を行った。集積培養後、数種類の基質を用いて単離を行った結果、895 株の菌株を単離し、さらに、そこからセルラーゼ、キシラナーゼ活性をもつ菌株を選抜した。その中からキシラナーゼ活性の高い細菌の同定を行った。

rice straw, enzymatic saccharification, locust guts

講演番号：3B33p20
講演日時、会場：3 月 28 日 17:59～ B 校舎 33 会場

オイルパーム幹伐採後の貯蔵中にみられる糖蓄積現象の解明

Elucidation of the Sugar Accumulation in Sap of Oil Palm Trunks Felled

○平林 凌太朗[1]、小杉 昭彦[2]、荒井 隆益[2]、韮澤 悟[2]、山川 隆[1] ([1]東京大学 農学生命、[2]国際農林水産業研究センター)
○Ryotaro HIRABAYASHI[1], Akihiko KOSUGI[2], Takamitsu ARAI[2], Satoru NIRASAWA[2], Takashi YAMAKAWA[1] ([1]The Univ of Tokyo, [2]Japan International Research Center for Agricultural Sciences)

背景・目的　パームオイルは食品や化成品原料として用途も広く、世界の植物油脂のなかで使用量は最大である。マレーシア、インドネシアでは大規模なプランテーション開発が行われ、両国を合わせて世界の 87%前後のパーム油を生産している。一方で、オイルパーム樹には経済的生産樹齢があるために 20～25 年前後で一斉に伐採し、再植される。生じる伐採廃樹木は、マレーシア国内だけでも年間約 3000 万本となり、その有効な利用法の開発と共に環境負荷を与えない対策が強く求められている。この樹幹の大きな特徴は、大量の樹液を含んでいることである。この樹液の糖成分を分析したところ、グルコース、フラクトース、スクロースが非常に多い優良な糖液であることが明らかとなった(１)。またオイルパーム樹の伐採後、貯蔵中に糖含量が大きく増加するという、熟成現象ともいえる変化がみられた(２)。糖含量は最大 16%近くまで上昇し、適当な熟成期間を経ることによって、この樹幹がサトウキビに相当する原料になる可能性がある。本研究では、貯蔵期間中に高発現しているとみられる澱粉分解酵素に着目し、そのタンパク質レベルでの特徴化を行なった。

方法と結果　20 年を経過するオイルパーム伐採幹３本を使用した。伐採したパーム幹をマレーシア理科大学内に貯蔵し、貯蔵後 0～360 時間におけるデンプン分解経路に関わる遺伝子群の発現変化を qRT-PCR によって定量化し、高い発現が見られた３つの α-アミラーゼを単離した。中でも最も高い発現が見られた α-アミラーゼ(EgAmy1)の遺伝子クローニングを行なった。EgAmy1 は分子量 48kDa、シグナルシーケンスを持つ分泌タンパク質と考えられた。またナツメヤシの α-アミラーゼと 92%の高い相同性を示した。パーム幹中の EgAmy1 の酵素学的特徴を検討するため、大腸菌 BL21 を用いて EgAmy1 を精製調製した結果、EgAmy1 は典型的なα-アミラーゼ活性を示したが、その比活性は比較的低い値を示した。伐採パーム幹には樹液の他に澱粉も含まれており、貯蔵中に EgAmy1 等の澱粉分解酵素が働き糖蓄積に寄与していることが考えられる。本発表では EgAmy1 の酵素特徴化とともに、EgAmy1 抗体を用いたパーム幹貯蔵中の発現に関しても報告する。

(1) Kosugi A et al., Ethanol and lactic acid production using sap squeezed from old oil palm trunks felled for replanting. J Biosci Bioeng, 2010, 110:322-325.
(2) Yamada H et al., Old oil palm trunk: A promising source of sugars for bioethanol production. Biomass and Bioenergy, 2010, 34:1608–1613.

Oil palm, Sugar accumulation, Amylase

講演番号：3C31a01
講演日時、会場：3 月 28 日 09:00～ C 校舎 31 会場

細胞性粘菌の化学生態学的解析
Chemical and ecological analysis of the cellular slime moulds

○齊藤 佑美子[1]、宮崎 早紀[1]、Bartlem Derek[2]、齊藤 玉緒[3]（[1]上智大院・理工、[2]北海道大・農、[3]上智大学・理工）
○Yumiko Saito[1], Saki Miyazaki[1], Derek Bartlem[2], Tamao Saito[3] ([1]Graduate School of Science and Technology, Sophia Univ., [2]Faculty of Agriculture, Hokkaido Univ., [3]Faculty of Science and Technology, Sophia Univ.)

【目的】土壌微生物である細胞性粘菌と線虫は、生息域が同じで餌を共有するなど、相互に密接に関係している。そこで、農作物に寄生し、全世界での被害額が年間 US$1250 億にも上っている植物寄生性線虫 *Meloidogyne*（ネコブセンチュウ）に着目した。そして、細胞性粘菌とどのような相互関係があるのかを解析するため、細胞性粘菌が *Meloidogyne* に与える影響の定量的解析法の確立を目指した。また、農薬への応用を視野に入れ、細胞性粘菌・線虫・植物の 3 種の相互関係を検討した。

【方法】まず、飢餓処理した細胞性粘菌を、phytagel プレートの端にのせた Filter 上で発生させ、子実体形成後にそれを取り除き、プレートの中央に *Meloidogyne* を播種した。24 時間後に *Meloidogyne* の歩いた跡を画像解析ソフトで定量化し、Filter 側とその反対側のどちらに多く線虫が移動したか比較した。その結果、Filter を通過した細胞性粘菌の分泌物が *Meloidogyne* の忌避行動を引き起こすことが判明したため、粘菌分泌物を回収し、それを使用した場合の *Meloidogyne* の挙動と植物感染への影響を検討した。挙動解析では、分泌物を Filter に浸み込ませ、上記と同様の実験系で解析を行った。植物感染実験では、培地上に植物（ミヤコグサ *Lotus japonics*）を 3 つ等間隔に並べ、一番端の植物の隣に分泌物を浸み込ませた Filter を置いた。そして、それぞれ植物の根の先端から 1 cm の所に *Meloidogyne* を播種した。48 時間後に植物に感染した *Meloidogyne* の数をカウントし、それぞれの植物に感染した線虫の総数に対する各植物に感染した線虫の数の割合を算出した。また、分泌物が植物の成長に与える影響を検証するため、根の隣に分泌物を浸み込ませた Filter を置いた場合の植物の根の伸長速度を観測した。

【結果】挙動解析では、*Meloidogyne* が粘菌分泌物の反対側の領域に多く動いていた。つまり、分泌物は *Meloidogyne* の忌避行動を引き起こすことが示された。植物感染実験では、*Meloidogyne* は分泌物から離れた植物に集中して感染するという結果が得られた。このことから、細胞性粘菌の分泌物は、線虫が近くの植物に感染するのを抑制することが出来ると考えられる。分泌物が植物に与える影響の検証では、分泌物を隣に置いた場合に植物の根の成長阻害が見られた。しかし、この植物を新しい培地に移すと正常に根が伸長したため、分泌物は植物を枯らせてしまうわけではないことも判明した。今後は、分泌物中に含まれる *Meloidogyne* に影響を与えている化学物質の同定を進めていきたい。

Dictyostelium discoideum, *Meloidogyne*, chemical ecology

講演番号：3C31a02
講演日時、会場：3 月 28 日 09:11～ C 校舎 31 会場

植物成長促進細菌のウキクサへの共付着とその効果

Coadhesion to Lemna minor of plant growth promoting bacteria and its effect

○山川 祐介[1]、菅原 雅之[2,3]、三輪 京子[1,3]、森川 正章[1,3]（[1]北大・環境科学、[2]東北大・生命科学、[3]JST-ALCA）
○Yusuke Yamakawa[1], Masayuki Sugawara[2,3], kyoko Miwa[1,3], Masaaki Morikawa[1,3] ([1]Hokudai Univ., [2]Tohoku Univ., [3]JST-ALCA)

【背景と目的】
当研究室では、水生植物ウキクサと微生物の共生関係に着目した環境浄化システムの開発を行っている。これまでに、北海道大学付属植物園の池水に自生するウキクサより植物成長促進能及び環境汚染物質分解能を有した、*Acinetobacter calcoaceticus* P23 株の単離に成功した(Yamaga *et al.* 2010)。しかしながら、ウキクサへの P23 株の付着持続性についてはまだ十分とは言えない。一方、池水中には、P23 株の付着を誘導する環境微生物の存在が示唆されている。そこで本研究では、P23 株の付着安定性向上を最終目標として、池水より P23 株の付着能力向上に寄与する細菌を取得することを目的とした。
【方法】
ウキクサへ先に付着し、P23 株の付着を誘導する環境微生物が池水中に存在することが示唆された事から、まずは池水に無菌ウキクサを浮かべて早期付着する細菌群を単離した。次に、無菌ウキクサ 10 葉状体を被験細菌懸濁液に植えて光照射下で 4 時間培養し細菌を付着させた。そして、CFU（Colony Forming Unit）を指標としてその付着量を調べた。この際、ウキクサを根部と葉状体部に分離して別々に CFU を測定した。最後に、P23 株を共付着させ、CFU を指標に P23 株の付着能への影響を評価した。同時に、ウキクサ成長促進活性についても調べた。単離した細菌については、16S rRNA 遺伝子約 1200 塩基を解析することで同定を行った。
【結果】
P23 株は根に比べて葉状体に多く付着する特性を有している。そこで、根により多くの P23 株を付着させる目的で、早期に根に多く付着する細菌を 10 株選別した。それぞれ P23 株と共付着させた結果、P23 株の根への付着量を増加させる菌株と葉への初期付着量を増加させる 2 種類の *Pseudomonas* 属を取得する事が出来た。しかしながら、共付着による P23 株の付着量増加効果の持続性は低く、10 日後には P23 株単独の場合と同程度の付着量であった。また、ウキクサ成長促進活性についても、共付着と P23 株単独時における成長促進活性には差がなかった。以上の結果、今回、P23 株の初期付着を大幅に増加させる細菌を取得する事は出来たが、付着の持続性およびウキクサの成長促進活性を向上させる事は出来なかった。

Lemna minor, *Acinetobacter* sp. P23

講演番号：3C31a03
講演日時、会場：3 月 28 日 09:22～ C 校舎 31 会場

大気浄化型壁面緑化における土壌環境の解析

Analysis of soil environment in the green wall system which can purify air pollution

○久保田 謙三、天保 美咲、河目 裕介、西部 洋晴（大和ハウス工業）
○Kenzo KUBOTA, Misaki TEMPO, Yusuke KAWAME, Yosei NISHIBE (Daiwa House Industry)

【背景・目的】

近年、建築物の意匠性の向上や、条例等で定められている緑地面積の確保などを目的に、建築物の壁面に植栽を設ける「壁面緑化」の導入事例が増えている。壁面緑化技術にはいくつかの方式があり、フレームにプランターを掛けるものや、フェルトに土壌と植栽を抱かせるものなどが既に商品化されている。

著者らの研究グループでは、鋼製フレームに土壌を充填し、その土壌に植栽する方式の壁面緑化技術を開発してきた。この方式には、単に植栽のための土壌基盤を大きくとれるだけでなく、土壌に強制的に通気する機構を付与できるという特徴がある。通気によって植栽の根圏環境を改善すると共に、土壌をバイオフィルターのように取り扱うことで、大気汚染物質を浄化することが可能である。

これまでに、本方式の壁面緑化が自動車から排出される窒素酸化物（NOx）を低減できることを確認している。そこで本報告では、6 ヶ月間にわたって連続的に一般道の大気を通気した場合に、土壌中の環境がどのように変化するかについて解析することとした。

【方法】

壁面緑化の試験体は奈良市内の工業地域に設置した。試験体のサイズは断面積：10 ㎡×土壌厚：150 ㎜とし、このうち 4 ㎡分には通風機構を設けた（＝浄化部）。浄化部には、敷地に隣接する一般道（通行台数：約 1,400 台/日）から大気を導入した。通風量は約 90 ㎥/h、通気線速度は 40 ㎜/sec とした。また、試験体の土壌水分率がおおよそ 30%を下回らないように潅水量を調節した。1 ヶ月おきに浄化部および非浄化部から土壌を採取し、炭素、窒素、リン、カリウムなどの成分濃度、総細菌数、および物質循環に関わる微生物活性を評価した。測定期間は 2014 年 5 月～10 月までの 6 ヶ月間とした。

【結果】

各種成分濃度、総細菌数および物質循環に関わる微生物活性は、測定時期によって増減した。特に水溶性の成分に関しては潅水量の影響を受けやすいことが示唆された。浄化部と非浄化部で植栽の生育を比較すると、通気を行った浄化部の方が若干生育が良かったが、土壌中の各種成分濃度や総細菌数、微生物活性には顕著な差がなかった。これらの結果から、本試験のような条件で一般道の大気を通気すると植栽の生育が促進されるが、土壌中の各種成分濃度や微生物には大きな影響がないと考えられた。

Green wall, Air pollution

講演番号：3C31a04
講演日時、会場：3 月 28 日 09:33～ C 校舎 31 会場

自然界には存在しない物質がないと生きられない生物：新しい生物学的封じ込め法の開発

Organisms auxotrophic for unnatural compounds: a novel biocontainment system

○加藤 祐輔（農業生物資源研）
○Yusuke KATO (Natn Inst Agrobiol Sci)

自然界には存在しないアミノ酸を、栄養として摂取しなければ生きられない大腸菌を作出した。

遺伝子組換え技術の黎明期から、病原性や生態系への影響が大きい遺伝子をもつ組換え生物が、実験室の外に逃れることが懸念されていた。いったん、そのような生物が環境中に漏出すれば、自律的に増殖するので、復旧は困難である。近年、人工的に構築した大規模な遺伝回路をもつ異質な組換え生物を作出する合成生物学が急速に進歩しているため、この問題が再び大きく取り上げられるようになった[1]。他にも、病原性をもつ微生物や、適応性の高い外来生物など、環境中で無制限に増殖されては困る生物がある。

そこで、実験室の人工的な環境でしか生きられず、自然環境中では死滅するように生物をプログラムする「生物学的封じ込め法」の確立に期待が寄せられるようになった。これまでの研究から、理論的に最良の方法は「自然界には存在しない物質がなければ生きられないようにプログラムすること」とされている。

私達は、自然界には存在しない非天然アミノ酸によって、特定の標的遺伝子の発現を翻訳レベルでオン／オフ調節する「翻訳スイッチ」を開発してきた[2, 3]。この翻訳スイッチを応用し、非天然アミノ酸がないと生きられない生物の作出を試みた。大腸菌には、菌を殺す強い毒素の遺伝子と、その毒性を中和する抗毒素の遺伝子のペアをもつプラスミドが多く知られている。毒素コリシン E3 とその抗毒素イムノ E3 もそのひとつである[4]。私達は、イムノ E3 の遺伝子の発現を、翻訳スイッチによって調節するように改変した変異プラスミドを構築した。この変異により、イムノ E3 は、非天然アミノ酸が存在するときのみ発現する。この変異プラスミドをもつ大腸菌は、非天然アミノ酸を与えたときは、イムノ E3 が発現するので、コリシン E3 は解毒されて、生き残ることができた。しかし、非天然アミノ酸がないと、イムノ E3 は産生されず、大腸菌はコリシン E3 によって殺された。この技術は、新しい原理による理想形の生物学的封じ込め法のプラットフォームとして有望である。

［1］嘉幡久敬、岡崎明子「合成生物を競う」朝日新聞（朝刊 1-2 面）、2014 年 8 月 20 日
［2］2013、2014 年度本学会；Minaba & Kato (2014) *Appl. Environ. Microbiol.* **80**:1718
［3］Yanagisawa et al. (2008) *Chem. Biol.* **15**:1187
［4］Masaki & Ohta (1985) *J. Mol. Biol.* **182**:217

biocontainment, Escherichia coli, synthetic biology

講演番号：3C31a05
講演日時、会場：3 月 28 日 09:44～ C 校舎 31 会場

ミツバチ類の社会性行動とヒト社会の科学コミュニケーション＆理科教育.
Social behavior of honeybees and human science communication.
○笹川 浩美 [1,2] ([1] 跡見学園、[2] 科学技術館)
○Hiromi SASAGAWA[1,2] ([1]Atomi-Gakuenn, [2]JFS)

昆虫のミツバチ類は、仕事の転換・分業や高度な社会性行動が認められる。例えば、日本の固有種であるニホンミツバチの働き蜂は、寄生ダニに対して、噛んで取って捨てるという異個体間の衛生グルーミング行動が認められる。一方、セイヨウミツバチの働き蜂には、異個体の衛生グルーミングは認められるものの、寄生ダニに対しては、殆ど認められない。衛生グルーミング行動の仕組みを農芸化学的に解明し、社会性昆虫の環境適応戦力を考える。

昆虫類の研究成果をもとにして、ヒト社会の科学コミュニケーションプログラムを開発し、環境保全や震災復興を考える。

science communication, honeybee, human

講演番号：3C31a06
講演日時、会場：3 月 28 日 10:05～ C 校舎 31 会場

哺乳類シトクロム P450 モノオキシゲナーゼによるポリ塩化ビフェニルの毒性低下メカニズム

Mechanisms of toxicity reduction of polychlorinated biphenyls by mammalian cytochrome P450 monooxygenases

○見世 慎太朗[1]、加藤 晃[2]、伊藤 俊将[2]、山本 恵子[2]、乾 秀之[1,3]（[1]神戸大院農、[2]昭和薬科大、[3]神戸大遺伝子）
○Shintaro MISE[1], Akira KATO[2], Toshimasa Itoh[2], Keiko YAMAMOTO[2], Hideyuki INUI[1,3] ([1]Kobe Univ., [2]Showa Pharm., [3]Kobe univ. RCEG)

【はじめに】

ポリ塩化ビフェニル（PCB）は高い化学安定性と脂溶性を持つため、環境中で分解されにくく、食物連鎖を通して高濃度に蓄積することにより様々な生物種に悪影響を及ぼす可能性がある。一方、哺乳類の薬物代謝型シトクロム P450（P450 または CYP）モノオキシゲナーゼは一原子酸素添加反応を触媒する酵素であり、水酸化することで PCB の生体外への排出を促進し、解毒する。本研究では、毒性の高い 3 種の PCB、3,3',4,4'-テトラクロロビフェニル(CB77)、2,3',4,4',5-ペンタクロロビフェニル(CB118)、3,3',4,4',5-ペンタクロロビフェニル(CB126)のラット並びにヒト CYP1A1 による代謝能の違いについてそれらの 3 次元構造の比較を通して解明を試みた。

【方法】

ラットもしくはヒト *CYP1A1* 遺伝子を発現する組換え昆虫細胞由来のミクロソーム画分を用いて、CB77、CB118、CB126 と反応させ、代謝物の抽出後、誘導体化処理し、高分解能ガスクロマトグラフィー/高分解能マススペクトロメトリーにより代謝物の同定と定量を行った。次に、ヒト CYP1A2、の結晶構造を鋳型とするホモロジーモデリング法により構築したヒト CYP1A1 を用いて、SYBYL8.0 のアプリケーション Mutate Monomers を使ってラット CYP1A1 の 3D モデルを構築した。これら 3D モデルを用い CB77、CB118、CB126 のドッキング解析(Surflex Dock)を行い、それらの代謝能と比較した。

【結果と考察】

ラット CYP1A1 による CB77、CB118、CB126 の代謝試験において、NADPH の添加依存的に増加する代謝物が見られ、これらは水酸化代謝物と脱塩素水酸化代謝物であると同定した。一方、ヒト CYP1A1 による代謝物は CB77 においてのみ検出された。これら 2 つの P450 分子種のアミノ酸配列は 79%の相同性を有していることから基質結合ポケットを構成するアミノ酸は類似しているものと考えられたが、代謝物の種類・生成量に大きな差が見られた。これら P450 分子種と各 PCB 同族体とのドッキングモデルにより、基質結合ポケット内の PCB の配向性やヘム鉄との距離が近い配座の存在が代謝物の種類や生成量に影響することが明らかになった。本研究により、P450 による PCB の代謝メカニズムの構造的基盤が明らかになり、PCB のヒトにおける毒性低下に関する重要な知見が得られると考えられる。

PCB, P450, metabolism

講演番号：3C31a07
講演日時、会場：3 月 28 日 10:16～ C 校舎 31 会場

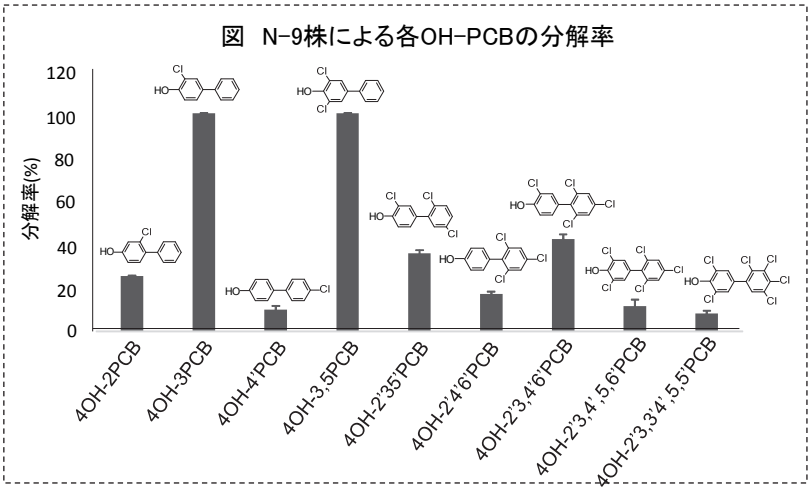
森林土壌から分離された水酸化 PCB 分解菌の特徴
Biodegradation of hydroxylated PCB by *Sphingomonas* sp.N-9 isolated from forest soil

○村田（水上 ） 里美[1,2]、榊原 風太[2]、倉俣 正人[2]、高木 和広[2] ([1]日本学術振興協会、[2]独立行政法人農業環境技術研究所)
○ Satomi MIZUKAMI-MURATA[1,2], Futa SAKAKIBARA[2], Masato KURAMATA[2], Kazuhiro TAKAGI[2] ([1]Japan Society for the Promotion of Science, [2]National Institute for Agro Environmental Sciences)

【目的】環境中におけるポリ塩化ビフェニル(PCB)は UV などの物理化学反応や生物の代謝反応によって水酸化 PCB(OH-PCB)に変換される。一部の OH-PCB は親化合物である PCB よりも毒性が強いことが報告されており、近年環境中の毒性が懸念されている。環境中の OH-PCB を分解する方法として微生物を用いた手法が期待されるが、OH-PCB を分解する微生物の分離報告はほとんどないのが実状である。そこで本研究では土壌中から OH-PCB 分解菌を単離し、OH-PCB の分解能を比較検討した。

【方法】農環研内の森林土壌を土壌・木炭還流法により集積培養し、寒天培地を用いて OH-PCB 分解菌を単離した。集積基質として 4-Hydroxy-3chlorobiphenyl (4OH-3PCB)を加えた無機塩培地 (0.5%酵母エキス添加)を用いた。OH-PCB と代謝物はアセトニトリルで抽出し UPLC-ESI-MS を用いて測定した。

【結果と考察】4OH-3PCB で 4 か月間集積培養を行い、*Sphingomonas sp.*N-9 株を分離した。N-9 株は 4OH-3PCB (10ppm)を環開裂・脱炭酸を行うことで、1 日で *m/z* 172.6 の代謝物を生成した。他の水酸化 PCB[4-Hydroxy-4'chlorobiphenyl (4OH-4'PCB)、4-Hydroxy-2-chlorobiphenyl (4OH-2PCB)、各 10ppm]を基質として 7 日間分解試験を行った場合、4OH-4'PCB は 10%、4OH-2PCB は 25.4%分解され、塩素と水酸基の位置により分解能が変わることが明らかになった。1Cl から 6Cl までの OH-PCB で分解試験を行った場合、分解能は塩素数に反比例し、特に 4Cl までの OH-PCB（4-Hydroxy-3，5-dichlorobiphenyl, 4-Hydroxy-2,3,5-trichlorobiphenyl, 4-Hydroxy-2' ,3,4' ,6'-tetrachlorobiphenyl）を 35.8-100%分解することができた。N-9 株は従来の PCB 分解菌で報告されているビフェニル代謝遺伝子 (bph A, D)を持ち、2Cl と 3Cl の PCB #8, #18, #33 (5ppm)をそれぞれ 39.9、15.9、88.2%分解することが明らかになった。



hydroxylated polychlorobiphenyl (OH-PCB), polychlorobiphenyl (PCB), *Sphingomonas*

講演番号：3C31a08
講演日時、会場：3 月 28 日 10:27～ C 校舎 31 会場

有機塩素系殺虫剤 gamma-hexachlorocyclohexane 分解細菌の分子育種

Molecular breeding of a bacterial strain degrading an organochlorine pesticide gamma-hexachlorocyclohexane

荷川取 佑記[1]、宮崎 亮[2]、古屋 佑磨[1]、大畑 智史[1]、大坪 嘉行[1]、○永田 裕二[1]、津田 雅孝[1] ([1]東北大院生命科、[2]産総研)
Yuki Nikawadori[1], Ryo Miyazaki[2], Yuma Furuya[1], Satoshi Ohhata[1], Yoshiyuki Ohtsubo[1], ○Yuji Nagata[1], Masataka Tsuda[1] ([1]Tohoku Univ., [2]AIST)

【背景・目的】有機塩素系殺虫剤γ-hexachlorocyclohexane (γ-HCH)は、深刻な環境汚染を引き起こしている人工の化学物質である。我々は、γ-HCH を分解資化する *Sphingobium japonicum* UT26 株のγ-HCH 分解代謝系の全貌を解明し、代謝に関わる一連の遺伝子群（*lin* genes)を同定した。本株においてγ-HCH は *linA* から *linF* の 6 つの遺伝子がコードする酵素によってβ-ketoadipate に変換される。β-ketoadipate は各種芳香族化合物代謝経路における共通の中間代謝産物であり、多くの環境細菌が本化学物質の代謝能を有するため、*linA* から *linF* の 6 つの遺伝子をβ-ketoadipate 分解細菌に導入し発現させることでγ-HCH 分解細菌が創出できると考えられる。一方、UT26 株を含む全ての既知γ-HCH 分解菌において、(i) これら遺伝子群はゲノム中に散在し、近傍に存在する挿入配列 IS*6100* の影響で遺伝的に不安定であり、γ-HCH 分解資化能の安定維持されない、(ii) γ-HCH 代謝過程において 2,5-dichlorophenol などの dead-end 産物を生じる、という問題点がある。そこで、本研究では、これら問題点を考慮した上で *linA* から *linF* をまとめた *lin* genes クラスターを作製し、これを IS*6100* を保持しない他菌株に導入することで安定かつ効率的にγ-HCH 分解資化能を発揮する組換え細菌株を分子育種することを目的とした。
【方法・結果および考察】構成的に発現するプロモーター支配下に *linA* から *linF* をクラスター化した人工オペロンを作製した。この際、γ-HCH に直接作用する LinA の活性が次段階に作用する LinB の活性より相対的に強いとより多くの dead-end 産物を生じることを考慮し、*linB* と *linA* をクラスターの先頭と最後尾にそれぞれ配置した。本クラスターをβ-ketoadipate 代謝能を有し IS*6100* を保持しない *Pseudomonas putida* KT2440 株、および UT26 株と類縁の複数のスフィンゴモナッド株に広宿主域性プラスミドを利用して導入した。その結果、全ての導入株でγ-HCH 分解活性は検出されたが、γ-HCH を唯一の炭素源として含む固体培地で明瞭なγ-HCH 分解資化能を示したのは、検討した株の中で UT26 株と最も類縁性の高い pentachlorophenol 分解細菌 *Sphingobium chlorophenolicum* L-1 株のみであった。本遺伝子組換え株は、人工的にγ-HCH 資化細菌を創出した初めての例である。現在、本株のγ-HCH 分解代謝および資化能について、天然の株との比較検討を行っている。一方、L-1 株以外で UT26 株と比較的類縁性の高い他のスフィンゴモナッド株では *lin* genes クラスターの導入でγ-HCH 資化菌とならなかったことから、UT26 株と L-1 株にγ-HCH 分解資化に必須な未知因子が存在する可能性が示唆された。

gamma-hexachlorocyclohexane, sphingomonads, xenobiotics

講演番号：3C31a09
講演日時、会場：3 月 28 日 10:38～ C 校舎 31 会場

微細藻類における金属ナノ粒子の取り込み・吸着解析

Analysis of uptake and surface-sorption behavior of dispersed metallic nanoparticles in microalgal cells

○三橋 弘明[1]、宮下 振一[2]、藤井 紳一郎[2]、安保 充[1]、高津 章子[2]、日置 昭治[2]、稲垣 和三[2]([1]明治大農・農化、[2]産総研・計測標準)
○Hiroaki Mitsuhashi[1], Shin-ichi Miyashita[2], Shin-ichiro Fujii[2], Mitsuru Abo[1], Akiko Takatsu[2], Akiharu Hioki[2], Kazumi Inagaki[2] ([1]Dep. Agric. Chem., Meiji Univ., [2]NMIJ/AIST)

【目的】

近年、ナノ粒子は材料や化粧品、農薬など様々な分野で応用されており、ナノテクノロジーの発達とともに応用製品、生産量は今後も増加することが予想される。一方で、環境に放出されることによる生態系への影響が懸念されている。現在、水圏環境における一次生産者である微細藻類に対する影響評価は研究が進められているが、影響発現のきっかけとなるナノ粒子の取り込み・吸着挙動については未解明な点が多い。そこで本研究では、微細藻類における金属ナノ粒子の影響を明らかにすることを目的として、ナノ粒子を曝露した藻類細胞の金属量に基づいた取り込み・吸着挙動解析を行った。

【方法】

微細藻類の培養と金属ナノ粒子の曝露

紅藻 *Galdieria sulphuraria* を改変 Allen 培地（pH 2.5）で振とう培養して前培養液を調整した後、培養細胞に Fe_3O_4、ZrO_2、Pt、Au ナノ粒子（粒子径 100 nm 以下）を 24 時間にわたって曝露した。また、ナノ粒子から溶出したイオンによる影響を区別するため、対応する金属塩による曝露実験も併せて実施した。細胞の増殖は、培養液の濁度と細胞数の計数結果によって確認した。

微細藻類と金属ナノ粒子の取り込み・吸着挙動解析

誘導結合プラズマ質量分析法（ICP-MS）を用いたアプローチとして、シングルパーティクル ICP-MS（sp-ICP-MS）による単一細胞解析、ならびに従来の ICP-MS によるバルク解析を行った。単一細胞解析では個々の曝露細胞の金属量による解析を行ったのに対して、バルク解析では多数の曝露細胞の総金属量の平均値による解析を行った。

【結果】

予備検討として、培養細胞に金属ナノ粒子および金属塩を終濃度 1.0 mg/L で曝露し、sp-ICP-MS による解析を行った結果、元素ごとに特徴的な傾向がみられた。Fe、Zr、Au では細胞によるナノ粒子の取り込み・吸着がみられ、特に Fe では塩と比べてナノ粒子の方がより顕著に取り込み・吸着される傾向があった。本発表では、上記の結果に加え、他の曝露濃度での解析結果やバルク解析結果についても報告する予定である。

nanoparticle, microalga, inductively-coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS)

講演番号：3C31a10
講演日時、会場：3 月 28 日 10:49～ C 校舎 31 会場

軽油分解菌 *Acinetobactor junii* M-2 の有する alkane 酸化酵素遺伝子の解析

Analysis of alkane oxygenase genes from the light oil-degrading bacterium *Acinetobactor junii* strain M-2

○村井 恵一[1]、山崎 周平[1]、玉置 雅彦[2]、村上 周一郎[1] ([1]明治大農・農化、[2]明治大農・黒川農場)
○Keiichi MURAI[1], Shuhei YAMAZAKI[1], Masahiko TAMAKI[2], Shuichiro MURAKAMI[1] ([1]Dep. of Agricultural Chemistry, Fac. of Agriculture, Meiji Univ., [2]Kurokawa Farm, Meiji Univ.)

【目的】これまでに我々は、鉱物油汚染土壌の浄化を目指して、花卉と根圏微生物を利用した低コスト・低環境負荷のファイトレメディエーションシステムの構築を目的に研究を進め、*Acinetobactor junii* M-2 を観賞用植物であるジニアが定植した軽油汚染土壌に投入することにより軽油除去効果が増強することを見出した。また、本菌が鉱物油の主成分である *n* -alkane の分解に必要である *alkB* および *almA* 遺伝子を持つことを明らかにした[1)]。そこで本研究では、*alkB* および *almA* 遺伝子の全長とその周辺領域について解析し、鎖長の異なる *n* -alkane の分解に際し、これらの中でどの遺伝子が発現しているかを解析した。

【方法】Total DNA を鋳型とした Genome-walking 法により、alkane 酸化酵素遺伝子 *alkBJ1*、*alkBJ2*、*almAJ1* の周辺領域の塩基配列を解析し、blastx を用いた database 検索を行うことで推定 ORF を決定した。軽油、*n* -alkane（炭素鎖長: C13、C24、C32）、およびコハク酸で培養した指数増殖前期の菌体から total RNA を抽出し、real-time PCR に供することにより *alkBJ1*、*alkBJ2*、および *almAJ1* 遺伝子の転写量を測定した。

【結果】*A. junii* M-2 の *alkBJ1*、*alkBJ2*、*almAJ1* 遺伝子の全長を含む 6.8－4.6 kbp の塩基配列を解析し、合計 18 個の推定 ORF を見出した。見出したこれらの ORF の配置や転写方向は、比較できる範囲において *Acinetobacter* sp. M-1 のものと全て同じであり、そのアミノ酸配列レベルの同一性は 92.3－69.9%であった。本菌を 1.2%軽油、および 0.6%各 *n* -alkane（炭素鎖長: C13、C24、C32）を唯一炭素源として培養した場合、総タンパク質量で最高 238 μg/mL-culture の生育が見られた。Real-time PCR 法で各 alkane 酸化酵素遺伝子の発現量を調べたところ、コハク酸で生育させた場合と比較して、*alkBJ1* 遺伝子は C13 では 1.1 倍、C24 では 5.6 倍、C32 では 2.0 倍の発現量を示した。一方、*alkBJ2* 遺伝子では、C13 でもっとも高い 8.3 倍、*almAJ1* 遺伝子では、C24 で 6.2 倍、C32 で 3.2 倍、発現量が増加した。このことより *alkBJ1* 遺伝子は中長鎖 alkane、*alkBJ2* 遺伝子は短鎖 alkane、また *almAJ1* 遺伝子は中長鎖から長鎖 alkane の分解に関わることが示唆された。さらに軽油で生育させた場合、*alkBJ1* 遺伝子は 18.1 倍、*alkBJ2* 遺伝子は 86.3 倍、*almAJ1* 遺伝子は 9.6 倍の発現量の増加が見られたことから、*alkBJ2* 遺伝子が軽油の分解において重要な役割を果たしていることが示唆された。

1）山崎ら、日本農芸化学会 2012 年大会講演要旨集、p. 159.

phytoremediation, alkane degradation, *Acinetobacter*

講演番号：3C31a11
講演日時、会場：3 月 28 日 11:10～ C 校舎 31 会場

超好熱菌 *Pyrobaculum islandicum* 由来のグルタミン酸脱水素酵素と高分子化補酵素を用いたバイオアノードの構築

Construction of bioanode using polymerized NAD$^+$ and glutamate dehydrogenase from hyperthermophilic archaeon, *Pyrobaculum islandicum*

○山崎 晃司[1]、坂元 博昭[1]、里村 武範[2,5]、櫻庭 春彦[3]、大島 敏久[4]、末 信一朗[1,2,5]（[1]福井大院・工・繊維、[2]福井大院・工・生物応用化、[3]香川大農、[4]大阪工大、[5]福井大学・生命セ）
○Koji YAMAZAKI[1], Hiroaki SAKAMOTO[1], Takenori SATOMURA[2,5], Haruhiko SAKURABA[3], Toshihisa OHSHIMA[4], Shin-ichiro SUYE[1,2,5] ([1]Dept. Front. Fib., Grad. Sch. Eng., Univ. Fukui, [2]Dept. Appl. Chem. Biotechnol., Grad. Sch. Eng., Univ. Fukui, [3]Kagawa Univ., [4]Osaka Inst. Tech., [5]Res. Edu. Prog. Life Sci., Univ. Fukui)

[緒言]

酵素電池は用いられる酵素の安定性の低さに起因する耐久性の低さと出力の低さが課題となっている。そこで本研究室では、超好熱菌由来の酵素を用いてカスケード反応を起こすことで電池の耐久性と出力の低さを解決することが考えられている。本研究では最終的には L-プロリンを燃料とした多酵素反応システムの構築を計画しており、本研究では、その中の L-グルタミン酸の酸化をアノード上で行うために *Pyrobaculum islandicum* 由来のグルタミン酸脱水素酵素(Pis-GDH)及び *Pyrococcus horikoshii* 由来の NADH 脱水素酵素活性を持つ PDH2 タンパク質を用いてバイオアノードを構築した。さらに、補酵素として使用される NAD$^+$をアルギン酸に固定化した高分子化補酵素(Alg-NAD$^+$)を用いてその電子伝達効率の向上を目指した。

[実験]

・高分子化補酵素の調製と Pis-GDH への動的パラメータの測定　アルギン酸のカルボキシル基を水溶性カルボジイミドを用いて活性化し、NAD$^+$をアルギン酸へ固定化した。Pis-GDH の Alg-NAD$^+$に対する K_m、V_{max} を求めた。

・Pis-GDH と PDH2 の 2 酵素反応の電気化学的評価　メディエーターとしてフェロセンカルボン酸を用いスクリーンプリント電極上でサイクリックボルタンメトリー(CV)を行うことで酵素反応を電気化学的に評価した。

[結果と考察]

GDH の Alg-NAD$^+$に対する K_m は 0.021 mM で遊離の NAD$^+$の 0.020 mM とほぼ同様の値が得られた。また、V_{max} は 9.2 μM/min で遊離 NAD$^+$で計測した際の 6.9 μM/min よりも高い値となった。酵素反応後の CV の結果では、基質の添加に伴ってフェロセンカルボン酸の酸化波の増大が見られ、メディエーターを介した酵素反応に伴う電子の授受が確認され、バイオ燃料電池としてグルタミン酸を基質とするバイオアノードの構築の可能性が示された。Alg-NAD$^+$と遊離 NAD$^+$についてフェロセンの酸化波の増大を比較したところ Alg-NAD$^+$のそれは遊離 Alg-NAD$^+$の約 1/2 であった。

biofuel cell, bioanode, polymerized NAD$^+$

講演番号：3C31a12
講演日時、会場：3 月 28 日 11:21～ C 校舎 31 会場

バイオ燃料電池のための超好熱性アーキア *Pyrobaculum aerophilum* 由来マルチ銅オキシダーゼを用いたバイオカソードの構築

Construction of biocathode for biofuel cell using multicopper oxidase from hyperthermophilic archaeon, *Pyrobaculum aerophilum*

○高村 映一郎[1]、内井 俊貴[2]、坂元 博昭[1,3]、里村 武範[2,3]、櫻庭 春彦[4]、大島 敏久[5]、末 信一朗[1,2,3] ([1]福井大院工・繊維、[2]福井大院工・生物応用化、[3]福井大・生命セ、[4]香川大農、[5]大阪工大)
○Eiichirou TAKAMURA[1], Toshiki UCHII[2], Hiroaki SAKAMOTO[1,3], Takenori SATOMURA[2,3], Haruhiko SAKURABA[4], Toshihisa OHSHIMA[5], Shin-ichiro SUYE[1,2,3] ([1]Dept. Front. Fib., Grad. Sch. Eng., Univ. Fukui, [2]Dept. Appl. Chem. Biotechnol., Grad. Sch. Eng., Univ. Fukui, [3]Res. Edu. Prog. Life Sci., Univ. Fukui, [4]Kagawa Univ., [5]Osaka Inst. Tech.)

［緒言］

酵素をエネルギー変換素子とするバイオ燃料電池は環境負荷のない次世代エネルギーの一つとして注目されている。しかし、酵素の長期安定性や電子移動効率の問題があるため、未だ実用化には至っていない。本研究では、長期間高出力に駆動可能なバイオ電池の実現を目指し、鍵となる電極界面の設計および開発を目的とする。我々は高い安定性を有する超好熱性アーキア *Pyrobaculum aerophilum* 由来マルチ銅オキシダーゼ(McoP)をバイオ電池のカソード触媒として用いた。そして、酵素-電極間の電子移動効率を高めるため、カーボンナノチューブ(CNT)とメディエータを一体化した複合材料を利用したバイオカソード電極の開発を行った。

［実験］

McoP は組換体より精製した。メディエータとなる ABTS(2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid))と CNT を混合し 48 時間撹拌することで CNT の分散を行なった。CNT 分散液を遠心分離した後、沈殿した CNT を回収する事により未反応の ABTS を除去し、CNT-ABTS 複合体を作製した。McoP と CNT-ABTS 複合体との混合液をカーボン電極上に滴下し風乾した後にナフィオンにより固定化した。電気化学測定は、作製した CNT-ABTS-McoP 修飾電極を作用極とする 3 電極系によりサイクリックボルタンメトリー(CV)で評価した。

［結果と考察］

得られた CNT-ABTS 複合体の CV から、ABTS に基づく酸化還元波が確認された。これは、CNT 表面へ ABTS が分子間相互作用により吸着しているためだと考えられる。基質となる酸素の飽和条件下で CNT-ABTS-McoP 修飾電極の特性を評価したところ、酸素の還元における本電極の電流密度は 90.7 $\mu A/cm^2$ であった。これは、McoP と ABTS のみを固定化した電極と比較すると約 9 倍の値を示した。今後、CNT と同じ表面構造を有し 2 次元平面構造であるグラフェンへの ABTS 修飾も検討を行い、グラフェン-ABTS と McoP を Layer-by-Layer 法により固定化することで、電流密度向上を目指す。

biofuel cell, biocathode, carbon nano material

講演番号：3C31a13
講演日時、会場：3 月 28 日 11:32～ C 校舎 31 会場

微生物を用いたヒドリドイオン水から水素の発生
Production of hydrogen from hydride ion water using a microbe

○馬越 唯斗[1]、及川 栄作[2]、及川 胤昭[3]([1]呉高専専攻科、[2]呉高専環境都市工、[3]（株）TAANE)
○Yuito UMAKOSHI[1], Eisaku OIKAWA[2], Taneaki OIKAWA[3] ([1]Advanced co. Kure College, [2]Kure College, [3]TAANE Co. Ltd.)

【目的・背景】アルカリ金属やアルカリ土類金属類が水素と結合した、水素化金属（水素化カルシウム CaH_2 等）を水に投入すると、金属は水酸化物($Ca(OH)_2$ 等)に変化し、水素はガス化すると同時に一部はヒドリド（H^-）イオンにイオン化することが知られている。この H^-イオンの水中での挙動は、H^-イオンを定量分析する方法が確立さていないために、ほとんど研究されていない。ここで、水素分子は、温度依存的に転換され、23℃の常温では、3:1 であるが、250℃以上では、イオン結合性のオルト型水素分子が 100%であり、-273℃では共有結合性のパラ型水素分子が 100%であることが知られている。このような中、(株)TAANE は 950℃の高温の水素雰囲気下(この場合の水素は 100%オルト型水素)で珊瑚カルシウムを焼成した上で、磁性化した、強還元性セラミックボール(CaH_2-CB)を開発した。この CaH_2-CB を水に投入すると、CaH_2-CB の N 極（CB の表面でイオン化した $2H^-$が N 極に引かれるため）から、2 分子の水素分子（$2H^-$イオンと水中の $2H^+$イオンがイオン結合で結び付いた分子）が発生する。ここで発生する水素分子は、また H^-イオンと H^+イオンにイオン化すると考えられる。1L 程度の水にこの CaH_2-CB を数個添加し、数時間放置した水は、H^-イオンと H^+イオンが平衡化した状態となり、H^-イオンが安定的に存在できると考えられている。このような水を(株)TAANE は電離水素水と呼んでいる。この電離水素水は植物に対して、延命作用、開花制御、根の発生、長寿遺伝子の活性化、ビタミン C やβ-カロテン生成能の増強を示すことが報告されている。本研究室では CaH_2-CB を用いて作製した電離水素水と微生物を用いて作製した電離水素水が同じ性質の電離水素水であるかを調べる研究を行っている。そこで、根粒菌のニトロゲナーゼ酵素は、窒素の無い状態で、水素イオンから水素を合成する活性を示すことが知られていることから、両電離水素水に根粒菌を添加することで水素濃度が検出されるかどうか調べる実験を行った。【方法】CaH_2-CB、CaH_2, TiH_2 および天然の電離水素水の生成に関与している微生物 *Novospingobium* sp. G 株を水に投入して、それぞれ電離水素水を作製した。この水に G 株と共存関係にあった根粒菌 *Bradyrhizobium* sp. O 株を添加した。その後、溶存水素濃度の変化を分析した。【結果】①CaH_2-CB、CaH_2、TiH_2 によりそれぞれ作製した電離水素水および G 株で作製した電離水素水に O 株を添加したところ、溶存水素濃度が検出された。②この水素発生は、O 株のニトロゲナーゼ酵素によって水素発生が生じたのではないかと推測された。

Hydrogen, Hydride, Rhizobium

講演番号：3C31a14
講演日時、会場：3 月 28 日 11:43～ C 校舎 31 会場

ヒドロゲナーゼの酸化的不活性化－速度論的解析に基づく回避戦略－
Kinetics Study on Oxidative Inactivation of Hydrogenase

○宋 慶盛[1]、西原 宏史[2,4]、樋口 芳樹[3,4]、北隅 優希[1]、白井 理[1,4]、加納 健司[1,4]（[1]京大院農、[2]茨城大農、[3]兵庫県大、[4]Crest）
○ Keisei SO[1], Hirofumi NISHIHARA[2,4], Yoshiki HIGUCHI[3,4], Yuki KITAZUMI[1], Osamu SHIRAI[1,4], Kenji KANO[1,4] ([1]Kyoto Univ., [2]Ibaraki Univ., [3]Univ. of Hyogo, [4]Crest)

【目的】
水素循環型社会の実現に向けて，世界を挙げてプロジェクトが進行している．その中でも，非白金水素酸化触媒の開拓が急務である．生体触媒のヒドロゲナーゼは Ni や Fe を活性中心に持つタンパク質であり，本要求を満たす新規触媒に該当する．本酵素は，ある面では白金を凌駕する触媒能を有することから，革新的な生物電気化学的エネルギー変換デバイス（バイオ電池）を創成できる．当該研究は国内外を問わず，盛んに推進されているが，ヒドロゲナーゼ固有の現象である「酸化的不活性化反応」が大きな弱点となり，実用化の目途は立っていない．本反応は過剰な酸化ストレスによる Ni の酸化反応（電子移動過程）と，水が Ni に配位する化学反応（非電子移動過程）で進行する．本研究では，*H. marinus* 由来膜結合型[NiFe]ヒドロゲナーゼ（MBH）を用いた酵素機能電極を作製し，MBH の水素酸化触媒能を触媒電流として定量的に評価した．電極電位（酸化力に相当）を制御した条件で，不活性化反応による触媒電流の減衰を速度論的に解析し，本反応機構の解明を目指した．
【方法】
三種類の酵素機能電極を作製した．電極 A：MBH を修飾した金電極，電極 B：MBH を修飾した多孔性炭素電極，電極 C：電極 A 上の MBH 同士を共有結合させ，酵素の分子運動を制限した電極．これらの酵素機能電極に様々な電位を印加し，水素酸化触媒電流の時間変化を追跡した．
【結果と考察】
電極への電位印加によって，「酸化的不活性化反応」に起因する触媒電流の減衰を確認した．この電流―時間曲線を，不活性化速度定数（k_I）と再活性化速度定数（k_A）を仮定した可逆一次反応で速度解析した．電極 A の解析結果から，k_I は電位に非依存，k_A は電位に依存したため，前者の律速段階は非電子移動過程，後者は電子移動過程であると結論付けた．そこで，非電子移動過程，つまり水が Ni に配位する化学反応に着目した．本反応は Ni への水の接近や，酵素の構造変化を伴うため，その反応速度は，電極表面の特性や酵素の分子運動などの影響を受けると考えた．そこで，電極 B・C の速度解析を行い，電極 A の結果と比較すると k_I のみが大幅に低下した．以上のように，我々は酵素周辺の環境改質が本反応の回避に繋がることを発見した[1)]．本知見は，ヒドロゲナーゼ利用における最重要課題である「酸化的不活性化」を回避する戦略の基礎となり，大きなブレークスルーである．

1) K. So *et. al.*, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **87** (11), 1177 (2014).

Hydrogenase, Biofuel cell, Kinetics

講演番号：3C31p01
講演日時、会場：3 月 28 日 14:00～ C 校舎 31 会場

微生物による難溶性リン酸塩溶解機構の解明　（１）リン酸カルシウム

Mechanism underlying bacterial solubilization of insoluble phosphate. (1) Calcium phosphate

○岡野 憲司、山栗 瑞希、清原 みなみ、本田 孝祐、大竹 久夫（阪大院工）
○Kenji OKANO, Mizuki YAMAKURI, Minami KIYOHARA, Kohsuke HONDA, Hisao OHTAKE (Osaka. Univ.)

【研究目的】

リンは生命に必要不可欠な元素であるが、良質なリン鉱石から枯渇が進む。採掘されたリン鉱石の約 80%は肥料の製造に用いられるが、畑土壌に施肥されたリンの約 80-90%は土壌中の金属イオンと結合し、作物が利用できない形態で固定される。持続的なリン利用、食糧生産に向け、土壌に固定化されたリンの有効利用が望まれる。一方、環境中には難溶性リン酸塩を可溶化する微生物の存在が知られているが、資化機構についての詳細な研究は殆どない。土壌において「どのような微生物が、どのような難溶性リン酸塩を、どのような機構で溶解するのか？」、これを明らかにし、微生物機能を人為的にコントロールすることで、リン利用効率の高い省リン型農業が実現できると考えられる。本研究では難溶性リン酸塩の一種である $Ca_5(OH)(PO_4)_3$（HAP、ヒドロキシアパタイト）の溶解メカニズムの解明を行うとともに、HAP 溶解微生物の簡便なスクリーニング方法について報告したい。

【実験方法および実験結果】

既知のリン酸カルシウム溶解株である、*Pseudomonas putida*、*Pseudomonas fluorescens*、*Enterobacter hormaechi*、*Pantoea agglomerans* を用いて HAP の溶解実験を行った。その結果 20 mM の HAP（P 換算で）より 3.8、2.7、8.0、3.6 mM のリンの溶出を確認した。いずれの株も酢酸、乳酸、コハク酸などの有機酸を生産しており、pH の低下が見られた。HAP の溶解が pH の低下によるものであるのか、あるいは有機酸のキレート効果との複合的なものによるものであるのかを確認するため、微生物を植菌せず、塩酸または乳酸・酢酸・ギ酸・クエン酸などの有機酸と HAP を混合し、pH を低下させた際のリンの溶出量についての調査を行った。それぞれの酸について pH とリンの溶出量の相関をプロットしたところ、いずれの酸においてもほぼ同様の溶解曲線が得られた。この結果から HAP の溶解は微生物の酸生成に伴う pH の低下という、極めて単純な機構で溶解することが明らかとなった。

この知見に基づき、pH を指標とした HAP 溶解株の簡便なスクリーニング法を開発した。土壌より単離した微生物を 96 ウェルプレートに植菌し、pH 指示薬であるブロモチモールブルーおよび、ブロモクレゾールパープルを添加する。培養液が緑色から黄色に変化した株を陽性株とした。これらの株の HAP 溶解性を調べたところ、いずれの株においても HAP の溶解が確認できた。また培養液の pH とリンの溶出量は、先に述べた溶解曲線にほぼフィットすることが明らかとなった。本手法は土壌中のリン酸カルシウム溶解に関わる微生物を同定する上で有効な手段となるであろう。

calcium phosphate solubilization, phosphate fixation, pH-dependent solubilization

講演番号：3C31p02
講演日時、会場：3 月 28 日 14:11～ C 校舎 31 会場

微生物による難溶性リン酸塩溶解機構の解明　（２）リン酸鉄

Mechanism underlying bacterial solubilization of insoluble phosphate. (2) Iron phosphate

○矢野 敦士、岡野 憲司、本田 孝祐、大竹 久夫（阪大院工）
○Atsushi YANO, Kenji OKANO, Kohsuke HONDA, Hisao OHTAKE (Osaka. Univ.)

【研究目的】

土壌にリンが固定化される際、鉄やアルミニウムはカルシウムと比べて高い固定能を有する。前演題において $Ca_5(OH)(PO_4)_3$、ヒドロキシアパタイトは pH 低下によって容易に溶解することを示した。一方、$FePO_4$ を用いて同様の実験を行った際には、殆どリンの溶出は見られなかった。従って $FePO_4$ の溶解には別の因子が関与していると考えられる。

土壌微生物は生育に必須な鉄イオンを獲得するための機構として、鉄のキレート剤であるシデロフォアを産生することが知られている。このようなキレート剤が $FePO_4$ に作用すると鉄と同時にリン酸も溶出すると考えられる。そこで演者らは「鉄のキレート剤は鉄の獲得機構に加え、リンの獲得機構としても働く」という仮説を立てた。この仮説を検証するため、本研究では土壌中より鉄のキレート剤を産生する微生物を単離し、これらの微生物が $FePO_4$ を溶解することを示したい。更に $FePO_4$ の溶解に起因する物質を特定することで、詳細な溶解機構を明らかにしたい。

【実験方法および実験結果】

Chrome azurol S (CAS)-Fe 複合体を含む寒天培地を用いたハローアッセイによりキレート剤産生微生物を単離し、$FePO_4$ 溶解能を評価した。リン酸鉄溶解能は 2 mM $FePO_4$ を単一のリン源、鉄源とする MOPS 液体培地で培養し、培養上清のリン酸濃度と鉄濃度を測定することで評価した。キレート剤産生株は $FePO_4$ 溶解能が高いのに対し（最大で約 1 mM の鉄が溶出）、非産生株は $FePO_4$ をほとんど溶解しなかった。このことより鉄のキレーターが $FePO_4$ に関与する可能性が示唆された。次にこれらの株において $FePO_4$ の溶解に起因する物質を特定するために、特に溶解能が高い 2 株に（*Enterobacter* sp.および *Klebsiella* sp.）について培養上清の有機酸解析を行った。その結果、両株ともクエン酸と酢酸が生産されていることが分かった。これらの有機酸の $FePO_4$ 溶解能を評価するため、培養上清と同濃度のクエン酸と酢酸を用いて $FePO_4$ の溶解実験を行った結果、クエン酸が溶解に関与することが明らかとなった。これはクエン酸のキレート効果によるものであると考えられる。しかし微生物を用いて溶解した場合と比較して鉄の溶出量が低いことから、有機酸以外の要因も関与していることが示唆された。培養上清に蛍光性の物質が存在することから鉄のキレート剤であるシデロフォアが産生されている可能性がある。そこで現在シデロフォアの精製とシデロフォアの $FePO_4$ 溶解への影響について検証を行っている。

iron phosphate solubilization, phosphate fixation, chelator

講演番号：3C31p03
講演日時、会場：3 月 28 日 14:22～ C 校舎 31 会場

微生物による難溶性リン酸塩溶解機構の解明　（３）リン酸アルミニウム

Mechanism underlying bacterial solubilization of insoluble phosphate. (3) Aluminum phosphate

○清原 みなみ、岡野 憲司、本田 孝祐、大竹 久夫 (阪大院工)
○Minami KIYOHARA, Kenji OKANO, Kosuke HONDA, Hisao OHTAKE (Osaka. Univ.)

【研究目的】

土壌にリンが固定化される際､鉄やアルミニウムはカルシウムと比べて高い固定能を有する｡$AlPO_4$ は $FePO_4$ と同様に pH の低下のみではほとんど溶解しない。従って $AlPO_4$ の溶解にも別の因子が関与していると考えられる。前演題において鉄のキレート剤が $FePO_4$ の溶解において重要であることを示した。鉄イオンと異なり、アルミニウムイオンは微生物の生育にとって不要であり、アルミニウムのキレート剤については研究がなされていない。しかしながら、シデロフォアなどの鉄のキレート剤は他の金属に対しても作用することが報告されており､微生物が産生するキレート剤は $AlPO_4$ の溶解においても重要な役割を担っている可能性がある。そこで演者らは「$AlPO_4$ も $FePO_4$ と同様、キレート剤によって溶解する」という仮説を立てた。この仮説を検証するため、本研究では土壌中よりアルミニウムのキレート剤を産生する微生物を単離し､これらの微生物が $AlPO_4$ を溶解することを示したい。更に $AlPO_4$ の溶解に起因する物質を特定することで、詳細な溶解機構を明らかにしたい。

【実験方法および実験結果】

Chrome azurol S (CAS)-Al 複合体を含む寒天培地を用いたハローアッセイにより、土壌からアルミニウムキレート剤産生株を単離した。単離した株について $AlPO_4$ 溶解能を評価した結果、$AlPO_4$ 溶解活性が高い株を複数獲得した。一方でキレート剤非産生株は $AlPO_4$ をほとんど溶解しなかった。このことより $FePO_4$ と同様、キレーターが $AlPO_4$ に関与する可能性が示唆された。特に溶解活性が高い株（*Pseudomonas protegens*）について $AlPO_4$ を単一リン源とする MOPS 培地で培養を行った結果、2 mM の $AlPO_4$ から 150 μM のリン酸の溶出が確認できた。この株の培養上清中の有機酸を HPLC により分析した結果、単一のピークが得られた。現在のところ未同定ではあるが、この化合物を分取し、$AlPO_4$ と混合したところ、$AlPO_4$ の溶解が確認できた。しかしながら、培養上清中の遊離リン酸濃度には至らなかった。このことから $AlPO_4$ 溶解には有機酸に加え、他の要因が関与していることが分かった。培養上清に UV を照射したところ蛍光を発したため、キレート剤の一種であるシデロフォアを生産している可能性が示唆された。未知の有機酸の LC-MS を用いた同定及び、培養上清からのシデロフォアの精製と $AlPO_4$ 溶解への関連について現在検討中である。また他の $AlPO_4$ 高溶解株についても同様に検討を行っている。

aluminum phosphate solubilization, phosphate fixation, chelator

講演番号：3C31p04
講演日時、会場：3 月 28 日 14:33～ C 校舎 31 会場

好酸性鉄酸化細菌の集積培養系と単離株を用いた廃電子基板のバイオリーチング効率の比較検討
Comparison of efficiency of printed circuit boards bioleaching using acidophilic iron-oxidizing bacterial enrichment culture and an isolated strain

○東條 ふゆみ[1]、大野谷 成美[1]、宮田 直幸[1]、梁 瑞録[1]、谷 幸則[2]、福島 淳[1] ([1]秋田県大、[2]静岡県大)
○Fuyumi TOJO[1], Narumi OONOYA[1], Naoyuki MIYATA[1], Ruilu Liang[1], Yukinori TANI[2], Jun FUKUSHIMA[1] ([1]Akita Pref. Univ., [2]Univ. of Shizuoka)

廃電子基板などの電子機器廃棄物からの有用金属の回収・再資源化技術の一つに、バイオリーチングがある。これまでに、環境水中から調製した好酸性鉄酸化細菌の集積培養系を用いて、既往研究と比較して 1/10 程度の Fe^{2+}添加量でも、廃電子基板を効率的にバイオリーチングできることを示した。本研究では、この集積培養から好酸性鉄酸化細菌を単離し、単離株と集積培養系による廃電子基板のバイオリーチング効率を比較検討した。

希釈した集積培養系を、0.3%ゲランガムまたは 10%寒天を含む TSB 平板培地(7 mM Fe^{2+}、1 mM 重金属混合液、pH2.2)に塗抹し、42℃で静置培養した。生じた鉄酸化細菌のコロニーを釣菌し、28～45℃で振とう培養し、*Sulfobacillus thermosulfidooxidans* NE106G 株を得た。

バイオリーチング試験では、まず 2 L 容量のジャーファーメンターに TSB 培地(7 mM Fe^{2+}、pH1.9)を入れ、単離株および集積培養系の前培養液を 1%植菌し、45℃で 3 日間培養した。この培養液に粒径 0.5 mm 以下に粉砕したパソコン由来の廃電子基板試料を 10 g 投入し、32、37 または 45℃、pH1.8～1.9 でバイオリーチングを行った。12 時間毎にサンプリングを行い、上清中の金属濃度を測定したところ、単離株、集積培養系ともに 45℃のとき金属浸出率が最も高く、単離株では 96 時間で銅は 100%、亜鉛 98%、マンガン 83%、ニッケル 87%であった。一方、集積培養系では、96 時間で銅 85%、亜鉛 89%、マンガン 59%、ニッケル 81%であり、いずれも単離株の方が浸出率が高かった。しかし、単離株は集積培養系と比較して、鉄酸化速度が遅いことや、バイオリーチング時の初期の金属浸出率が低くなる傾向が認められた。これらの結果は、集積培養液中に NE106G 株よりも増殖速度が速い鉄酸化細菌が存在すること、あるいは集積系に共存する従属栄養細菌が鉄酸化細菌のリーチング作用を促進していると推察された。

なお、本研究は平成 26 年度環境研究総合推進費補助金（3K133012）の助成を受けて行った。

bioleaching, acidophilic iron-oxidizing bacteria, *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*

講演番号：3C31p05
講演日時、会場：3 月 28 日 14:44～ C 校舎 31 会場

白金還元酵母の分子育種

Molecular breeding of yeasts for platinum reduction

○伊藤 理央、橋本 遥、黒田 浩一、植田 充美（京大院農・応用生命）
○Rio ITO, Haruka HASHIMOTO, Kouichi KURODA, Mitsuyoshi UEDA (Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., kyoto Univ.)

【背景・目的】近年、貴金属はハイテク製品に欠かせない金属としてその需要はますます増大しているが、国際価格の上昇や埋蔵量の少なさによる供給構造の脆弱性が問題となっている。そのため、現在では廃棄された製品や工場廃液などから貴金属を高効率に回収・再利用する技術が求められている。我々はこれまでに酵母細胞表層工学を用いた生物学的手法による環境汚染重金属の除去と水質浄化やレアメタル・レアアースの選択回収などのバイオリサイクル技術の開発を進めてきた[1,2]。この手法では、まず液体に溶解させた金属イオンを細胞表層に提示したペプチドやタンパク質に選択的に吸着させた後、吸着した金属イオンを脱着液に通すことで濃縮回収するというプロセスを経る。本発表では、次世代型の回収法として回収時に貴金属イオンを還元して固体である貴金属単体として回収することを目指してリサイクルコストをさらに低減させる有用な技術への展開を企てた。
【方法･結果】硫酸還元菌の一種である *Desulfovibrio* 属細菌の持つヒドロゲナーゼ遺伝子を単離し、開発してきた酵母用の膜発現ベクター[3]に組み込み酵母に導入することで酵母の細胞膜にヒドロゲナーゼを発現させた。作製したヒドロゲナーゼ発現酵母を白金溶液に添加することにより金属イオンの還元を細胞表層で行ったので、その成果をまとめて報告する[4]。

[1] Kuroda et al, *Current Opinion in Biotechnology*, **22**, 427-433 (2011)
[2]植田ら, 環境資源工学会誌, **60**, 78-83 (2013)
[3]Hara et al, *J. Biochemistry*, **151**, 551-557 (2012)
[4]Ito et al, submitted

cell surface engineering, metal reduction, recycle biotechnology

講演番号：3C31p06
講演日時、会場：3 月 28 日 15:05～ C 校舎 31 会場

Fusarium oxysporum を用いた CdSe 量子ドットの生成

Synthesis of CdSe quantum dots by the Fungus, *Fusarium oxysporum*

○山口 賢明[1]、鶴田 嘉二朗[2]、井村 祐己[1]、鈴木 道生[1]、吉村 悦郎[1] ([1]東大院農生科・応生化、[2]東大農)
○Takaaki Yamaguchi[1], Yoshijiro Tsuruda[2], Yuki Imura[1], Michio Suzuki[1], Etsuro Yoshimura[1] ([1]Graduate School of Agricultural and Life Sciences, Univ. Tokyo, [2]Tokyo.Univ)

【背景】

量子ドット（QDs: quantum dots）はナノサイズの半導体結晶で、特異な光学特性や電気特性を有している。そのため、生体イメージングや太陽電池での応用が進められている素材である。従来、QDs は化学的手法により合成されてきたが、有毒物質や、高温での反応が必要であったため、より環境に優しい他の生成法が模索されている。近年、微生物を用いた量子ドットの生成手法が報告されてきており、この方法では環境に負荷をかけずに常温で量子ドットを生成できる。しかし、この能力はすべての微生物に備わったものでなく、またその生成機構について未だ不明な部分も多く、解明が待たれている。本研究では、糸状菌（*Fusarium oxysporum*）を用いた CdSe の QDs 生成について検討を行った。

【実験と結果】

oatmeal 培地で培養した *F. oxysporum* の菌体を遠心操作により回収し、滅菌水に懸濁した。この懸濁液にセレン酸ナトリウム（Na_2SeO_4）と塩化カドミウム（$CdCl_2$）をそれぞれ終濃度 1 mM で添加し、20°C で 2 日間インキュベートした。この懸濁液からは励起波長 310 nm、蛍光波長 410 nm の蛍光が観察された。セレン酸ナトリウムのみ、または塩化カドミウムのみを添加した場合では蛍光は観察されなかったため、この蛍光は CdSe 量子ドットによるものだと考えられた。また、懸濁液の透過型電子顕微鏡（TEM）での観察から直径 10-30 nm の粒子が菌体内ならびに菌体表面に存在し、エネルギー分散型 X 線分光分析（EDS）での分析からこれらの粒子に Cd と Se が含まれていることが示された。以上より、*F. oxysporum* を用いた CdSe の QDs 合成が可能であることが確認された。本法で行った CdSe の QDs 合成には、セレン酸の還元と粒子サイズを制御する物質の存在が必要である。現在、これらの物質の探索を行っている。

Quantum dots, Biosynthesis, *Fusarium oxysporum*

講演番号：3C31p07
講演日時、会場：3 月 28 日 15:16～ C 校舎 31 会場

ヒト毛髪由来ケラチンの材料化に関する研究

Preparation of materials based on keratin from human hair

○村上 小枝子[1]、廣井 哲也[1]、國崎 幹教[2] ([1]神奈川県産業技術センター、[2]（株）クニザキ)
○ Saeko MURAKAMI[1], Tetsuya HIROI[1], Mikinori KUNIZAKI[2] ([1]Kanagawa Industrial Technology Research Center, [2]Kunizaki Co., Ltd.)

【緒言】　ヒト毛髪はヘアサロンなどで大量に発生し、産業廃棄物として処理されている。一方、毛髪は都市由来のバイオマス素材とみなすこともでき、フィルムなどの原材料として高度有効利用が可能であれば、廃棄物削減の観点からも望ましいと考えられる。毛髪の主成分タンパク質であるケラチンを用いた材料開発としては、これまでに、羊毛ケラチンとキトサンとのブレンドフィルム[1]やヒト毛髪ケラチンと絹フィブロインとのブレンドフィルム[2]などが報告されている。これらケラチンフィルムの用途としては、細胞培養基材[1]、医用材料[2]などが提案されている。本研究では、ケラチンを主成分とする毛髪溶解物を用いた複合フィルムおよび成形体を作製して引張強度および圧縮応力を測定し、それらの着色や耐水化について検討を行った。バイオマス材料として、毛髪溶解物と複合する添加材料は主に天然物由来のものを選択した。

【方法と結果】　10 %濃度となるように毛髪を3 %NaOH水溶液に加えて50 ℃、8 h処理した。不溶物を除去して溶液を中和後、排除分子量14,000で透析処理した毛髪溶解液を凍結乾燥し、茶色で鱗片状の毛髪溶解物を得た。

複合フィルムは毛髪溶解物の10 %水溶液と種々のポリマー水溶液を混合し、キャスト法により作成した。その結果、カルボキシメチルセルロースナトリウムおよびPVAとの複合によりフィルムが形成され、最大で引張強度25 MPaを示した。作製したフィルムは茶褐色を呈するが、天然着色料や食用合成色素によって着色可能であった。

成形体は毛髪溶解物と王子製紙(株)製のネオファイバー（新聞古紙乾燥粉砕物）を10/0から5/5の割合で混合し、ホットプレスにより作製した。得られた成形体（φ10 mm、高さ4 mm）について圧縮試験を行った結果、成形体の最大圧縮応力は、毛髪溶解物単独の場合は24 MPaであったが、ネオファイバーの混合比率の増加に従って増大し、5/5では192 MPaを示した。毛髪溶解物は水溶性で、成形体の耐水化が課題となることから、(株)岐阜セラック製の脱色セラックによる耐水性向上を試みた。セラック被覆と熱硬化処理により、水に浸漬して60分後の重量減少率がおよそ5分の1に低減され、未処理の成形体に比べて耐水性を向上できることがわかった。

[1] T. Tanabe, N. Okitsu, A. Tachibana, K. Yamauchi, *Biomaterials*, **23**, 817-825 (2002).
[2] T. Fujii, D. Ogiwara, K. Matsuoka, M. Nagura, *Sen'i Gakkaishi*, **62**, 245-250 (2006).

keratin, human hair, material

講演番号：3C31p08
講演日時、会場：3 月 28 日 15:27～ C 校舎 31 会場

幌延深部地下環境から取得した微生物による嫌気条件下での腐植物質分解。

Anaerobic decomposition of humic substances by a bacterium obtained from the deep subsurface environment in Horonobe, Hokkaido, Japan.

○上野 晃生[1]、清水 了[1]、玉村 修司[1]、荒牧 憲隆[1]、長沼 毅[2]、金子 勝比古[1]([1]幌延地圏環境研究所、[2]広島大院・生物圏科学)
○Akio UENO[1], Satoru Shimizu[1], Shuji Tamamura[1], Noritaka Aramaki[1], Takeshi Naganuma[2], Katsuhiko Kaneko[1] ([1]H-RISE, [2]Hiroshima University)

【研究背景】

堆積物・堆積岩をはじめとする地殻内において、有機炭素の一つである腐植物質は嫌気的な地下環境では非常に安定した難分解性有機物として存在する[1)]。炭素存在量の観点から炭素循環を見た場合、地球表層に代表される陸域生物圏および土壌中の好気条件下で腐植物質が微生物分解を受ける報告事例があり[2-4)]、その全有機炭素存在量は 2.0-2.3×10^3Pg C(1Pg=10^{15}g)である[4)]。一方で、地殻内有機炭素量が 1.25×10^7Pg C であることから、それらの差は大きく、地球表層で生じる酸化的な腐植物質分解を経由した炭素循環に加え、深部地下環境で生じる分解も同様に考慮に入れなければならないと考えられる。嫌気環境である深部地下環境において腐植物質分解微生物が存在するかどうか、そのような微生物が存在する場合、腐植物質に対しどのような影響を与えるのかは不明である。本研究では、腐植物質の一画分であるフミン酸(humic acids; HA)分解能を有する嫌気性細菌を探索し、HA 分解能の検証と HA 分子構造に与える影響を調べた。

【方法および結果】

日本原子力研究開発機構・幌延深地層研究施設より採取した地下水を接種源とし、市販のフミン酸 Aldrich HA を添加した培養液を用い、嫌気条件下での集積培養を行った。その結果、*Clostridium* sp. HSAI-1 株を得た。既法に従い ^{14}C 標識を行ったフミン酸様物質を合成した(^{14}C-HA)[4)]。Aldrich HA に加え、研究対象地域の深部地下環境の珪藻質泥岩(声問層)より声問層 HA を調製した。対照実験群と HSAI-1 株添加実験群を設定し、a)^{14}C-HA、b)Aldrich HA、c)声問層 HA のいずれかを培養液に加え、嫌気条件下での培養を 30℃で 4-5 週間行った。実験 a)では経時的にヘッドスペースガスを採取し、$^{14}CO_2$ として放出される ^{14}C の放射活性を測定した。実験 b)と c)については、培養最終日に培養液よりフミン酸を抽出し、既法に従い高速サイズ排除クロマトグラフィー(HPSEC)とフーリエ変換赤外分光スペクトル(FT-IR)解析による HA 分析を行った[6)]。

実験 a)において、HSAI-1 株培養液のヘッドスペース中に $^{14}CO_2$ が検出され、対照実験との比較では分解率は 14 日目で最大 7.4±3.5%であった。実験 b)と c)の HPSEC および FT-IR の結果より、HA の低分子化と、微生物もしくは培養液成分が HA に吸着することによる高分子量の HA 様物質が生成することが分かった。これらの結果から、HSAI-1 株によるフミン酸の嫌気分解が生じることが分かった。

【参考文献】

[1)]Stevenson (1994) Humus chemistry; [2)]Grinhut *et al.* (2011) Environ Sci Technol 45:2748-2754; [3)]Yanagi *et al.* (2008) Microbes Environ 23:44-48; [4)]Steffen *et al.* (2002) Appl Environ Microbiol 68:3442-3448; [5)]Sundquist and Visser (2014) The Geologic History of the Carbon Cycle; [6)]Ueno *et al.* (2014) Geomicrobiol J 31:654-663.

humic substances, subsurface environment, global carbon cycle

講演番号：3C31p09
講演日時、会場：3 月 28 日 15:38～ C 校舎 31 会場

有機質肥料中の二次多量要素および微量要素の分析

Assay of secondary macronutrients and micronutrients in organic fertilizers

○樋口 空生、中辻 貴広、向 真樹、ADHIKARI Dinesh、荒木 希和子、久保 幹（立命館大）
○ Hiroki HIGUCHI, Takahiro NAKATSUJI, Masaki MUKAI, Dinesh ADHIKARI, Kiwako ARAKI, Motoki KUBO (Ritsumeikan Univ.)

【背景】

植物の生長において、肥料三大要素である N、P、K のほかに二次多量要素および微量要素が不可欠である。水溶性成分を多分に含む化学肥料は即効性がある一方で灌水により容易に流亡する問題がある。一方、有機質肥料の場合、二次・微量要素を含んだ有機物が時間をかけて分解されることにより長期間にわたって必須栄養素を供給し続けるため流亡による損失が小さい。このため、有機質肥料を用いて二次・微量要素を補うことが、より効果的な農作物の生産につながると考えられる。そのためには、物質循環の観点から、二次多量要素および微量要素について肥料中の濃度や施肥により植物に取り込まれる量を知ることは重要である。そこで、有機資材系および堆肥系の有機質肥料について二次多量要素(Ca、Mg)および微量要素(Fe、Mn)の含有全量と水溶性成分量を測定し、水耕栽培による植物生長のアッセイを行い、二次多量要素および微量要素源としての特徴を解析した。

【方法・結果】

有機質肥料中の Ca、Mg、Fe、Mn の全濃度及び水溶性濃度を原子吸光光度法で測定した。全濃度の分析において、最大含有量を示した有機質肥料は Ca で鶏糞系、Mg で菜種油粕系、Fe で魚粕系、Mn で水草のオオバナミズキンバイの乾燥粉末だった。いずれも有機資材系であった。一方で、水溶性成分は多くの有機質肥料で数 mg/kg の微量であるか検出されず、この傾向は有機資材系と堆肥系のどちらにも見られた。このため、有機質肥料中の Ca、Mg、Fe、Mn は何らかの不溶性化合物と結合していると考えられる。

Ca、Mg、Fe、Mn の全濃度が大きかった有機質肥料を、Ca、Mg、Fe、Mn、およびこれら 4 要素を与えない条件に加え、コマツナ(*Brassica rapa* var. *perviridis*)を栽培した。コマツナの生長と Ca、Mg、Fe、Mn の取り込み量を測定し、有機質肥料の二次・微量要素源としての質を評価した。

secondary macronutrients, micronutrients, organic fertilizers

講演番号：3C31p10
講演日時、会場：3 月 28 日 15:49～ C 校舎 31 会場

乳酸菌 *Enterococcus faecalis* を用いたバイオディーゼル廃液の細胞毒性評価
Cytotoxic evaluation of biodiesel waste against *Enterococcus faecalis*
○土肥 裕希（岡山理大・工）
○Yuki Doi (Okayama University of Science)

【諸言】近年、環境保全の一環として、廃食油からバイオディーゼル燃料（Bio Diesel Fuel: BDF）が盛んに製造されている。現行のアルカリ触媒法による製造では、BDF 生産量の 10%程度のグリセロール廃液が副生される。このグリセロール廃液はグリセロール以外の夾雑物を多く含み、いくつかの微生物に対して細胞毒性を示す。これまでグリセロール廃液中のグリセロールの再活用法（生物学的変換法）は様々な微生物で検討されているが、廃液が細胞に与える生理学的影響はほとんど解析されていない。本研究では、高いグリセロール資化性を示す腸内乳酸菌 *Enterococcus faecalis*（W11 株）を用いて、グリセロール廃液が微生物のグリセロール代謝へ与える影響を解析した。

【結果】グリセロール廃液（Biodiesel Waste: BW）に混入している油成分（Oil）を酸処理次いで有機溶媒抽出によって除去し、グリセロール廃液を「粗製精−廃グリセロール（Crude-Glycerol: CG）」、そして「製精−廃グリセロール（Purified- Glycerol: PG）」に分画した。これらを炭素源として用いた場合、BW を炭素源とした *E. faecalis* の生育はグリセロール（Purify 99%）を炭素源としたそれらと比較して強く阻害された。CG や PG を炭素源とした *E. faecalis* の生育はグリセロールと同等の生育を示した一方で、0.2%$_{(vol/vol)}$以上の Oil の添加はその生育を著しく阻害した。これらの結果は、グリセロール廃液に含まれる油成分が細胞の生育を強く阻害していることを示した。Oil に曝された *E. faecalis* は、細胞内 NADH/NAD^+比が酸化側に偏り、さらに過酸化脂質体の解毒酵素 AhpC の発現量を大幅に増加させた。このことは、Oil から生じた過酸化脂質が細胞に酸化ストレスを与えていたことを示唆した。

E. faecalis は、リン酸化経路と脱水素経路の 2 つのグリセロール代謝経路を有する。*E. faecalis* W11 株では、リン酸化経路を担う遺伝子は好気条件下のみで発現し、脱水素経路を担う遺伝子は好気・嫌気いずれの条件下でも発現した。脱水素経路の中間基質であるジヒドロキシアセトン（DHA）を炭素源に用いた場合、2%$_{(vol/vol)}$Oil の存在は *E. faecalis* の生育をほぼ完全に阻害した。このことは、酸化ストレスが DHA をジヒドロキシアセトンリン酸（DHAP）に変換する DHA キナーゼ反応を強く阻害することを示唆した。グリセロールで嫌気培養された *E. faecalis* の生育は、過酸化物である *tert*-ブチルヒドロペルオキシドに対して好気培養のそれよりも強い感受性を示し、脱水素経路を介したグリセロール代謝が過酸化物質によって引き起こされる酸化ストレスに強い感受性を示すことを支持した。

biodiesel waste, glycerol metabolism, oxidative stress

講演番号：3C31p11
講演日時、会場：3 月 28 日 16:10～ C 校舎 31 会場

セレン蓄積植物における亜テルル酸取り込みと代謝

Uptake and assimilation of tellurite in selenium accumulating plants

○武田 徹[1]、宇賀 司[1]、田畑 翔太郎[1]、阪口 利文[2] ([1]近畿大農、[2]県立広島大生命環境)
○Toru Takeda[1], Tsukasa Uga[1], Shotaro Tabata[1], Toshifumi Sakaguchi[2] ([1]Kindai Univ., [2]Pref. Univ. of Hiroshima)

【目的】カルコゲンのひとつであるテルル（Te）は太陽電池や各種電子部品の材料になるなど、工業的な有用性が高く、我々の生活環境に身近なものになってきている。それに伴い、環境中に排出される Te の化学形態であるテルル酸および亜テルル酸に起因する新たな環境汚染問題が懸念されている。テルル酸および亜テルル酸などの水溶性テルル化合物は高い毒性を有し、多くの生物種に対して重篤な障害をもたらす。それゆえ、生物による Te の安全かつ効率的な回収・リサイクル技術が注目されてきている。このような状況下、微生物による Te 回収技術が最近報告されたが、植物を用いた例はほとんどない。植物において、Te は硫黄と同族であることから、根の硫酸トランスポーターにより取り込まれ硫黄同化経路で代謝されると考えられるが、その詳細は明らかになっていない。そこで本研究では、Te と同族のセレン（Se）を蓄積する能力を有する Se 蓄積植物を用いて、亜テルル酸の取り込みと代謝について検討した。
【方法と結果】Se 蓄積種に分類されるブロッコリー、ソルガム、およびカラシナはそれぞれ 50%ムラシゲ・スクーグ混合塩類を含む水耕液で明期 12 時間（240 μmol/m^2/s ：24°C）／暗期 12 時間（20°C）の条件で 12～15 日間栽培した。Se あるいは Te 添加群は亜セレン酸（Se[IV]）ナトリウムあるいは亜テルル酸（Te[IV]）ナトリウムを 5～100 μM になるように添加した。各植物における Se あるいは Te の取り込みと蓄積を調べた。ブロッコリー、ソルガム、およびカラシナにおいて、Se[IV]は Se 添加群の地上部および根において認められた。Te[IV]は Te 添加群のすべての植物の地上部において認められず、一方、根では添加する Te 濃度の増加に伴って多くの Te[IV]が認められた。Te 添加群の根における Te[IV]量は Se 添加群の根における Se[IV]量よりも 8.0～85.9 倍高かった。亜セレン酸ナトリウムと亜テルル酸ナトリウム共存下で栽培した植物の根における Se[IV]および Te[IV]の取り込みを調べたところ、Se[IV]の取り込みは亜テルル酸ナトリム共存下で阻害されていたが、Te[IV]の取り込みは亜セレン酸ナトリウムにより影響を受けなかった。Se および Te 蓄積を有機 Se および有機 Te 量で評価した。Se 添加群の地上部および根において、有機 Se が検出されたが、Te 添加群のいずれの植物においても有機 Te は検出されなかった。以上のことから、Se 蓄積植物は Te[IV]を Se[IV]に比べて積極的に取り込むことが可能であるが、ほとんどの場合、含 Te アミノ酸にまで代謝しないことが明らかになった。現在、Se 蓄積植物における亜テルル酸還元活性を検討中である。

tellurium, selenium, tellurite reductase

講演番号：3C31p12
講演日時、会場：3 月 28 日 16:21～ C 校舎 31 会場

麹菌による好気的条件におけるセレンオキサニオン変換とセレン回収
Selenium conversion and recovery by a koji mold, *Aspergillus oryzae* strain RIB40 under aerobic conditions
○阪口 利文[1,2]、木村 博美[2,3]、有馬 寿英[2]、岡村 好子[3]（[1]県立広島大生命科、[2]県立広島大環境科、[3]広島大院先端物質）
○Toshifumi SAKAGUCHI[1,2], Hiromi KIMURA[2,3], Toshi-hide ARIMA[2], Yoshiko OKAMURA[3]
([1]Dept. of Life Sci., Pref. Univ. of Hiroshima, [2]Dept. of Emviron. Sci., Pref. Univ. of Hiroshima, [3]Grad. Sch. Adv. Sci. Mat. Hiroshima Univ.)

【背景及び目的】セレンは半導体、ガラス等の工業用材料として使用される他、生体必須物質としてセレン酵母に見られるようにサプリメントなどに配合されているカルコゲン元素である。そのため、セレンは今日、産業資源元素のみならず栄養元素としてもその有用性が認められる重要な元素である。しかし、その酸化物水溶性イオン、いわゆるセレンオキサニオンは生体に悪影響があり、水質汚濁防止法において排出基準が設けられるなど有効な除去・回収法が必要である。近年では、生物的手法も多く提案されており、簡便で元素体セレンを回収できる方法として注目されている本研究では、酒、味噌、醤油等の発酵・醸造産業で幅広く用いられている糸状菌である黄麹菌 *Aspergillus oryzae* を用いたセレン回収への利用可能性について検討した。
【方法及び結果】本研究では黄麹菌 *A. oryzae* RIB40 株を用いてセレンオキサニオンの変換・回収実験を行った。まず *A. oryzae* RIB40 株の分生子をポテトデクストロース寒天培地（PDA）上に形成させ、その後、完全培地に植菌・培養後、塊状菌体粒子を形成させた。この塊状菌体を用いたセレンオキサニオンの還元、元素体セレン微粒子の形成について調査した。その結果、セレン酸については、その還元・元素体セレンの形成が見られなかったものの、初発濃度 1mM の亜セレン酸を好気的還元し、24 時間以内で培養液中の亜セレン酸イオンのほぼ全てを元素体セレン粒子に変換できることが明らかになった。また、形成された元素体セレン粒子の塊状菌体からの乖離、菌塊からの菌体の流出が観察されず、ミラクロスなどのナイロン製膜によって簡便に菌塊と反応液の分離・回収が可能であり、遠心などの煩雑な分離操作を必要としないセレン回収が達成できた。

Aspergillus oryzae, selenium oxyanion, selenite

講演番号：3C25a02
講演日時、会場：3 月 28 日 09:11～ C 校舎 25 会場

ガラスカイメン類カイロウドウケツ由来シリカ粒子形成促進たんぱく質“グラシン”
A protein extracted from biosilica skeleton of the glass sponge *Euplectella* "glassin" exhibits silica precipitation activity
○天野 太郎[1]、有馬 二朗[1]、森 信寛[1]、清水 克彦[2]([1]鳥取大農、[2]鳥取大産学連携機構)
○Taro AMANO[1], Jiro ARIMA[1], Nobuhiro MORI[1], Katsuhiko SHIMIZU[2] ([1]Fac. of Agric. Tottori Univ., [2]Org. for Reg. Ind. Acad. Coop. Tottori Univ.)

【背景】ガラスカイメン類カイロウドウケツは、深海に生息する約 40 cm におよぶ円筒形のカイメンである。その骨格はシリカ（二酸化ケイ素）を主成分とし、微量のシリカ粒子形成促進タンパク質を含んでいる。このようなシリカ形成促進タンパク質は、遺伝子工学的に別の酵素遺伝子と融合することで、固定化酵素合成ツールとしての利用に期待できる。我々はこれまでに、シリカ粒子形成促進タンパク質の一つ “グラシン”を同定し、その機能解析を行ってきた。本発表では、カイロウドウケツから抽出されたグラシンの性質とそのリコンビナントの生産について報告する。
【方法】グラシンは、カイロウドウケツのシリカ骨格をフッ化水素酸で溶解し、可溶性画分を透析・濃縮することで獲得した。グラシンのシリカ形成能は、ケイ酸とグラシンを混合して形成されるシリカを回収・洗浄し、目視、走査型電子顕微鏡観察およびケイモリブデン酸比色法で確認した。糖鎖修飾の有無については、*O*-glycosidase 処理前と処理後のグラシンについて、SDS-PAGE、Western Blotting、および MALDI-TOF MS 解析で確認した。組換えグラシンは、PCR クローニングおよび全ゲノム DNA 配列解析により得られたグラシンの遺伝子配列をもとに合成した遺伝子を用いてグラシンの発現用プラスミドを構築したのちに *E. coli* Rosetta (DE3)を用いて調製した。
【結果】組換えグラシンを調製してシリカ形成能を確認した結果、目視、走査型電子顕微鏡観察およびケイモリブデン酸比色法により野生型グラシンに匹敵するシリカ形成能が確認された。また、Western blotting の結果、組換えグラシンは２種類の抗グラシン抗体に良好に認識された。野生型グラシンは SDS-PAGE において 23 kDa 付近にメインのバンドが観察されたが、泳動パターンは全体的にスメアとなり、MS 解析にて 7.0～13 kDa にわたり多くのピークが確認された *O*-glycosidase による糖鎖修飾の切断を試みた結果、SDS-PAGE では 19 kDa となり、MS 解析では 5.9 と 8.8 kDa 付近にピークが確認されたことからグラシンは 0 型糖鎖の修飾を持つことが示された。一方、組換えグラシンは SDS-PAGE で 33 kDa 付近にバンドが確認され、MS 解析では 11 kDa にピークが見られた。本実験結果から、組換えグラシンは、野生型グラシンの配列とともにプロペプチドなどの配列が付加されていることが示唆され、糖鎖の修飾はシリカ形成能とは無関係であることが確認された。グラシンによって形成されたシリカを溶解し、SDS-PAGE に供した結果、野生型および組換えグラシン共にバンドが確認されたことから、グラシンは形成されたシリカ粒子に埋め込まれることが確認された。現在は、組換えグラシンの諸性質を検討中である。

biosilica, glass sponge, Porifera

講演番号：3C25a03
講演日時、会場：3 月 28 日 09:22～ C 校舎 25 会場

リジルオキシダーゼ（LOX）活性を保持した卵殻膜のヒト皮膚に対するバリア機能回復促進効果

The promoting effect of egg-shell membrane with lysil oxidase (LOX) activity on the recovery of skin barrier function in humans

○山津 敦史、山下 裕輔、伊井野 貴史、青笹 正義、丸 勇史、吉國 義明、金 武祚（（株）ファーマフーズ)
○Atsushi YAMATSU, Yusuke YAMASHITA, Takashi IINO, Masayoshi AOSASA, Isafumi MARU, Yoshiaki YOSHIKUNI, Mujo KIM (Pharma Foods International Co., Ltd.)

【目的】古来より卵殻膜には創傷治癒の効果があるとされてきた。卵殻膜にはリジルオキシダーゼ（LOX）が存在し、産卵時に輸卵管由来の LOX が卵殻膜の前駆体であるコラーゲンなどのリジン残基を脱アミノすることにより架橋反応を促進し、強固な膜構造を形成する。我々は 2013 年度本大会において卵殻膜由来 LOX によるエラスチンおよび細胞に対する架橋形成について報告した。我々は卵殻膜の創傷治癒効果は LOX に起因すると考え、LOX 活性を保持したまま卵殻膜を粉末化した LOX 活性卵殻膜を作製した。本研究では、肌の角質細胞を剥がして肌荒れ状態にしたヒト皮膚に LOX 活性卵殻膜を塗布することで、損傷した肌のバリア機能の回復が促進されるかどうかを検証した。
【方法】テープストリッピング法により 4 名のヒトの背中から各人 9 か所の角質細胞を剥がし、肌荒れ状態の部位を作製した。粉末状の LOX 活性卵殻膜および加熱により不活化した卵殻膜を水で 0.1%の濃度になるよう懸濁し、懸濁液 400 µL を 2.5cm 四方のガーゼに染み込ませ、肌荒れ部位に貼り付けた。1 日毎に計 3 日間、角質細胞の採取および経表皮水分蒸散量（TEWL）の測定を行った。角質細胞は FITC 標識抗インボルクリン抗体および Nile red で染色した。細胞が成熟するほど、①インボルクリンが検出されにくくなること、②細胞外の脂質層が成熟し Nile red で染まりやすくなること、を利用して角質細胞の成熟度を染色後の画像輝度から評価した。また、正常な状態の皮膚でも試験を行った。せっけんを用いて強めに洗顔した後の 8 名のヒトの頬に LOX 活性卵殻膜および不活化卵殻膜の 1%懸濁液 400 µL を 2.5 cm 四方のガーゼに染み込ませて 30 分間貼り付け、その後 10 分毎に TEWL を測定した。
【結果および考察】肌荒れ状態の皮膚において、LOX 活性卵殻膜を貼り付けた部位は不活化卵殻膜を貼り付けた部位よりも、角質細胞の成熟度が速く上昇した。また、TEWL は LOX 活性卵殻膜貼付部位が速く低下した。TEWL は肌のバリア機能を直接的に表しているとされ、低値ほどバリア機能が高い。角質細胞の成熟度および TEWL から、LOX 活性卵殻膜のヒト皮膚に対するバリア機能回復促進効果が示唆された。また、正常肌においては、洗顔後一時的に上昇した TEWL が、LOX 活性卵殻膜貼付部位で有意に速く低下し（$p < 0.05$)、正常肌においても LOX 活性卵殻膜のバリア機能回復促進効果が示唆された。以上の結果より、LOX 活性卵殻膜は肌のバリア機能回復を促すことから保湿効果を訴求した化粧品等への応用が期待される。

lysil oxidase (LOX), egg-shell membrane, skin barrier function

講演番号：3C25a04
講演日時、会場：3 月 28 日 09:33～ C 校舎 25 会場

酵母抽出物による肌保護効果

Skin protection effect by yeast extract

○伊井野 貴史、坂下 真耶、山下 裕輔、丸 勇史、吉國 義明、金 武祚（（株）ファーマフーズ)
○ Takashi IINO, Maya SAKASHITA, Yusuke YAMASHITA, Isafumi MARU, Yoshiaki YOSHIKUNI, Mujo KIM (PHARMA FOODS INTERNATIONAL Co., Ltd.)

【目的】

昨年度の本大会において、当社独自の方法により調製した酵母抽出物がメラニン合成抑制効果を有すること、また、その作用機序はメラニン合成に必須の酵素であるチロシナーゼの特異的発現抑制であることを報告した。今回は本酵母抽出物による美白以外の有用効果を検証するため、抗炎症効果、抗シワ効果、創傷治癒効果等、肌に対する保護効果を検討したので報告する。

【方法】

抗炎症モデル試験　ヒト THP-1 細胞を 100 nM PMA(Phorbol 12-myristate 13-acetate)存在下で培養してマクロファージ様細胞へと分化させ、0.5 μg/mL LPS(Lipopolysaccharide)存在下で酵母抽出物を添加して 3 時間培養後、常法どおり Total RNA を抽出、cDNA を合成、Real-time PCR を行い、GAPDH mRNA の発現量に対する各種炎症性サイトカイン mRNA の発現量の割合を定量した。

抗シワモデル試験　ヒト線維芽細胞 HS68 を培養し、紫外線(UV-A、300 mJ)照射下で酵母抽出物を添加して 4 時間培養後、上述した方法で Real-time PCR を行い、GAPDH mRNA の発現量に対する Matrix metalloproteinase-1(MMP-1、別名コラーゲナーゼ) mRNA の発現量の割合を定量した。

創傷治癒モデル試験　ヒト表皮角化細胞 PHK16-0b を 12 穴プレートにコンフルエントになるまで培養、その後 24 時間添加剤スターベーション(増殖因子飢餓)し、20 μl ピペットチップの先端を用いてウェルの底面をスクラッチ(引っ掻き傷を作ること)した後、酵母抽出物を添加して 16 時間培養し、細胞が移動・浸潤した部分の面積を計測した。

【結果】

本酵母抽出物は濃度依存的に炎症性サイトカイン IL-6 mRNA の発現量を抑制(濃度 0.5%で約 70%抑制)することが示され、肌に塗布した場合に抗炎症効果が期待できる。また、本酵母抽出物は濃度依存的にコラーゲン分解酵素である MMP-1 mRNA の発現量を抑制(濃度 0.25%で約 60%抑制)することが示され、肌に塗布した場合にコラーゲンの分解を抑制することによる抗シワ効果が期待できる。さらに、本酵母抽出物は表皮角化細胞の細胞遊走を促進(濃度 0.02%で約 70%促進)することが示され、荒れ肌に塗布した場合に創傷治癒効果が期待できる。

以上の結果より、本酵母抽出物は美白効果を有するだけではなく、抗炎症効果、抗シワ効果、創傷治癒効果をも期待でき、美肌を目的とする化粧品原料として有望であることが示唆された。

yeast extract, anti-inflammation, anti-wrinkle

講演番号：3C25a05
講演日時、会場：3 月 28 日 09:44～ C 校舎 25 会場

ポリ-γ-グルタミン酸の化学改質と金属親和性の改変

Chemical transformation and modification of metal-binding affinity of poly-gamma-glutamate

○芦内 誠、尾池 翔太、白米 優一（高知大農）
○Makoto Ashiuchi, Shota Oike, Yuichi Hakumai (Kochi Univ.)

ポリ-γ-グルタミン酸（ＰＧＡ）は、ナイロン様の主鎖骨格とポリアクリル酸に類似の構造特性をあわせ持ったポリアミド新素材である。加えて、生分解性やヒトへの安全性にも優れていることから、ＰＧＡの新たな用途展開や産業材料化に大きな期待が寄せられている。我々はＰＧＡの実用材料化を目指し、その化学改質（Chemical Transformation）技術について検討を行ってきた。その中で高い修飾率と優れた薬品耐久性を示すＰＧＡのポリイオンコンプレックス型超分子物質の合成に成功し、現在、これらを総じてＰＧＡＩＣと呼んでいる。今回、ＰＧＡＩＣの中でもドーパミルＰＧＡゲルに着目した。本材料は物理ゲルに特徴的な自己修復機能を有しているのに加え、自重量の千倍を超える水分を加えてもゲル性を維持する等、物理ゲルの想定を上回る超保水性まで示すことから、興味深い分子間ネットワークの形成機構の存在が示唆されている。一方、基盤ポリマーであるＰＧＡにはｐＨ応答性の他、重金属に対する高い親和性（結合性）等の特殊な材料機能も報告されている。そこで、本研究ではＰＧＡとドーパミルＰＧＡの金属親和性（結合性）を精査し、化学改質に伴う機能改変の可能性について検討した。

今回、遷移金属イオンとして Ni^{2+}・Co^{2+}・Dy^{3+}を、典型金属イオンとして Zn^{2+}・Ga^{3+}・In^{3+}を用いた。なお、Ni^{2+}・Co^{2+}・Ga^{3+}・In^{3+}はレアメタル、Dy^{3+}はレアアースに属する産業上重要な有価金属種である。また、本実験を行うにあたって 0.1%(w/v)4-(2-Pyridylazo)resorcinol を用いた金属イオンの高感度比色定量法を応用した。

各種濃度での金属結合実験を実施した結果、ＰＧＡは Ga^{3+}・In^{3+}・Dy^{3+}等、３価以上の陽イオン類に優れた親和性を示す一方、Ni^{2+}・Co^{2+}のような２価陽イオンに対しては本実験条件下においてほとんど吸着しないことが判明し、イオン価数による選択性の存在が示唆された。ＰＧＡの結合性に強く関与しているとされているのが側鎖のカルボキシル基とされ、加えて、アミド結合をなす窒素分子もその結合に関わるとされている。原理的にはＥＤＴＡ等のキレート剤に類縁したメカニズムを有しているものと思われる。一方、ドーパミルＰＧＡではＰＧＡ起源のカルボキシル基の大半がカテコール基に置き換わっているため、金属親和性に著しい変化が認められるものと示唆された。ドーパミルＰＧＡに対しても同等の金属結合試験を実施したところ、ＰＧＡと異なり、Ni^{2+}・Co^{2+}のような２価陽イオンに顕著な親和性（結合性）を示すようになる一方、Ga^{3+}等の多価陽イオン類は吸着しないという予想外の結果が見られた。本件の金属結合機構は一般的なイオン親和によるものとは異なる可能性が高い。

poly-γ-glutamate, chemical transformation, metal-binding affinity

講演番号：3C25a06
講演日時、会場：3 月 28 日 10:05～ C 校舎 25 会場

固相上誘導体化法を用いた GC/MS メタボローム解析手法の開発

Development of GC/MS metabolome analysis method using derivatization on solid phase

○馬場 健史[1]、佐々野 僚一[2]、山下 俊幸[1]、福崎 英一郎[1] ([1]阪大院・工・生命先端、[2]アイスティサイエンス)
○Takeshi Bamba[1], Ryoichi Sasano[2], Toshiyuki Yamashita[1], Eiichiro Fukusaki[1] ([1]Dept. Biotech., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [2]AiSTI SCIENCE)

【目的】
従来のメタボローム分析は、採取した試料を溶媒抽出、遠心濃縮、凍結乾燥、誘導体化等の前処理をした後、GC-MS により測定し、得られたデータを解析する。前処理工程は煩雑であるため熟練された技術とともに約 1 日の時間を必要とする。
そこで、メタボローム分析の迅速化を目的として、アミノ酸等をターゲットとした固相上誘導体化法を用いた GC/MS メタボローム解析手法の開発を行ったので報告する。
【実験方法】
ブタ血清 1 mL にアセトニトリルを 1 mL 添加し、1 分間振とうした後、遠心分離してタンパク質を除去した。その上清を 100 μL 分取し、無極性相互作用の固相カートリッジ HLB-10 mg に負荷し、アセトニトリル-水（1/1）0.2 mL で溶出した。この溶出液にアセトニトリル 2 mL を添加したものを強イオン交換作用の固相カートリッジ CX-20 mg に負荷しアミノ酸を固相に保持させ、アセトニトリル 1 mL で洗浄した。次に、固相カートリッジに誘導体化試薬 MSTFA を 50 μL 添加し 1 分間静置後、アセトン-ヘキサン（15/85） 940 μL で溶出させ、GC-MS に胃袋型インサートを備えた大量注入口装置を用いて 25 μL 注入し、SCAN モードで測定した。
【結果と考察】
無極性相互作用の固相カートリッジ HLB に通すことで、脂肪酸やコレステロールなどの中極性から無極性の夾雑物を除去でき、固相上誘導体化での夾雑物による影響を軽減できた。
アミノ酸のアミノ基と固相カートリッジ CX の強イオン交換作用により、アミノ酸を固相に保持できた。そのカートリッジをアセトニトリルで洗浄することで、固相からの脱水を行なえた。固相を用いることにより、従来法では凍結乾燥で約 6 時間必要である脱水操作の迅速化が実現できた。アミノ酸をイオン交換作用で保持した状態の固相に誘導体化試薬を直接添加することで、誘導体化が効率的に行われたと考えられる。
実試料として用いたブタ血清における本法の再現性（n=9）は良好な結果であった。
【まとめ】
固相カートリッジを用いて抽出し、固相上で誘導体化することで、効率的にかつ迅速にメタボローム分析の前処理を行うことができた。

metabolome analysis, GC/MS, solid phase

講演番号：3C25a07
講演日時、会場：3 月 28 日 10:16～ C 校舎 25 会場

超臨界流体クロマトグラフィータンデム質量分析による残留農薬の高感度迅速一斉分析

Supercritical fluid chromatography/triple-quadrupole mass spectrometry-based method for highly sensitive and high-throughput analysis of multiresidue pesticides

○和泉 自泰[1]、高橋 政友[1,2]、石橋 愛実[1]、酒井 美穂[1,2]、安藤 孝[2]、福崎 英一郎[1]、馬場 健史[1] ([1]大阪大院工・生命先端、[2]宮崎農試)
○Yoshihiro IZUMI[1], Masatomo TAKAHASHI[1,2], Megumi ISHIBASHI[1], Miho SAKAI[1,2], Takashi ANDO[2], Eiichiro FUKUSAKI[1], Takeshi BAMBA[1] ([1]Osaka Univ., [2]Miyazaki Agricultural Research Institute)

【研究背景】国産食品や輸入食品の多様化による食の安心と安全を確保するため，改正食品衛生法が 2006 年に施行 (ポジティブリスト制の導入) され，残留基準の設定された農薬数が大幅に拡大された．現在，800 種を超える農薬が規制の対象となっており，多種多様の農作物や加工食品について広範囲な農薬成分を効率的に検査する方法が必要となっている．これまで，ガスクロマトグラフィー質量分析と液体クロマトグラフィータンデム質量分析 (LC/MS/MS) の併用により，食品中の残留農薬成分の一斉分析が実施されてきた．しかしながら，農業生産現場の自主検査として求められるスループット，網羅性，感度，コスト等の問題を完全に解決できていない．一方，我々はこれまでに，超臨界流体 CO_2 (臨界温度 31℃，臨界圧力 7.4 MPa を超えた状態の物質) の低粘性，高拡散性という性質がクロマトグラフィーの移動相として好ましいことを見出し，超臨界流体クロマトグラフィー (SFC) の装置開発，および，SFC を用いた応用研究を展開してきた．本研究では，網羅性，高感度，ハイスループットを兼ね備えた新たな残留農薬一斉分析法の開発を目的として超臨界流体クロマトグラフィー三連四重極型質量分析 (SFC/MS/MS) 法の適応を試みたので報告する．
【方法と結果】当該研究では多成分の農薬成分を高感度かつ定量的に観測するために，高走査速度 (15,000 u/sec) かつ高速極性反転 (15 msec) が可能な三連四重極型 MS (LCMS-8040, Shimadzu Co.) を使用した．測定には，多重反応モニタリング (multiple reaction monitoring, MRM) 法を採用し，各農薬成分に対して，MRM チャンネルを 2 種設定した．SFC の分離には，移動相として超臨界流体 CO_2 とメタノール (0.1% w/v ギ酸アンモニウム) を使用し，分離カラムとして極性基内包型逆相セミミクロカラム (ODS-EP, GL Sciences Inc.) を用いた．SFC 分離条件，イオン化条件，質量分離条件を詳細に検討することで，幅広い化学構造を持つ 510 種の農薬成分 (MW: 99.0~913.5, logP_{ow}: -4.6~8.1) の分離分析をわずか 20 分で達成した (72 samples/day)．さらに，農作物 (トマト，キャベツ) 粗抽出液の標準添加試験によるマトリックス効果を検証した結果，多くの化合物は，日本国内の一律残留基準値 (0.01 mg/kg) 以下の検出感度を保ったことから，実用性は十分にあると結論付けた．最終的に，開発した SFC/MS/MS 分析手法と既存技術である LC/MS/MS 法との性能を比較した結果，当該分析手法は，クロマト分離性能を落すことなくハイスループット分析が可能であり，さらに，検出感度が高い点において有意性があることが示された．今後，本研究で開発した SFC/MS/MS による新規残留農薬分析手法は，残留農薬試験法の第一選択として幅広く認知され使用されることが期待される．

supercritical fluid chromatography, mass spectrometry, pesticide residue analysis

講演番号：3C25a08
講演日時、会場：3 月 28 日 10:27～ C 校舎 25 会場

非分割化メタボノミクス法の各種ヒト非侵襲的試料への適用

Application of non-bucketing metabonomics for a variety of non-invasive human samples

○三澤 拓真[1]、塩川 由佳[1]、伊達 康博[1,2]、菊地 淳[1,2,3,4]（[1]横市院生命医、[2]理研 CSRS、[3]理研 BMEP、[4]名大院生命農）
○ TAKUMA MISAWA[1], YUKA SHIOKAWA[1], YASUHIRO DATE[1,2], JUN KIKUCHI[1,2,3,4]
([1]Yokohama City Univ., [2]RIKEN CSRS, [3]RIKEN BMEP, [4]Nagoya Univ.)

【背景・目的】

ヒトの生体環境を反映する物質はバイオマーカーと呼ばれ、栄養過多や運動不足といった生活環境の悪化からいち早く恒常性の逸脱を見出し、生活習慣病を事前予防する疾患前診断の実現に向けた簡易マーカー物質の発見が望まれている。そこで我々は昨年度年会までに、健常人の食習慣の変動が尿や糞便、唾液といった非侵襲的試料の変動とどのように同調するかを報告してきた。この解析過程において、メタボノミクスで広く用いられていたスペクトル分割化を行わなければ、より高いピーク分離能で情報抽出が可能になることに着目した。そこで本年会では ^{1}H-NMR のみでは複雑に重複する糖や脂質のピークが分離し得る ^{13}C-NMR を各種ヒト非侵襲的試料に適用し、多変量解析等を用いた ^{13}C NMR メタボノミクスの試みについて報告する。

【実験】

スペクトル非分割化メタボノミクスに関しては R および MATLAB 言語を駆使することで、ピークアライメント技術を用いることとした。ヒト非侵襲的試料としては複数名のボランティアから糞便、毛髪および爪を採取し、試料の前処理方法や計測方法の最適化を行った。

【結果】

non-bucketing 法を確立し採用したことで、簡便に、より妥当性が高い解析を可能にしたことに加え、^{1}H-NMR ではカップリング情報の保存に成功し、より詳細な代謝物レベルの議論を可能にした。また、デカップリングによりケミカルシフトの値が何よりも重要な因子となりうる ^{13}C-NMR においてもピークをアライメントすることで、^{13}C-NMR の利点であるピーク分離能の高さを活かしたメタボノミクスへの応用を可能にした。また、対象とする核種における試料調製法の最適化にも成功し、各検体に関して、^{13}C を用いた事により従来の ^{1}H-NMR とは異なるプロファイルを得ることが出来た。毛髪・爪検体に関して、既往研究がほとんど存在しないため、従来の ^{1}H-NMR を用いた代謝プロファイルも作成した。本年会では個人差や時系列変動といった input 情報を反映した解析結果についても議論したい。

13C-NMR, non-bucketing metabonomics, peak alignment

講演番号：3C25a09
講演日時、会場：3 月 28 日 10:38～ C 校舎 25 会場

ヒト由来代謝物のメタボノミクスにおける非線形アプローチの構築
Advanced analytical approach for metabonomics in human
○塩川 由佳[1]、三澤 拓真[1]、伊達 康博[2]、菊地 淳[1,2,3] ([1]横市院、[2]理研 CSRS、[3]名大院)
○Yuka SHIOKAWA[1], Takuma MISAWA[1], Yasuhiro DATE[2], Jun KIKUCHI[1,2,3] ([1]Yokogama City Univ., [2]RIKEN CSRS, [3]Nagoya Univ.)

【背景】代謝物を網羅的に扱うメタボノミクスにおいて，代謝物はその個体の表現型と言える．この表現型は，恒常的に変動する物質と，異常な代謝反応により産生された物質の混合状態を反映していると考えられる．仮に恒常的な変動である個体内の周期的変動をバックグランドとみなし，この影響を除去することが出来れば，より正確な代謝レスポンスの解析が可能になると考えられる．しかしながら，多変量解析に用いられる手法は一般的には線形であるが，多様な代謝反応の影響を受ける代謝物に対して特徴的な情報抽出が難しいことが問題である．そこで本研究では，非線形な解析手法の導入を検討し，従来の解析方法では見出すことの出来ない情報を抽出する解析法の確立を試みた．
【材料・方法】ヒト由来の非侵襲的サンプルである尿と唾液を解析対象とし，複数名のボランティアから採取した．各サンプルは Kpi/D_2O 溶媒を 10 分の 1 量添加し調製後，^{1}H-NMR で計測した．得られた計測データは数値化し, 確率的指数正規化を行い, ノンバケッティングのデータを R, 及び Matlab 言語を用いて各多変量解析を行った．
【結果・考察】本研究では NMR スペクトルから得られる多様な情報を可能な限り保持したまま多変量解析を行うために，従来のビン化処理等のデータリダクションを行わず，アライメント法を最適化し，ノンバケッティングデータによる多変量解析を可能にした．この方法により前処理した各データに対して，一般的に用いられる線形の主成分分析を行ったが，多くのプロットが一か所に集中し，サンプル間の特徴を見いだすことが出来なかった．そこで非線形手法であるカーネル主成分分析を行うと，プロットが全体的に分散し，何らかの特徴を反映していることがわかったため，カーネル主成分分析のスコアを基にクラスター解析を行い，各クラス間の特徴情報を抽出した．このクラス分けに貢献している物質を明らかにするために，cforest という機械学習で分類器を作成し，その分類に貢献した変数の重要度を算出し，これを因子負荷量が示せないカーネル PCA の因子負荷量として用いた．また，全てのピーク強度に対し，各クラス間の有意差を網羅的に検定することで，カーネル PCA の因子負荷量の妥当性を検証した．上記の解析フローを用いた唾液サンプルの解析結果から， 個体内の代謝変動として N-アセチル-L アスパラギン酸や酢酸，ピルビン酸といった物質が起床後から朝食前の時間帯にかけて特徴的に少なく，朝食後から日中を通して唾液中に比較的多く含まれることを見出した．以上のように，本研究で構築した非線形手法を取り入れた分析アプローチは，従来の線形の解析手法では見出すことのできない埋もれた代謝情報の発掘を可能にした．

non-invasive sample, big data, data mining

講演番号：3C25a10
講演日時、会場：3 月 28 日 10:49～ C 校舎 25 会場

代謝混合物の 2D-J NMR データの解析 web ツールの開発と量子化学計算による帰属支援

Development of web-tool for analyzing metabolite mixtures in 2D-J NMR data and assignment-assist by quantum chemistry calculation

○中山 超[1,2]、坪井 裕理[2]、伊達 康博[2,4]、近山 英輔[2,3]、菊地 淳[2,5] ([1]東理大・理、[2]理研 CSRS、[3]新国情大・情、[4]横市院・生医、[5]名大院・生命農)
○ Koyuru NAKAYAMA[1,2], Yuuri TSUBOI[2], Yasuhiro DATE[2,4], Eisuke CHIKAYAMA[2,3], Jun KIKUCHI[2,5] ([1]Grad. Sch. Sci., Tokyo Univ. of Sci., [2]RIKEN CSRS, [3]Grad. Sch. Inf. Stud., Niigata Univ. Int. Inf., [4]Grad. Sch. Med. Life Sci., Yokohama City Univ., [5]Grad. Sch. BioAgriSci., Nagoya Univ.)

【目的】
NMR を用いた代謝物群の網羅的解析では、1H-NMR法が一般的に用いられている。しかし2D-J NMR分光法を援用すると間接軸側のポイント数が少なく済むため計測時間が短く、また各シグナルの3JHHに基づく線幅の増大を間接軸側に展開するため、シグナル分離能も向上し、1D-NMRで帰属が難しかった物質の探索を可能にする。その代謝物質群の大量データから誰でも構造・探索・推定・同定を可能とするためには、標準化合物による化学シフトデータベースや J 値情報から様々な情報をユーザーフレンドリーに取り出す GUI ソフトウェア開発が有用である。そこで本研究では2D-J NMR法に基づいたデータベース検索・解析ツールの開発、さらに量子化学計算による帰属の精度向上を目的とした。
【方法・結果】
University of Birminghamの代謝物データベースライブラリ（ http://www.bml-nmr.org/ ）から取得された2D-J NMRのピーク、また当研究で測定した2D-J NMRのピークをBruker社の解析ソフトウェア TopspinおよびCMC-Assistにより J 値、化学シフト、強度情報を取得し、 500 代謝物以上の実測値データを MySQL により独自開発した検索用データベースに登録した。その後、プログラム言語 PHP を使いHTMLでの動作を可能にするとともに、データベース内の情報と標品の間で同一性の高い代謝物、化学シフト、 J 値データ等を直観的かつ網羅的に出力可能な代謝物アノテーションソフトウェアを開発した。このソフトウェアを用いることで、2D-J NMRスペクトルの各検出ピークに基づく代謝物の簡便かつ網羅的なアノテーションが可能となった。量子化学計算について、Gaussian社の量子化学計算ソフトウェアGaussian09を用い推定構造にはMM法、最適化構造にHF法、さらに NMR スペクトル値計算では、密度汎関数法B3LYP/6-31G*で計算を行った。得られた NMR スペクトル値より、データベース検索結果の候補物質と照らし合わせ、計算結果の外れ値から候補物質のさらなる絞り込みが可能となり、代謝物帰属手法へ進展があった。本会では、標品混合物や生体抽出物等に当該ツールを適用した解析結果についても、有用性や精度を交えて議論したい。

web tool, 2D-J, quantum chemistry calculation

講演番号：3C25a11
講演日時、会場：3 月 28 日 11:10～ C 校舎 25 会場

網羅的発現解析手法（HiCEP 法）の原核生物への応用

Application of HiCEP method to gene expression analysis of prokaryotes

裏地 美杉[1]、湯野川 春信[2]、砂山 美里[3]、荒木 良子[3]、万 クン[1]、○畑中 唯史[1] ([1]岡山生物研、[2]メッセンジャー・スケープ株式会社、[3]放医研)

Misugi Uraji[1], Harunobu Yunokawa[2], Misato Sunayama[3], Ryoko Araki[3], Kun Wan[1], ○Tadashi Hatanaka[1] ([1]RIBS, Okayama, [2]Messenger Scape Co., Ltd., [3]NIRS)

【背景・目的】

放線菌は、2 次代謝産物として抗生物質をはじめユニークな化合物を多く生産することから、ユニークな反応を司る酵素群も豊富に保有する微生物である。しかしながら、それらの酵素をコードする放線菌遺伝子は、GC 含量が高いため、大腸菌や酵母での発現が困難である。これまで我々は、*Streptomyces cinnamonues* TH-2 株において、高濃度リン酸塩およびグルコース含有培地で大量分泌する金属プロテアーゼ（SCMP）を発見し [1)]、SCMP のプロモーターを用いた新奇放線菌遺伝子発現系の構築を行った。既に SCMP プロモーターは、放線菌酵素の商業生産に利用されているが、酵素発現には長期間の培養が必要である。そこで現在、SCMP 遺伝子発現系の改良を目指し、TH-2 株の遺伝子発現解析に取り組んでいる。本発表では、（独）放射線医学総合研究所で真核生物向けに開発された、網羅的発現解析手法 (High coverage expression profiling = HiCEP）法を応用し、次世代シーケンサーによる放線菌遺伝子発現データベースの構築を試みる。

【方法】

S. cinnamoneus TH-2 株を、2% グルコースあるいは 2%グリセロールを含む培地でしんとう培養し、Mitani らの方法 [2)] に従い、培養時間 24 時間、36 時間の時点で RNA を調整し、HiCEP 法に供した。

【結果】2% グルコースで、培養 36 時間と比較し、24 時間で顕著に上昇するフラグメントを約 50 種検出した。現在、次世代シーケンサーによるデータベースを構築中である。

【参考文献】

1) T. Hatanaka *et al.*, *Arch. Biochem. Biophys.* **434**, 289-298 (2005)

2) Y. Mitani *et al.*, *J. Bacteriol*. **123**, 259-272 (2006)

【備考】

HiCEP 法の実施は、JST 先端計測分析技術・機器開発プログラムの支援を受け実施したものである。

HiCEP, *Streptomyces*

講演番号：3C25a12
講演日時、会場：3 月 28 日 11:21～ C 校舎 25 会場

HiCEP 法と次世代シーケンサーによる遺伝子発現データベースの構築

Construction of gene expression database by combination of HiCEP method and next generation sequencing

○湯野川 春信[3]、砂山 美里[2]、荒木 良子[2]、裏地 美杉[1]、畑中 唯史[1]([1]岡山生物研、[2]（独）放射線医学総合研究所　遺伝子・細胞情報研究室、[3]メッセンジャー・スケープ（株））
○Harunobu Yunokawa[3], Misato Sunayama[2], Ryoko Araki[2], Misugi Uraji[1], Tadashi Hatanaka[1]
([1]RIBS, Okayama, [2]Nat'l Inst. of Radiol. Sci. Transcriptome Research Group, [3]MessengerScape)

【背景・目的】HiCEP 法は、（独）放射線医学総合研究所で、真核生物向けに開発された、網羅的発現解析手法 (High coverage expression profiling = HiCEP）であり、これまでに、ヒト、マウス、プラナリア、CHO 細胞など多くの真核生物の遺伝子発現解析で実績を有する新技術である。本法の特徴としては、①配列情報の少ない生物種でも網羅的遺伝子発現プロファイルが得られること、②多くの未知遺伝子情報を得られること、③低発現の発現変動でも高感度・高信頼性で正確に検出できることなどの特徴を有している。しかしながら、HiCEP 法で検出した転写物の配列情報を得るには、煩雑な工程を必要とし、真核生物ではデータベース構築によりこの課題が克服されているが、原核生物では確立されていない。そこで、本発表では、放線菌を対象に得た HiCEP 解析結果から、次世代シーケンサーによる遺伝子発現データベースの構築を試みる。

【方法】*Streptomyces cinnamonues* TH-2 株を、2% グルコースあるいは 2%グリセロールを含む培地でしんとう培養し、Mitani らの方法 [1)]に従い、培養時間 24 時間、36 時間の時点で RNA を調整し、HiCEP 法に供した。また、HiCEP 用に調整した RNA 転写物を PCR により増幅しライブラリーを作成し、次世代シーケンサー（ライフテクノロジーズ社製イオン PGM）による配列解析を行い、得られた結果を、HiCEP データベース作成パイプライン HiNGeS を用いて、遺伝子発現データベースの構築を行った。

【結果】HiCEP 法により、2% グルコースで、培養 36 時間と比較し、24 時間で顕著に上昇するフラグメントを約 40 種に内、約 30 種の配列を予測することができた。これにより、HiCEP 法と次世代シーケンサーの組み合わせにより、簡便に遺伝子発現データベースの構築が可能であることが示された。

【参考文献】1) Y. Mitani *et al.*, *J. Bacteriol*. **123**, 259-272 (2006)

【備考】HiCEP 法の実施は、JST 先端計測分析技術・機器開発プログラムの支援を受け実施したものである。

HiCEP, high coverage expression profile, transcriptome

講演番号：3C25a13
講演日時、会場：3 月 28 日 11:32～ C 校舎 25 会場

化学発光を利用した HPLC ポストカラム法による Fe(III)キレーター分析法の開発と応用

Analysis of Fe(III) chelators by HPLC post-column method with luminol chemiluminescence detection

○有賀 智子、井村 祐己、鈴木 道生、吉村 悦郎（東大院・農生科・応生化）
○Tomoko ARIGA, Yuki IMURA, Michio SUZUKI, Etsuro YOSHIMURA (The Univ. of Tokyo)

【背景・目的】

Fe は光合成や呼吸における電子伝達系で重要な働きをするなど、高等植物に必須の元素である。イネ科植物は水に難溶な Fe(III)の効率的な吸収のため、Fe(III)キレーター(以下、FIC)であるムギネ酸類を根から分泌し、Fe(III)を可溶化して吸収する。植物体内における Fe の輸送は導管、及び篩管を通じて行われるが、導管液は弱酸性、篩管液は中性～弱アルカリ性を示す。これらの液中における Fe(III)の溶解度は低いことから、Fe(III)は植物体内では何らかの FIC と結合した状態で輸送されていると予想される。これまでの研究でクエン酸などの有機酸やムギネ酸類が Fe(III)の輸送に関わっていることが示されている。このように FIC は植物における Fe の吸収・輸送に大きく関与しており、その化学的分析システムを構築することは Fe が関わる多くの生理学的機構の解明に必須だと考えられる。本研究は FIC の分離・検出のため、化学発光物質を検出試薬として用いた HPLC ポストカラム法の開発、及び植物サンプル中の FIC 分析への応用を目的とした。

【実験・結果】

ルミノール(5-amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazinedione)は pH 9～11 のアルカリ溶液中において Fe(II)や $K_3Fe(CN)_6$ などの酸化補助剤存在下で H_2O_2 により酸化され、強い化学発光を生じる。本研究では、Fe(III)-FIC 複合体をルミノールの酸化反応の酸化補助剤として用い、ルミノールの化学発光強度をモニタリングすることで FIC の分析を試みた。分析サンプルにはあらかじめ Fe(III)を加えてインキュベートし、サンプル中の FIC と結合させた。この Fe(III)-FIC 複合体を HPLC カラムで分離したのち、ポストカラム溶液と反応コイル内で反応させた。ポストカラム溶液にはルミノールと H_2O_2 が含まれており、Fe(III)-FIC 複合体の存在下で生じる化学発光を化学発光検出器で検出した。

本分析法を用いて代表的な Fe(III)キレーターである EDTA、クエン酸、そして植物由来の Fe(III)キレーターとしてよく知られるニコチアナミン（以下、NA）の分析が可能であった。分析条件の最適化を行った結果、非常に高感度での Fe(III)-EDTA、Fe(III)-クエン酸、及び Fe(III)-NA の検出が可能であった。検出限界はそれぞれ 0.25 pmol、2.34 pmol、1.12 pmol であり、既存の HPLC ポストカラム法、またはプレカラム誘導体化法による有機酸、及びムギネ酸類の分析法と比べてより低濃度の検出限界が達成できた。また、本分析法を用いて植物サンプルを分析し、複数の FIC 由来と予想されるピークを検出することに成功した。

high-performance liquid chromatography, mugineic acid family compounds, phytosiderophores

講演番号：3C25a14
講演日時、会場：3 月 28 日 11:43～ C 校舎 25 会場

TLC を用いた環境水中アクリル酸の簡便定量法の開発

A Simple TLC-Densitometric Method for the Quantification of Acrylic Acid in Aqueous Solutions

○佐野 芽生、陳 泰駿、麻生 祐司、小原 仁実（京都工芸繊維大学）
○Mei Sano, Taejun Chin, Yuji Aso, Hitomi Ohara (Kyoto Institute of Technology)

【目的】末端不飽和結合を有するアクリル酸は高吸水性樹脂の原料として重要な基幹化学物質である。アクリル酸は生物毒性を示すため、環境中のアクリル酸濃度を適宜分析する必要がある。水環境中のアクリル酸濃度の分析には、HPLC や GC などの分析装置を用いる方法が主流であるが、操作性と簡便性に欠ける。本研究では、より簡便に水環境中のアクリル酸濃度を分析する手法の開発を目的として、TLC を用いた新たな手法の開発を行った。
【方法】Heck 反応を用いて、水溶媒中で 0.01～10 mM アクリル酸の末端不飽和結合に 50 mM ヨードベンゼンを付加させた。このとき、反応条件を変化させ、付加反応率を HPLC により調べた。また、生成物の構造を ^{1}H NMR および LDI-MS により解析した。次に、付加反応物を酢酸エチルで抽出後、silica gel 60 F_{254} TLC プレートにスポットし、クロロホルム／メタノール／酢酸（90:10:1）を用いて展開した。得られたスポットをデンシトメーターで定量し、HPLC での定量結果と比較評価した。さらに、1 mM アクリル酸を添加した河川水・湖水を用いて開発した手法の評価を行った。
【結果と考察】1 mM アクリル酸へのヨードベンゼンの付加反応は、60℃、30 min の条件で最も良い付加反応率（98.2 ± 1.2%）が得られた。本反応では、パラジウム触媒として FibreCat 1001、塩基として炭酸カリウム、溶媒として 50% DMSO が最良の組み合わせであった。構造解析により、付加反応物は *trans*-桂皮酸であることを確認した。TLC での定量性は HPLC での定量結果と同程度（96.0%）であった。また、付加反応物の検出限界は 0.1 nM であった。さらに、開発した手法を用いて環境水中のアクリル酸濃度を定量した結果、HPLC での定量結果と比べて同程度（97.0～103.0%）であった。以上の結果より、本手法は水環境中のアクリル酸濃度を分析するために有効であることが示された。
【参考文献】Sano *et al.*, *J. Planar Chromatogr.*, in press (2015).

Acrylic acid, TLC

講演番号：3C25a15
講演日時、会場：3 月 28 日 11:54～ C 校舎 25 会場

グラム陰性菌リポ多糖構成分子 lipid A の LC-MS 分析法の確立
LC-MS analysis of lipid A, the lipophilic moiety of lipopolysaccharide derived from gram-negative bacteria
○大石 美月、吉川 悠子、大島 寛史、三好 規之（静岡県大食栄科学）
○Mizuki OHISHI, Yuuko YOSHIKAWA, Hiroshi OHSHIMA, Noriyuki MIYOSHI (Shizuoka Univ.)

ヒトや実験動物への高脂肪食負荷後に血中エンドトキシン濃度が上昇することや、肥満、2 型糖尿病、冠動脈疾患、脂肪肝などではエンドトキシンによる toll 様受容体（TLR)－NF-κB 経路を介した免疫活性化が認められていることから、腸管内に存在するグラム陰性細菌由来の細胞壁構成分子 lipopolysaccharide（LPS)の一部が血中に移行し、生活習慣病に関連する持続的な低レベルの炎症の引き金を引く可能性が指摘されている。LPS のエンドトキシン活性を担う最小単位は脂溶性ユニットである lipid A であり、その基本化学構造はグルコサミン 2 分子が結合したジグルコサミンにリン酸基や脂肪酸が複数結合した saccharolipid である。大腸菌 *Escherichia coli* などでは、培養条件に依存した lipid A 化学修飾が誘導され、エンドトキシン活性に影響することが示唆されている。それゆえ、腸管微生物由来エンドトキシンは各菌種のゲノム情報に加えて腸内環境の変化に依存したエンドトキシン活性変化を示すことが予測される。*E. coli* の天然型 lipid A はリン酸基が 2 つ結合しており CD14-TLR4-MD2 に対する強いリガンド活性を示すが、リン酸基が一つ脱離した lipid A アナログ（monophosphoryl lipid A）は、抗アルツハイマー病効果（PNAS, 110, 2013）や抗インフルエンザ効果（Nature, 497, 2013）などの薬理作用（免疫賦活活性）を示すことが最近報告されている。それゆえ、本研究では生体内 lipid A の質的・量的変動を詳細に解析することを目的として、LC-MS を用いたハイスループットなノンターゲット分析法の確立を目指した。HPLC 分離条件は、lipid A リン酸基の *p*Ka と質量分析でのイオン化効率を考慮した弱塩基条件で行い、感度良く分離・検出できることを確認した。市販の *E. coli* 由来標準 LPS を用いて lipid A 調製条件を検討し、弱酸性条件でマイルドに加水分解を行うことで安定に調製できることを確認した。これらの方法を用いて、*E. coli*、*Salmonella typhimurium*、*Pseudomonas aeruginosa*、*Klebsiella pneumoniae*、*Serratia marcescens* 由来 LPS 標準品から lipid A を調製し LC-MS で感度・精度良く分析できることを確認しており、タンデム MS システムを用いた分析より各菌種由来 lipid A の構造予測を行った。現在、実試料分析への応用を目指し、本分析法の更なる高感度化を検討している。

Lipid A, endotoxin, LC-MS

講演番号：3C25p01
講演日時、会場：3 月 28 日 14:00～ C 校舎 25 会場

再生利用が可能な表面プラズモン共鳴センサーへのリガンドの新規固定法

A new immobilization method of a ligand for a compact SPR-based sensor to make sensor chip reusable

○奥村 史朗[1]、岩倉 宗弘[2] ([1]福岡県工技セ、[2]九州計測器)
○Shiro OKUMURA[1], Munehiro IWAKURA[2] ([1]Fukuoka ITC, [2]Kyushu Keisokki)

【背景】表面プラズモン共鳴（surface plasmon resonance）センサーは、ガラス薄膜上の金属薄に生じる電磁波の共鳴現象を利用して金属膜の表面における質量密度の変化をリアルタイムに計測可能なセンサーで、分子間の親和定数の計測などの相互作用解析に用いられている。解析にあたっては、計測用のセンサーチップ上に一方の分子（リガンド）を固定化し、センサーチップのセルにもう一方の分子（アナライト）を含む溶液を満たして、膜表面の質量密度変化を計測する。親和定数を決定するには濃度の異なる複数のアナライト溶液について測定を行う必要があり、次の測定のためにアナライトをリガンドから強制的に解離させる再生操作が必須となる。リガンドがタンパク質の場合には、再生操作により変性し、その後の測定に影響を及ぼすことが多く、リガンドが変性しない再生条件の検討が必要となる。そこで、再生が不要となるような、DNA ハイブリダイゼイションを利用したセンサーチップへのリガンドの固定化方法を検討した。
【方法・結果】まず薄膜上にアタッチメント DNA 鎖 (A) を固定化する。次に、A の相補 DNA 鎖 (B) とリガンドとを共有結合で連結したコンジュゲートである B-リガンドを、A-B 間ハイブリダイゼイションを介して薄膜上に固定化する。この系にアナライトを流し、アナライトとリガンドとの相互作用を検討する。A-B の結合は DNA ハイブリダイゼイションであり、弱アルカリ溶液で容易かつ完全に解離することから、測定ごとに新たな B-リガンドを薄膜上に配置可能で、再生操作によるリガンドの変性の影響をなくすことができる。DNA 鎖の設計にあたっては、DNA 鎖単独での二次構造形成に伴う自由エネルギー変化および A と B が結合した二本鎖 DNA の相転移温度の予測値を参考に、B の結合量が大きく、また非相補鎖との非特異的結合が少なくなるように考慮した。設計した DNA 鎖の特異性は小型 SPR センサー（九州計測器製）を用いて検討した。まず、セルの薄膜上にチオール基を介して 7-carboxy-1-heptanethiol の自己組織化単分子膜を形成し、このカルボキシル基に 5‘末端にアミノ基をもつ一本鎖 DNA (A) をアミンカップリング法により固定化した。各チャンネルに配列の異なる A を固定化したのち、それぞれと相補的な B との結合を測定した。分子間相互作用のモデルとして食中毒菌遺伝子およびそれの相補的 DNA 鎖、βラクトグロブリンおよびそのウサギ抗体、オボアルブミンおよびそのマウス抗体を用いた。

surface plasmon resonance, DNA hybridization

講演番号：3C25p02
講演日時、会場：3 月 28 日 14:11～ C 校舎 25 会場

生物化学工学分野で使用可能な蛍光式酸素センサーパッチの開発

Development of florescent oxygen sensor for biotechnology field

○富田 悟志、妙園薗 勉、石川 周太郎 (エイブル株式会社)
○satoshi tomita, tsutomu myoenzono, shutaro ishikawa (ABLE corporation)

「背景」
生物化学工学分野において酸素濃度のモニタリングは重要な指標である。既存のガルバニ電池式の酸素センサーは、応答性が早く入手性が良い反面、線流速の強さにより実際よりも高い酸素濃度を示す、測定対象容器が限定される、部品点数が多く人為的なミスを誘発しやすい、などの問題点が存在する。一方で蛍光式の溶存酸素センサーはこうした問題解決の可能性を秘めており、特にセンサーパッチの小型化、非接触測定によってこれまで構築できなかった実験系の構築が期待される。しかしこれまでの蛍光式酸素センサーは用途へのカスタマイズ対応や、高価格であることがボトルネックであった。我々は、こうした背景から、国産の蛍光式溶存酸素センサーパッチの開発を試みた。
「方法」
蛍光素子の候補として白金ポルフェリンを採用した。位相角と振幅（蛍光強度）を測定したところ 0～100％の溶存酸素濃度において直線性を示した。白金ポリフェリンを一定の大きさに破砕、シリコン接着剤と混合しセンサーパッチを作成し、応答性、再現性、安定性、滅菌対応性を評価した。さらに高い線流速での出力の変化と非接触での測定について確認した。測定は 508nm の波長の励起光を一定の出力で制御し、580nm の波長の蛍光の変化で定量した。
「結果」
センサーパッチのロット間誤差は酸素濃度が、0%の時に±0.4%、100%の時に±1.9%と高い均一性を示した。作成したセンサーパッチは、複数回の高圧蒸気滅菌で処理し、その影響を評価した。その結果、0％と 100％の時の位相角差が徐々に減少すること、100%の時の振幅が増加する現象が見られた。センサーパッチは大気、液体環境下において同様の応答性を示した。センサーパッチは安定しており、実験期間中での蛍光退色は観察されなかった。センサーパッチを透明な容器の内側に貼り、外部から励起光を照射したところ、接触させた場合と同等の酸素濃度の変化が確認された。滅菌耐性は高圧蒸気滅菌、ガンマ線滅菌、ともに耐性が確認されが、ガンマ線は照射量によって振幅が大幅に下がる現象が観察された。蛍光素子は粒径 60μm 以下に落としても高い感度を示した。上記の結果から、今回開発した酸素センサーパッチは生物化学工学分野での使用可能であること、更に微細な環境での測定系構築への応用が考えられる。

fluorescent oxygen sensor, non invasive, gamma irradiation resistance

講演番号：3C25p03
講演日時、会場：3 月 28 日 14:22～ C 校舎 25 会場

汎用的な細胞内温度計測を目指したレシオ型蛍光プローブの開発

A cationic fluorescent polymeric thermometer for the ratiometric sensing of intracellular temperature

○辻 俊一[1]、井門 久美子[1]、河本 恭子[2]、林 晃之[3]、稲田 のりこ[3]、吉田 有人[1]、内山 聖一[2]([1]キリン基盤研、[2]東大薬、[3]奈良先端大)
○Toshikazu TSUJI[1], Kumiko IKADO[1], Kyoko KAWAMOTO[2], Teruyuki HAYASHI[3], Noriko INADA[3], Aruto YOSHIDA[1], Seiichi UCHIYAMA[2] ([1]Kirin Co. Ltd., [2]Tokyo Univ., [3]NAIST)

細胞機能は、細胞内の温度と密接に関連しており、最近の研究で、核分裂を担う中心体が細胞質と比べて高温であることや、細胞分裂依存的に核と細胞質に温度差が生じるといった興味深い現象がわかってきている。我々は、このような生細胞内の温度計測をより正確かつ簡便とする高分子蛍光プローブの開発に取り組んでおり、昨年度本大会で、新たな蛍光プローブ“CFPT”を報告した。CFPT は、酵母細胞や動物細胞に自然に取り込まれる優れた性質をもち、かつ高い温度分解能（最高 0.1℃）の計測が可能である。しかし、CFPT の濃度や励起強度の影響を受けない測定パラメータとして蛍光寿命の選択が不可欠で、高価な蛍光寿命計測装置が必要となるなど汎用性に課題が残っていた。

そこで本研究では、細胞内温度計測法の汎用性向上を目指し、温度変化によって二波長における蛍光強度比が変化する、いわゆるレシオ型蛍光プローブの開発を行った。これにより、一般的な蛍光光度計や蛍光顕微鏡を用いても細胞内温度や温度分布の高精度計測が期待できる。

レシオ型蛍光プローブは CFPT を改良して作製した。具体的には、CFPT に用いた蛍光性ユニット DBThD の対照となる新たな蛍光性ユニットを選択、導入することとした。必要条件としては、①蛍光特性が周囲の環境因子に影響されないこと、②DBThD と同じ波長で励起できること、③DBThD と蛍光スペクトルが重複しないこと、を設定した。これら条件を満たす蛍光色素として BODIPY 骨格を選択し、新規の蛍光モノマーBODIPY-AA を設計、合成した。続けて CFPT の構成ユニットに加え、BODIPY-AA を追加ユニットとして高分子合成を行い、レシオ型蛍光プローブ R-CFPT を完成させた。

この R-CFPT の浮遊性ヒト細胞 MOLT-4 への導入を試みたところ、25℃、10 分間の条件下で 90 %以上の細胞に取り込まれることが分かった。さらに、蛍光プローブが導入された MOLT-4 細胞懸濁液について、外部温度を変化させたところ、２つの蛍光色素（BODIPY と DBThD）の蛍光強度比と温度との間に高い相関関係が確認できた。温度分解能は、28～44℃の温度範囲で 0.03～0.20℃の非常に高い値を示した。この応答温度範囲の広さと精度は、現在までに報告されている細胞内温度計測用蛍光プローブの最高レベルである。また、R-CFPT は接着性ヒト細胞 HEK293T にも 90%以上の高効率で取り込まれ、蛍光顕微鏡観察により既報と同様に核内が細胞質よりも高温であることを示す像が得られた。

以上のように、本研究で開発した新規レシオ型蛍光プローブ R-CFPT は、一般的な蛍光検出装置であっても幅広い温度応答範囲で高精度な温度計測を実現できることが明らかとなった。既に筋肉細胞等の他の細胞についても温度イメージングに成功しており、今後、様々な分野での利用が期待される。

Intracellular temperature, ratiometry, fluorescent thermometer

講演番号：3C25p04
講演日時、会場：3 月 28 日 14:33～ C 校舎 25 会場

薄層リング電極を用いたアンペロメトリックセンサーの開発

Ultrathin-ring Electrode for the Amperometric Sensing

○北隅 優希、濱本 勝美、白井 理、加納 健司（京大院農）
○Yuki Kitazumi, Katsumi Hamamoto, Osamu Shirai, Kenji Kano (Kyoto Univ.)

緒言

試料中の目的物質を定量することは科学技術の基礎である。選択性の高さ、測定の精度などの観点からさまざまな定量法が開発されている。その中で、電気化学的手法は、溶液中の酸化還元物質の濃度を決定する、迅速さと簡便さに優れた手法である。電気化学センサーは、電気化学的手法に基づいて濃度を決定するデバイスであり、酸化還元反応に伴う電子移動を電流として検出するアンペロメトリックセンサーは、例えば酸素センサーやグルコースセンサーとして実用化されている。ところが、通常の電極反応では電極表面で目的物質が消費されるため、電流は時間経過とともに徐々に低下する。この濃度分極はアンペロメトリックセンサーにおいて好ましくない特性であり、電流を決定する律速段階を、例えば基質の膜透過反応や酵素電極反応とすることにより、時間に依存しない定常電流を得る工夫がなされている。一方で直径が数 10 μm 以下の微小電極は非線形な物質供給により容易に定常電流を得ることができるが、電流の絶対値が極めて小さいために実用的なセンサーを構築することが出来ない。そこで、我々は以前から微小電流の定常電流特性を持ちながら大きな応答の得られる電極として薄層リング電極の設計と開発を行ってきた。

実験

薄層リング電極は直径 2 mm の UV 硬化樹脂棒表面に厚さ 100 nm の金薄膜をスパッタリングで形成し、その上を UV 硬化樹脂で封止後、端面を削り出すことで作成した。電極の特性は水溶液中におけるフェロセンジメタノール(FDM)の酸化還元挙動から評価した。

結果と考察

電流電圧曲線を記録したところ、FDM の酸化に伴うシグモイド型のボルタモグラムが記録された。その形状は可逆応答のボルタモグラムであり、薄層リング電極の応答が解析可能であることがわかった。また、電流時間曲線の挙動も、理論的な解析式とよく合うことも確認された。FDM の濃度が 1 mmol dm^{-3} の場合に記録されたボルタモグラムの定常電流は 140 nA であった。この電流は微小ディスク電極の場合では直径約 600 μm に相当し、もはや微小ではなく実現不可能である。以上の結果は、薄層リング電極が素性の良い極めて強い応答を得ることのできる電極であることを示しており、酸化還元酵素反応と共役させることでより簡便で大きな応答を示すバイオセンサーの構築も可能である。

microelectrode, steady-state current, amperometric sensor

講演番号：3C25p05
講演日時、会場：3 月 28 日 14:44～ C 校舎 25 会場

全血糖範囲測定を目指した分子センサー／グルコース親和性の制御
Controlled affinity between molecular sensor and glucose toward detection of total blood glucose concentration range
○鈴木 良順、甲元 一也（甲南大 FIRST）
○Ryojun SUZUKI, Kazuya KOUMOTO (Konan Univ.)

【研究背景】
糖尿病の早期発見を可能とする安価で簡便な血糖値センサーの開発が求められている。現在使われている酵素センサーは高いグルコース選択性、血糖値を測定するための広い検出範囲をもつが、安定性に難をもつ。そこで、注目されるのがボロン酸分子センサーである。ボロン酸分子センサーは、半永久的な安定性、グルコースに対する高い選択性をもつが、その検出範囲が狭いこと（数ｍｇ/ｄＬから数十ｍｇ/ｄＬ）が実用化の妨げとなっている。ヒトの血糖値である数ｍｇ/ｄＬから１０００ｍｇ/ｄＬに検出範囲を広げることがボロン酸分子センサーを実用化する鍵となるが、その具体的方法論は報告されていない。我々の研究室では、細胞内の代謝産物（グリシンベタイン）を基体としたアナログライブラリー（ベタイン型添加剤）を創製し、それらが及ぼす細胞機能への影響を調べてきた。その中で特定の化学構造をもつベタイン型添加剤を酵素反応溶液に共存させると、種々の酵素の活性が上昇することを明らかとした。また、溶液物性解析の結果、この添加剤は水に溶解すると自身が強く水和することで溶液中の分子（酵素や基質等）の水和環境を変化させ、間接的に酵素 - 基質相互作用を増強させる活性化機構が推定された。この機構は酵素 - 基質系のみならず、分子センサー - 基質系でも作用すると考えられる。そこで、本研究ではベタイン型添加剤を使ってボロン酸分子センサーとグルコースとの親和性を制御することで、検出範囲を広げることを目的に研究を行った。
【実験結果】
先行研究からベタイン型添加剤の構造や濃度によって、分子間相互作用に与える影響が変化することが明らかとなっている。そこで、ベタイン型添加剤の構造がボロン酸分子センサーのグルコース結合性に与える影響を評価したところ、ベタイン型添加剤の存在下（５００ｍM）、ベタイン型添加剤のアンモニウム基に導入されるアルキル鎖が長いものほど、センサーのグルコース結合範囲が高濃度側にシフトすることが明らかとなった。また、最も効果の高かったベタイン型添加剤（アンモニウム基に３つの *n*-ペンチル基が導入された化合物）の濃度を上昇させると、７５０ｍMでグルコースの検出範囲がヒトの血糖値の上限を超える１８００ｍｇ/ｄＬに達することが明らかとなった。つまり、ベタイン型添加剤の濃度を変えるだけで、検体を希釈することなく１．８～１８００ｍｇ/ｄＬという広い濃度範囲を検出できることが示された。このような希釈を伴わない方法での結合範囲の拡張はセンサー機器開発にも有効であると考えられる。講演では、これらの実験結果の詳細について報告する。

glucose, betaine, sensor

講演番号：3C25p06
講演日時、会場：3 月 28 日 15:05～ C 校舎 25 会場

C4D 検出器を利用した NFT 型水耕液の簡易分析(その 2)

Application of a capacitively coupled contactless conductivity detector for a simple analysis of the nutrient film technique (NFT) hydroponic solution

○長谷部 誉人[1]、東 良太[1]、吉野 将紀[2]、岡部 勝美[2]、安保 充[1] ([1]明治大農・農化、[2]明治大・黒川農場)

○Takato HASEBE[1], Ryota AZUMA[1], Masaki YOSHINO[2], Katsuyosi OKABE[2], Mitsuru ABO[1] ([1]Meiji Univ.,School of Agriclture, [2]Meiji Univ., Kurokawa Farm)

【目的】太陽光利用型植物工場では、その栽培管理に水耕液の温度、pH、電気伝導率(EC)等がモニタリングされているが、日照、気温などの変動する要因も多い。この条件下で、より生産性を高めるためには、植物の生育状況に応じて変化する水耕液中のミネラルの欠乏および過剰をモニターしておく必要がある。そこで、今回無機成分の簡易測定法を最適化し、ホウレンソウの NFT 型水耕液の分析に応用した。

【方法および結果】主要栄養素として、K^+, Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^+, NO_3^-,SO_4^{2-},PO_4^{3-}を分析対象とし、分析にはキャピラリー電気泳動装置(Quanta 4000E, Waters)、検出には C^4D (Capacitively coupled contactless conductivity detector: 非接触型電気伝導度検出器, ET120, eDAQ)を用いた。キャピラリーは内径 50 μm, 外径 375 μm のフューズドシリカキャピラリーを用い、有効長 45 cm (全長 60 cm)の位置に C^4D を取り付けた。泳動液について陽イオンは Kuban らの報告[1)]を参考に、12 mM ヒスチジン- 117 mM 酢酸(pH 3.7)を用いた。陰イオンは田中らの報告[2)]を参考に 10 mM ヒスチジン- 50 mM リンゴ酸 (pH 3.0)を用いた。陰イオンの分析ではベースラインが不安定であったため、PVA コーティングキャピラリーも併せて用いた。ホウレンソウの NFT 型循環水耕液中の主要無機成分の分析結果を報告する。

1) Kuban *et al.*, *Electroanalysis* 18, 13-14, 1289-1296 (2006)
2) Tanaka *et al., Chromatogr.* 34, 2, 89-96 (2013)

Capacitively coupled contactless conductivity detector, C4D, Plant Factory

講演番号：3C25p07
講演日時、会場：3 月 28 日 15:16～ C 校舎 25 会場

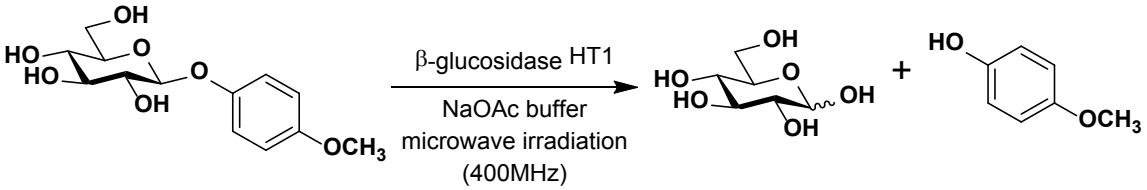
β-グルコース加水分解酵素反応における低周波マイクロ波効果の研究

Study of microwave effect for glycosidase

○長島 生[1]、杉山 順一[2]、清水 弘樹[1] ([1]産総研生物プロセス、[2]産総研ナノシステム)
○Izuru NAGASHIMA[1], Jun-ichi SUGIYAMA[2], Hiroki SHIMIZU[1] ([1]AIST BPRI, [2]AIST NRI)

現在､化学反応用に市販されているマイクロ波反応装置はISMバンドのひとつである周波数2.45GHzが用いられている。家庭用電子レンジにも 2.45GHz 帯が使われている様にマイクロ波の効率加熱特性は一般に広く認知されているが、近年、マイクロ波による化学反応促進効果は単なる加熱特性に因るだけではないということが明らかにされつつある。我々はそのマイクロ波特有の効果の解明を目指し、昨年度の本会(講演番号 4A02a13)において周波数を変えた場合の酵素反応について報告した。まず、エキソ型β-グルコース加水分解酵素であるβ-グルコシダーゼ HT1 （株式会社耐熱性酵素研究所）を用いた4-メトキシフェニルグルコシドの加水分解反応を2.45GHz と 5.80GHz のマイクロ波で温度制御した場合、2.45GHz ではより低温でも反応が進行し至適温度の低下が観察されたが、5.80GHz では特段の効果が見られなかった。さらに、溶媒である酢酸ナトリウムバッファーの複素比誘電率を測定したところ、5.80GHz では誘電損失のみが働き水分子選択的にマイクロ波が作用し、2.45GHz では誘電損失と導電損失の両方が関与して水分子の他イオンにも作用したことが分かった。酵素の安定性や反応には反応基質の水分子の他、イオンも深く関与することから、2.45GHz のマイクロ波照射はイオンに作用して酵素反応を促進させたと考察した。この考察に基づくと、導電損失のみが働くような低周波数帯を照射した場合に、より促進効果が得られると期待できる。そこで今回、400MHz の装置を用いて、本反応について検討したのでその結果について報告する。

まず、400MHz マイクロ波を水、バッファー、基質溶液それぞれに照射し温度の上昇度を測定したところ、予想通りにイオンを含まない水や基質溶液はあまり加熱されず、導電損失が作用するイオンを含むバッファーはわずか 2.5±0.1W の出力で 50-60℃まで容易に加熱された。そこで実際に酵素反応を行ってみたが、通常加熱の場合と比べ効果があまり見られなかった。また、イオンの種類の違いによる差をみるため酢酸ナトリウムバッファー以外の緩衝液も検討したが、やはり反応率の劇的な向上は見られなかった。これらの結果は、400MHz マイクロ波は吸収量が大きく、非常に弱い出力でバッファー水溶液を加熱できてしまうため、マイクロ波効果が十分に得られていないのではないかと考えている。



microwave, carbohydrate, enzyme

講演番号：3C25p08
講演日時、会場：3 月 28 日 15:27～ C 校舎 25 会場

精密合成対応型マイクロ波反応装置の開発と、その特性

Development of microwave-assisted synthesizer for organic synthetic chemistry

○清水 弘樹[1]、長島 生[1]、大木 裕太[2]、高橋 直行[2] ([1]産総研生物プロセス、[2]東京理化器械 開発部門)
○Hiroki SHIMIZU[1], Izuru NAGASHIMA[1], Yuta OKI[2], Naoyuki TAKAHASHI[2] ([1]AIST BPRI, [2]TOKYO RIKAKIKAI Development)

2.45GHz のマイクロ波を照射すると物質は効率的に加熱され、この特性を利用して電子レンジは作られている。近年、化学合成分野でもマイクロ波は汎用され、以前からマイクロ波利用反応装置は国内外で市販されていた。しかし、マイクロ波の特性を生かすため効率的に加熱することに主眼がおかれていることやマイクロ波照射下での正確な温度測定が困難であったことなどから、精密な温度制御機能が備わっているものは多くなかった。我々は、2005 年ごろに化学反応においてマイクロ波が効率加熱特性を有するだけでなく低温中でもユニークな効果を与えることを見出したが、既存の装置では学術的に信用できるデータが得られにくいとも考えた。

そこで合成化学者の見地より機能付加させたマイクロ波反応装置 MWS シリーズを 2012 年に開発した。MWS シリーズではシングルモードのマイクロ波を利用して、実際の吸収量（反応電力）の測定を可能とし、±1℃以内の精密温度制御、試薬添加・溶媒交換のセミオート化、反応槽の攪拌・振動両モード機能付加など、実務面で合成化学者の好みにあった機能が備わり、ペプチドの固相合成や酵素反応へのマイクロ波利用を容易にした。実際、ペプチド合成では 40 残基程度までのペプチドは数日間で合成可能となった。また、糖加水分解酵素による反応では、2.45GHz のマイクロ波が至適温度を低下させる効果も本装置によって見出した。

しかし MWS シリーズで加温設定にすると、照射マイクロ波出力が非常に弱いところで自動的に ON/OFF になり、低温条件下ではマイクロ波効果を得ることが容易でなかった。そこで、反応槽をアルミブロックで囲い、外部から冷却・加温することを可能とした GPS シリーズの開発を進めた。低温下でのマイクロ波照射が可能になることで、一般に低温で反応を進める精密合成や不斉反応、糖鎖合成などにもマイクロ波の適応が十分に可能となり、またマイクロ波発振源に半導体を使うことでマイクロ波の精度も高め、マイクロ波吸収量（＝反応電力）をより正確にモニターすることで反応率を随時計算することが可能になった。本発表では、装置特性について、実際の反応データも含めて報告する。



マイクロ波反応装置
GPS-1000 (EYELA)

microwave, synthesizer, organic synthesis

講演番号：3C25p09
講演日時、会場：3 月 28 日 15:38～ C 校舎 25 会場

デュアルフィルトレーションを用いた細菌検査試料前処理法の開発

Development of dualfiltration system for pretreatment at bacteriological operation

○種田 明子、金政 真（中部大・環境生科）
○Akiko TANADA, Shin KANAMASA (Dept.Envi.Biol.,Chubu Univ.)

【目的】

近年のグローバル化を背景に、食品企業は自ら食品の安全の義務を負うようになり、それに伴い食品微生物検査では、自主検査を行って試料中の微生物をより迅速かつ精度良く検出することが求められている。さまざまな微生物検出法の開発、実用化研究がなされているが、試料中の微生物をより効率的に検出するためには、試料を濃縮して微生物の濃度を高める前処理法の開発が急務である。細菌の濃縮法としては、免疫磁気ビーズ法、遠心分離法及びろ過法が挙げられる。我々は、数十 mL～数 L 以上の試料を一連の流路内で処理可能なろ過法を考案し、操作が簡便かつ安価なろ過式濃縮装置の開発に取り組んでいる。

今回は、清涼飲料水とその原水、食品製造用水の細菌検査における試料中の細菌濃縮を想定し、二段階のフィルタろ過を用いて試料に含まれる食品残渣の除去と細菌の濃縮を行う工程の検討を行った。

【方法・結果】

試料液中の細菌を効率的に検出するための前処理法の検討として､残渣を除去する 1 次フィルタと、細菌を捕捉し回収して濃縮液を得る 2 次フィルタの試験を行った。1 次フィルタの試験では、各種メンブレンフィルタ孔径 5～8 μm 及びナイロンネットフィルタ網目 10～60 μm に大腸菌添加生理食塩水を通過させて、大腸菌の通過率を計測した。ナイロンネットフィルタで良好な通過率が得られた。2 次フィルタの試験では、孔径 0.20 μm 及び 0.45 μm の各種メンブレンフィルタに大腸菌添加生理食塩水を通過させて大腸菌を捕捉した。次いで、少量の生理食塩水を逆流させて細菌を回収し、得られた濃縮液の細菌回収率を計測した。親水性 PTFE 他で良好な回収率が得られた。現在、清涼飲料水とその原水及び食品製造用水等に対するフィルタの適応評価を行っている。

bacteriological operation, dualfiltration system, concentration

講演番号：3C25p10
講演日時、会場：3 月 28 日 15:49～ C 校舎 25 会場

光学式微生物微小コロニー検査装置の開発

Development of fluorescent microcolony detecting system

○海谷 慎一[1]、中内 茂樹[2] ([1]豊橋技科大 環境生命工、[2]豊橋技科大 情報知能工)
○Shinichi KAIYA[1], Shigeki NAKAUCHI[2] ([1]Dept. of Environ. and Life Sci., Toyohashi Univ. of Tech., [2]Dept. of Computer Sci. and Engineering, Toyohashi Univ. of Tech.)

【目的】
一般的に食品の衛生管理は社会的な関心が高く、近年食品衛生問題が大きく取り沙汰されていることからも、食の安全・安全を確保することは食品業界におけるもっとも重要な課題の一つである。現在食品中の微生物数を調べる手段として、特にコロニー形成能を持つ微生物数をカウントする平板培養法が広く用いられる。しかしながら、平板培養法はコロニーが肉眼もしくは機械的に識別できるまでに長時間の培養期間を要することが問題点としてあげられ、これまでにも迅速にコロニー形成細菌を検査する方法として、培養初期段階の微生物コロニーを蛍光染色や ATP 発光を利用して検出する検査法などが提案・検証されている。今回我々はメンブレンフィルタと蛍光染色剤を用いて、平板培養時の微小コロニーを高感度に検出する装置を製作し、感度の向上に関する工学的な検討と、夾雑物と微生物コロニーを識別するための検出法についての研究を行った。
【方法】
試験を行うに当たり、LED を用いた励起光源と市販のサイエンスカメラによる検出器を取り付け、蛍光検出用の光学フィルタを備えた検査装置を設計した。メンブレンフィルタにはセルロース混合エステル系メンブレンを用い、モデル微生物には大腸菌、擬陽性試験用の試料には破砕・懸濁した緑色野菜を用いた。設計した検査装置のコロニー検出限界は、撮影画像上で光点として検出できる最小段階の微生物コロニーから求めた。得られた微生物コロニーの構成菌数は蛍光顕微鏡を用いて計測した。擬陽性試験には、菌液に滅菌処理済みの擬陽性試料を投入したものを検査試料として用いて、培養後のコロニーと夾雑物に対する識別能を評価した。
【結果・考察】
微小コロニーの高感度撮影を行った結果、本検出装置により、100 匹以下から構成される大腸菌の微小コロニーを非殺菌的に検出できることが確かめられた。擬陽性試験では、測定後の画像処理によりほぼ 100%の割合で夾雑物と微小コロニーを識別することが可能だった。以上のことから、本研究で設計した微小コロニー検査装置を用いて迅速なコロニー検査が可能であり、画像処理によるコロニー識別法が夾雑物を含む微小コロニーの迅速検査における有用な手法であることを確認した。

food safety, bacteria, microcolony

講演番号：3C25p11
講演日時、会場：3 月 28 日 16:10～ C 校舎 25 会場

光変換型蛍光蛋白質 Kaede を用いた大腸菌の細胞分裂と極齢の観察

Cell division and generation of poles of *Escherichia coli* cells visualized by a photoconvertible fluorescent protein Kaede

○陶山 哲志、水野 敬文 (産総研)
○Tetsushi SUYAMA, Takafumi Mizuno (AIST)

【背景】近年実用化が進んでいる光変換型の蛍光蛋白質では、特定波長の光を吸収することで発色団に不可逆的な構造変化が生じ、光の励起波長と蛍光波長のスペクトルを変化させる。この特徴を利用して光変換型蛍光蛋白質を研究対象の細胞中で発現させ、光照射でラベルすることにより、その消長を追跡することが可能になってきた。一方、大腸菌のように細胞極と細胞極の間に分裂面を形成して等分裂する桿菌では、二つの細胞極の一方が必ず新しい極になり、もう一方が代々親から受け継がれた古い極になる。細胞極に局在する蛋白質に光変換型蛍光蛋白質を融合し、光変換でラベルすることが出来れば、ある時点で存在していた古い細胞極と、その後の分裂により生じた新しい細胞極を識別することが可能かも知れない。アスパラギン酸の走化性レセプターである Tar は大腸菌の細胞極に局在する蛋白質であり、C 末端に EGFP 等を融合・発現させた既往研究[1]がある。今回は *tar* 遺伝子に光変換型蛍光蛋白質の一種である Kaede (http://www.amalgaam.co.jp) を融合させたプラスミドを大腸菌に形質転換し、大腸菌の分裂過程を詳細に観察する手段を検討したので、これを報告する。

【方法】PCR 増幅した大腸菌 K12 株由来の *tar* 遺伝子を終止コドンの位置にイン・フレームで Kaede 遺伝子が繋がるように pKaede-S1 ベクター（Amalgaam・MBL）の *Bam*HI サイトに挿入し、大腸菌 DH5αに形質転換した。光変換は日立の FL15BL ブラックライト蛍光灯（ピーク波長 369nm）の光照射下、液体振盪培養条件にて行った。観察には Zeiss の LSM 510 META 共焦点レーザースキャン顕微鏡システムを使用し、未変換型の緑色蛍光には 488nm 励起・505－530nm 蛍光、変換型の赤色蛍光には 543nm 励起・>560nm 蛍光の各条件を用いた。

【結果】顕微鏡観察により緑色蛍光が細胞極に局在する大腸菌株を取得し、T3 株と名付けた。T3 株は暗条件で培養することにより緑色蛍光のみを呈し、紫外線照射の後には赤色蛍光への変換が見られた。赤緑両方の蛍光を重ね合わせて観察することにより、細胞極の新旧が見分けられるようになった。本研究は JSPS 科研費 26660078 の助成を受けた研究の一環で実施したものです。

【参考文献】[1] Homma, et al. Attachment binding alters arrangement of chemoreceptor dimers within its cluster at a cell pole. PNAS 101:2462-7.

fluorescent protein, cell division, live cell imaging

講演番号：3C25p12
講演日時、会場：3 月 28 日 16:21～ C 校舎 25 会場

ウミホタル由来の分泌型ルシフェラーゼ (CLuc) 発光変異体を用いたデュアルカラーレポーターアッセイ系の構築に向けての基礎検討

Construction of yeast-based dual color reporter assay using *Cypridina noctiluca* luciferase (CLuc) mutants

○善福 大[1,2]、佐原 健彦[1]、森田 陽介[1]、栃木 裕貴[1,3]、西宮 佳志[1]、呉 純[4]、近江谷 克裕[5]、扇谷 悟[1]、森田 直樹[1] ([1]産総研・生物プロセス、[2]北海道ハイテクノロジー専門学校、[3]現　日本獣医生命科学大学・獣医、[4]産総研・健康工学、[5]産総研・バイオメディカル)

○HIROSHI ZEMPUKU[1,2], TAKEHIKO SAHARA[1], YOUSUKE MORITA[1], YUKI TOCHIGI[1,3], YOSHIYUKI NISHIMIYA[1], CHUN WU[4], YOSHIHIRO OHMIYA[5], SATORU OHGIYA[1], NAOKI MORITA[1] ([1]Bioproduction Research Institute, AIST, [2]Hokkaido College of High Technology, [3]Department of Veterinary medicine, Nippon Veterinary and Life Science University., [4]Health Research Institute, AIST, [5]Biomedical Research Institute, AIST)

【目的】ウミホタル（*Cypridina noctiluca*）のルシフェラーゼ（CLuc）遺伝子は、酵母や哺乳類細胞においても発現し、CLuc が細胞外へ分泌される性質を持っている。この性質が遺伝子発現解析のためのレポーターアッセイ構築に向けた大きなメリットと考えている。そこで我々は、レポータータンパク質として CLuc を用いた酵母レポーターアッセイ法を構築し、実用化した（“CLuc レポーターアッセイキット酵母用”、アトー（株））。CLuc を用いた酵母レポーターアッセイ法は、レポータータンパク質である CLuc が培養液中に分泌され、さらに酵母培養液中の CLuc による発光は酵母細胞存在下でも測定可能であるため、酵母培養液の一部をそのまま測定に使用することができる。これにより、従来のβ-ガラクトシダーゼをレポータータンパク質として用いた方法に比べて大幅な簡便化と迅速化を図ることが可能となった。我々は更なるアッセイ系の改良を目指して、酵母デュアルカラーレポーターアッセイの構築に取り組んでいる。これまでに発光スペクトル特性が異なる CLuc 発光変異体 mBLUE と mRED を取得した。本研究では、mBLUE と mRED を用いた二色分泌型ルシフェラーゼによる CLuc 酵母レポーターアッセイの確立を目指し、使用する酵母株、既存のβ-ガラクトシダーゼを用いたレポーターアッセイに対する感度や再現性の比較などの評価を行った。

【方法、結果及び考察】mBLUE を含むレポータープラスミド pmBLUE を使用し、出芽酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）ゲノム上に存在する各種プロモーター配列を組み込んだレポータープラスミドを作製した。比較対象として、β-ガラクトシダーゼを含むレポータープラスミド pGALuRA を使用し、同様に各種プロモーター配列を組み込んだレポータープラスミドを作製した。作成した各レポータープラスミドで酵母 BY4743 株を形質転換し、得られた各形質転換株のプロモーター活性（転写活性）を各々測定した。これら二つのレポーター酵素のプロモーターごとの転写活性の比較検証を行ったところ、mBLUE を用いた酵母 CLuc レポーターアッセイ法で測定した転写活性と従来のβ-ガラクトシダーゼを用いたアッセイ法で測定した転写活性には高い相関が得られた。よって、mBLUE を用いたレポーターアッセイ法は従来法から容易に移行可能であることが示された。また、酵母株として BY4743 株を用いた場合、酵母培養液中に分泌される mBLUE 及び mRED 活性と濁度との関係にばらつきが見られたが、このばらつきは YPH500 株を用いるとほとんど解消された。使用する酵母株の至適化が必要であることがわかった。

Cypridina noctiluca luciferase (CLuc), Dual color reporter assay, *Saccharomyces cerevisiae*

講演番号：3C25p13
講演日時、会場：3 月 28 日 16:32～ C 校舎 25 会場

微生物代謝酵素を利用したヒドロキシプロリンの定量法

Estimation of hydroxyproline using microbial enzymes

○渡辺 誠也[1]、平岡 芳信[2]、遠藤 志織[1]、谷本 佳彰[1]、渡部 保夫[1]([1]愛媛大・農、[2]愛媛県産技研)
○Seiya WATANABE[1], Yoshinobu HIRAOKA[2], Shiori ENDO[1], Yoshiaki TANIMOTO[1], Yasuo WATANABE[1] ([1]Fac. of Agr., Ehime Univ., [2]Ehime Inst. of Tech.)

【研究の背景・目的】コラーゲンは人体における最も主要なタンパク質であり、細胞間の接着など体内で重要な役割を果たしておりその代謝挙動は我々の健康状態と深く結びついている。コラーゲン中のプロリン残基は、翻訳後修飾により L-ヒドロキシプロリン（トランス-4-ヒドロキシ-L-プロリン（T4LHyp）とトランス-3-ヒドロキシ-L-プロリン（T3LHyp））に変換され、その構造維持に必須である。この水酸化は酵素により行われるが、遊離状態の L-プロリンや一般のタンパク質中は起きないことから、生体組織や食品サンプル等に含まれるコラーゲン量を見積もる指標物質として広く用いられている。また、L-Hyp は、多くの疾患のバイオマーカーでもある。このように L-Hyp 定量の重要性は大きいが、既存の HPLC 法は汎用性が高いとはいえないため、我々は微生物酵素を用いた新しい定量法の開発を行った。

【方法・結果】我々はこれまでに、L-Hyp を唯一の炭素源として生育可能な微生物の代謝経路の全容を明らかにし、組み換え酵素発現・精製系の確立を行ってきた(1, 2, 3)。これに基づき、T4LHyp は T4LHyp 異性化酵素と次の D-ヒドロキシプロリン脱水素酵素の連続反応を、人工電子受容体を用いて 490nm で分光学的に測定した（4)。一方、T3LHyp は T3LHyp 脱水酵素と次の Δ[1]-ピロリン-2-カルボン酸還元酵素の連続反応を、NAD(P)H を用いて 340nm で分光学的に測定した（5)。測定条件の最適化を行った結果、T4LHyp と T3LHyp はそれぞれ 0.004-1 mM and 0.05-1 mM の範囲で良好な検量線を作製でき、濃度未知サンプルを HPLC 法に対して 10%以内の誤差で定量することができた。この精度は、両者を混合した場合でも損なわれることがなかった。生体サンプルとして、市販コラーゲンを酸加水分解し含まれる T4LHyp の定量を試みた。酸加水分解物中にはグリシンや L-プロリン、アラニンなどが多く含まれ、全アミノ酸に対する T4LHyp の含有量は約 0.11 だった。このような条件下でも、酵素による定量法の精度は標準溶液を用いた場合と遜色なかった。さらに、尿中においても、非酵素的な吸光度の上昇は見られたものの測定法を改良することで十分に T4LHyp を定量可能なことが示唆された。

【結論・展望】食品や生体サンプル中の L-Hyp である T4LHyp と T3LHyp を、異なる酵素系を用いて互いに干渉することなく HPLC 並みの精度で分光学的に簡便に定量可能である。今後は、さらに幅広いサンプル中での測定を行う必要がある。

【参考文献】(1) *J. Biol. Chem.* 2012, 287, 32674-32688 (2) *FEBS Open Bio* 2014, 4, 240-250 (3) *FEBS Open Bio* 2014, 4, 617-626 (4) 特願 2013-95772 (5) 特願 2013-186647

Hydroxyproline, Enzymatic detection

講演番号：3C25p14
講演日時、会場：3 月 28 日 16:43～ C 校舎 25 会場

目的遺伝子タンデム化方法と目的タンパク質生産への応用

A new tandem gene construction method and its application to gene expression

○渋井 達郎、坂口 大介、原 宏佳（日本獣医生命科学大学　応用生命）
○TATSURO SHIBUI, DAISUKE SAKGUCHI, HIROYOSHI HARA (Nippon Vet. and Life Sci. Univ.)

遺伝子工学による目的タンパク質生産宿主としては、原核生物、酵母、カビ、昆虫細胞、動物細胞、植物細胞、トランスジェニック植物・動物などがある。これら生物を利用した目的遺伝子産物（タンパク質）の量産系には、原則として以下に記述するような発現のための共通の因子が必要となる。

１．転写活性が高く、制御の容易な転写プロモーター配列と転写の read-through を防ぐための転写終結（ターミネーター）配列　２．翻訳開始効率の良くするための配列（5’Cap 構造、IRES、SD 配列等）の目的遺伝子上流への配置　３．翻訳効率の良いコドンの利用とその効率の良い配置

これらの他、目的遺伝子のコピー数の増加させることにより、目的遺伝子産物の量を増加させることができることは、既に報告されている[1)、2)、3)]。

従来、遺伝子工学的に目的遺伝子のコピー数をベクター上で増やす方法としては、同じ粘着末端を生じる制限酵素、或いはブラントエンドの末端を生じる制限酵素を用い目的遺伝子をベクターより切り離し、再度同じ粘着末端の制限酵素切断部位あるいはブラントエンド制限酵素切断部位に導入し、目的遺伝子のタンデム化を行っていた[1)、2)]。

今回、我々は市販の大腸菌の組み換えタンパク質生産系を利用し目的タンパク質の生産を行うに当たり、発現させるべき目的遺伝子コピー数をベクター上で簡便に増加させるシステムを開発し、それを応用し、目的遺伝子産物の量産を試みた結果について報告する。

当方法は、制限酵素により目的遺伝子断片と発現ベクターを切断後、分離することなく、市販のクローニングキットにより目的遺伝子断片のみをタンデム化することが可能で、*in vitro* で目的遺伝子を増加させ目的タンパク質を量産する方法として様々な宿主ベクター系に応用できるものと考えられる。

1) T. Shibui et.al. "A methods for overproduction of a protein of a target gene in Escherichia coli." Agric. Biol. Chem., 52, 2235-2241 (1988)
2) T. Shibui et. al. "High-level expression of human proapolipoprotein A-1 in Escherichia coli using expression plasmids containing tandemly polymerized proapolipoprotein A-1 structural genes. " Applied Microbiology and Biotechnology, 31, 518-523 (1989)
3) M. Kito et. Al. “Construction of engineered CHO strains for high-level production of recombinant proteins.“ Applied Microbiology and Biotechnology, 60, 442-448 (2002)

recombinant protein, tandem repeat, expression vector

講演番号：3C25p15
講演日時、会場：3 月 28 日 16:54～ C 校舎 25 会場

多入力型 T7 プロモータの設計と改良

Construction of high-performance AND-gated T7 promoter

○佐伯 和哉、宮口 明恵、河合（野間）繁子、斎藤 恭一、梅野 太輔（千葉大院・工・共生応化）
○ Kazuya SAEKI, Akie MIYAGUCHI, Shigeko KAWAI (NOMA), Kyoichi SAITO, Daisuke UMENO (Dept. Appl. Chem. Biotech., Chiba Univ.)

【目的】
T7RNA ポリメラーゼ（T7RNAP）は，単独で転写に必要な全機能を有しているため，宿主ネットワークと独立性の高い転写ネットワークの構築に適している。しかし，その発現の On/Off 制御は，宿主由来のプロモータに比べて設計自由度が低いことが知られている。たとえば，転写オペレータ配列の作用は T7 プロモータ（P_{T7}）からの距離に強く依存するため，単純なオペレータ配列の並列的な融合だけでは複合プロモータとして振る舞わない。本研究では，様々なリプレッサー型転写制御系について，オペレータ機能の P_{T7} からの距離依存性を調査し，多入力制御が可能な P_{T7} スイッチ作製の可能性を探索した。
【方法・結果】
Tet および Bet オペレータを P_{T7} 上下流の様々な位置に配置し，そのプロモータ活性およびオペレータ活性を測定した。その結果，プロモータ下流側は 7 塩基以内であればオペレータを作用可能なかたちで融合できること，P_{T7} 上流側は，オペレータ配列を P_{T7} 配列の上流部に重複させなければ機能しないことが明らかになった。オペレータ制御と P_{T7} 活性とを両立するため，重複部の塩基を部分ランダム化して機能選択を行い，choline（100 mM）の有無で高い出力値変化を示す bet0::P_{T7} を得た。得られた bet0::P_{T7} 下流に tet0 あるいは lac0 を配置した bet0::P_{T7}::Tet0 および bet0::P_{T7}::lac0 を作製し，choline および aTc あるいは IPTG の両方が存在するときのみ，P_{T7} 下流の遺伝子を発現する「AND ゲート型」の T7 スイッチを構築した。

T7 promoter, genetic circuit, AND gate

講演番号：3C25p16
講演日時、会場：3 月 28 日 17:15～ C 校舎 25 会場

等温核酸増幅産物の新規目視検出法に関する研究

Novel colorimetric detection method for amplified product of isothermal nucleic acid amplification

○佐野 創太郎、宮本 重彦、田中 穂積（株式会社カネカ）
○Sotaro SANO, Shigehiko MIYAMOTO, Hozumi TANAKA (Kaneka corp.)

【背景】核酸増幅法の一つである Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP)法は、等温条件で反応が進行するため、サーマルサイクラーなどの高価で複雑な温度制御装置を必要とせず、バッテリー駆動の簡単な温調装置で反応を実施可能である。そのため、LAMP 法は、臨床現場でのウィルスや細菌などの感染症の Point of Care (POC)検査や、屋外での家畜や農作物の検査などへの応用が進められている。LAMP 産物の検出では、反応の進行に伴うピロリン酸マグネシウムの生成による濁度上昇や、蛍光性金属指示薬を用いる方法が一般的であるが、これらの方法は陽性検体と陰性検体での色調差が小さく、視認性の低さが課題となっていた。そこで、この課題を解決する視認性の良い検出法として、ロイコ型クリスタルバイオレット(LCV)を用いた核酸を染色する方法を開発した。本研究では、LCV による検出と LAMP 法による核酸増幅を組合せ、簡便・迅速な病原性細菌検査系を構築したので報告する。
【方法】青紫色のキノイド型色素であるクリスタルバイオレットを亜硫酸ナトリウムで処理することで、無色の LCV へと変換した。LCV に核酸溶液を添加した際の溶液の呈色を分光光度計にて分析した。LCV を乾燥固定したマイクロチューブ内で病原性細菌由来 DNA を鋳型として LAMP の反応液を調製し、60℃で 60 分間反応後の溶液の呈色を目視にて観察した。
【結果と考察】LCV に核酸を含む検体を添加した場合、溶液は青紫色に呈色することを認めた。一方、核酸を含まない検体ではこのような呈色反応は起こらず、溶液は無色のままであった。また、LCV を予め反応液中に添加した条件で LAMP による増幅を行った結果、病原性細菌由来 DNA を含む陽性検体のみ反応液が青紫色に呈色し、これにより病原体の有無を、目視で簡便・迅速に判定することができた。この検査系は、感染症などの POC 検査において有用と考えられる。

isothermal amplification, LAMP, detection

講演番号：3C25p17
講演日時、会場：3 月 28 日 17:26～ C 校舎 25 会場

局所麻酔剤プロカインの作用機序についての考察-脂質二分子膜を介したイオン透過に与える影響に基づく評価-

Action Mechanism of a Local Anesthetic, Procaine, by Considering Ion Transport across Bilayer Lipid Membranes

○白井 理、山口 拓也、北隅 優希、加納 健司（京大院農）
○Osamu SHIRAI, Takuya YAMAGUCHI, Yuki KITAZUMI, Kenji KANO (Kyoto Univ.)

1. 緒言

神経細胞では通常細胞内外の K^+ の活量比に起因した約 -70 mV の膜電位 (静止膜電位) が生じている [1]。外部刺激により神経が興奮すると、シナプスにおいてチャネル型受容体が開き、Na^+ の透過性が増大し、約 40 mV の活動電位へと変化する。神経伝導は、活動電位が軸索上を伝播することで生じるが、局所麻酔剤は中性分子として細胞内に取り込まれ、細胞内で解離して疎水性カチオンとなり電位依存性ナトリウムチャネルと結合し、機能を喪失させると考えられている [2]。しかし、局所麻酔剤の作用機序は、チャネルタンパクと局所麻酔剤の結合部位は特定されておらず、詳細は未だ解明されていない。一方、ナトリウムチャネルを含まない脂質二分子膜 (BLM) でも局所麻酔剤によって膜の電気伝導性が変化することも報告されている [3]。

本研究では、脂質二分子膜を介した二水相間のイオン透過に与える局所麻酔剤の影響を評価し、その作用機序について検討した。

2. 方法

直径 1 mm の小孔をあけた厚さ 0.2 mm のテフロンシートを 2 個のアクリル容器で挟み込んだ測定用セルを作製した。テフロンシートで隔てられた 2 室 (W1, W2) に電解質溶液を満した後、刷毛塗り法によって小孔部分に BLM を形成させた。脂質溶液は、lecithin 約 10 mg、cholesterol 約 5 mg を 1 mL の n-decane に溶解したものを用いた。W1, W2 に電位規制用 Ag|AgCl 電極と電流測定用 Pt 電極をそれぞれ挿入し、4 電極方式で測定を行った。なお、局所麻酔剤は procaine (pK_a 8.9) を用いた。

3. 結果と考察

W1 および W2 の水溶液として 0.1 M KCl を用いた場合、W1 と W2 間の電位差 ($E_{W1\text{-}W2}$) として 0.1 V を印加してもイオン透過電流は生じなかった。W1 および W2 へ局所麻酔剤 procaine を添加して同様の測定を行ったところ、僅かにイオン透過電流が増加した。麻酔剤濃度が 0.5 mg L^{-1} の場合、0.1 V 印加時の電流密度は約 50 nA cm^{-2} であった。次に procaine は解離したカチオンも存在するので、Cl^- よりも疎水的な SCN^- に代えたところ電流が増加した。チャネルを形成するグラミシジン A を含む系では、procaine は解離したカチオンがチャネル透過を阻害することがわかった。

＜参考文献＞[1] 岡 良隆、基礎から学ぶ神経生物学、オーム社 (2012). [2] 藤原祥裕、*Anesthesia21Century*, **14**, 2824-2827 (2012). [3] A. Shibata, et al., *Colloid. Surf. B*, **42**, 197-203 (2005).

Local Anesthetic, Action Mechanism, Ion Transport

講演番号：3C25p18
講演日時、会場：3 月 28 日 17:37～ C 校舎 25 会場

クチクラ膜内の成分の濃度勾配の可視化
Gradational distribution of constituents in cuticular membrane
○東 順一[1]、松村 由貴[2]、本田 与一[2]、大熊 桂樹[3]、金山 裕亮[4]、米森 敬三[2]、宇山 浩[1]([1]阪大工、[2]京大農、[3]長野県農協地域開発機構、[4]（株）サンアクティス)
○Junichi Azuma[1], Yuki Matsumura[2], Yoichi Honda[2], Keiki Okuma[3], Hiroaki Kanayama[4], Keizo Yonemori[2], Hiroshi Uyama[1] ([1]Osaka Univ., [2]Kyoto Univ., [3]Nagano Agric. Coop. Inst. Res. Dev., [4]Sunactis Co.)

【目的】
植物の地上部の表層を被覆するクチクラ膜は、脂質性が高く、耐候性を付与するとともに、水分損失や病原菌の侵入を防ぐ機能を有している重要な組織である。果実や蔬菜類では、貯蔵性や棚もち性など、品質を維持する役割も果たしている。我々の研究グループでは、クチクラ膜（CM)の表皮ワックス、クチン、クチン骨格内部ワックス、多糖類および難分解性のクタンから成るコンポジット性や各成分の物性への寄与を明らかにしてきた(Azuma et al., SNP,2014,33; Tsubaki et al., PLOS ONE, 8(9),e75275, 2013 ; Takahashi et al., Plant Cell Environ., 35, 1201, 2012, 等)。本研究では、リンゴ、カキ、ウメ及びトマトの果実、並びにアロエの葉のクチクラ膜内における各構成成分のクチクラ膜内の分布を新規に開発されてきた AFM-IR 分析及び X 線マイクロ CT 分析により可視化する試みを行った。
【方法】
渋ガキ（平核無)、甘ガキ（富有)（京都大学農学研究科北白川果樹試験場）と長野県で栽培されたリンゴ（ふじ）の果実及び生食用・加工用トマト、和歌山県産の南高ウメの果実の果皮並びにアロエの葉から調製した約 10～20μm の厚さの表皮切片を、光学顕微鏡観察した後、顕微 FT-IR 及び AFM-IR 分析を行った。また、酵素法により単離した CM の一般化学組成分析を行うとともに、透過型 FT-IR、SEM、X 線回折及び X 線マイクロ CT 分析した。
【結果】
乾燥した CM の ATR 法による成分分析により、いずれの CM についても外界に接している表面にワックスが局在し､内面にはクチンや糖類が多く含まれていることがわかった｡顕微 FT-IR においてもワックスの表皮局在性を観測することができたが､CM の内部状態を分析することは透過型 FT-IR と同様に困難であった。しかし、AFM-IR 分析を行うことにより、ワックスの吸収が表皮程高く、ポリエステル性のクチンに由来する吸収が内部へ向かう程高くなる両成分の CM 内濃度勾配を初めてとらえることができた｡また､X 線回折の結果から､いずれの CM においても程度は低いが結晶性セルロース及びワックスの存在が認められたので、X 線マイクロ CT 分析を行った。その結果、CM の表皮側、内部側を問わず表皮細胞の形状をとらえることができ、表皮側に明瞭な層としてこれらの成分が蓄積していることが明らかとなった。また、ウメ果実では微毛が密生する様子も明瞭にとらえることができた。

cuticlar membrane, AFM-IR, X-ray CT

講演番号：3C25p19
講演日時、会場：3 月 28 日 17:48～ C 校舎 25 会場

強磁場・高磁気力環境下におけるタンパク質結晶成長

Protein crystal growth under a high magnetic field and high magnetic force environment

○中村 顕[1]、廣田 憲之[2]、和田 仁[1]、田之倉 優[1,3] ([1]東大院農生科、[2]物材機構、[3]東大磁気力場研究連携ユニット)
○Akira NAKAMURA[1], Noriyuki HIROTA[2], Hitoshi WADA[1], Masaru TANOKURA[1,3] ([1]Univ. of Tokyo, [2]NIMS, [3]Coop. Unit of Magnetic Force Field Res., Univ. of Tokyo)

超伝導磁石が作り出す強い磁場と大きな磁場勾配により、水滴に作用する重力を相殺可能な鉛直上向きの磁気力を発生させることができ、これにより水の磁気浮揚が達成される。このような強い磁気力がはたらく環境を「磁気力場」と呼び、われわれは磁気力場をタンパク質結晶化に応用した研究を行なっている。2012 年度大会では、磁場外対照実験の結果と比較して、磁気力場を利用することで高品質なタンパク質結晶が得られることを報告した（1)。また 2014 年度大会では、磁気力場を用いて高品質なタンパク質結晶をさらに効率的に得るためにわれわれが最近開発した、磁気力場中結晶化の *in situ* 観察デバイスを具備した『高効率・高品位タンパク質結晶生成システム』について報告した。本システムの利用により、高品質なタンパク質結晶を取得できるだけでなく、結晶化プレートを磁気力場中に静置させたままで、結晶がいつ、どこから、どのように生成するか、その成長段階を把握することができる。そのため、結晶が十分に成長したことを確認した上で結晶化プレートを装置から取り出すことが可能である。

本発表では、上記システムを利用した実験の中から、リアルタイム観察機能を利用した結晶成長の比較実験結果を中心に報告する。超伝導磁石の励磁前後において、本システムを用いてタンパク質結晶化実験を実施し、その結晶成長の様子をタイムラプス撮影にて記録した。その結果、強磁場・磁気力場環境下では、微結晶の生成が遅くなることが分かった。これは磁気力場環境に起因する対流低減効果によるものと考えられる。この他、磁場の効果に対して磁気力場の効果を明確にする目的で、磁場勾配が比較的小さな領域（磁場最大）と水滴の重力を相殺する磁気力が発生している領域（磁気力最大）において同時に結晶化実験を行なった。これらの実験結果について考察したい。

1. Nakamura *et al*., *Cryst. Growth Des*. **12**(3), 1141-1150, 2012

protein crystallization, high magnetic field, real-time observation

講演番号：3C25p20
講演日時、会場：3 月 28 日 17:59～ C 校舎 25 会場

甘味タンパク質ソーマチンの連続フェムト秒結晶構造解析
Structural analysis of sweet-tasting protein, thaumatin by serial femtosecond crystallography
○桝田 哲哉[1,2]、南後 恵理子[2]、菅原 道泰[2]、鈴木 守[2,3]、登野 健介[4]、城地 保昌[4]、亀島 敬[4]、Park Jaehyun[2]、Song Changyong[2]、初井 宇記[2]、矢橋 牧名[2]、大久保 喬平[1]、三上 文三[5]、北畠 直文[1,6]、谷 史人[1]、岩田 想[2,7]([1]京大院・農・食品生物、[2]理化学研究所 放射光科学総合研究センター、[3]阪大 蛋白研、[4]高輝度光科学研究センター、[5]京大院・農・応用生命、[6]ノートルダム清心女大、[7]京大院・医)
○Tetsuya Masuda[1,2], Eriko Nango[2], Michihiro Sugahara[2], Mamoru Suzuki[2,3], Kensuke Tono[4], Yasumasa Joti[4], Takashi Kameshima[4], Jaehyun PARK[2], Changyong SONG[2], Takaki Hatsui[2], Makina Yabashi[2], Kyohei Okubo[1], Bunzo Mikami[5], Naofumi Kitabatake[1,6], Fumito Tani[1], So Iwata[2,7] ([1]Div. Food Sci. Biotech. Grad. Agric. Kyoto Univ., [2]RIKEN RSC, [3]Institute for Protein Research Osaka Univ., [4]JASRI, [5]Div. App. Life Sci. Grad. Agric. Kyoto Univ., [6]NDSU, [7]Grad. Med. Kyoto Univ.)

[目的]原子分解能でタンパク質の三次元結晶構造を決定するには、タンパク質単結晶を用いた X 線結晶構造解析が適している。しかしながら、強い放射光を用いると実験中にタンパク質結晶が放射線損傷を起こすため、低温条件下（100 K 程度）で回折実験を行うことが主流である。
連続フェムト秒結晶構造解析（SFX：Serial Femtosecond Crystallography）は、主にインジェクターと呼ばれる装置から噴出した多数の微小結晶を含む液体に、10 フェムト秒という超短時間の X 線パルスレーザーの照射を行うことにより、タンパク質が壊れる前に微結晶の回折イメージを連続的に収集する手法であり、新たなタンパク質の構造決定法として注目されている。また SFX は常温で実験を行えるため、低温条件下で行う回折実験とは異なり生理条件に近い構造の情報を得ることが期待される。今回 SFX を用いて甘味タンパク質ソーマチンの構造解析を行ったので報告する。
[方法]ソーマチン微結晶はロッシェル塩を用いたバッチ法にて作成した。SFX データ収集は X 線自由電子施設（SACLA、BL3）にて行い、グリースマトリックス法にて微結晶を連続的に供給した(1)。得られたデータは CrystFEL 用い指数付け、積分を行った。Coot によるモデル構築、精密化は Phenix により行った。ソーマチン単結晶はハンギングドロップ法にて作成した(2)。グリセロールを抗凍結剤として用い、データ収集は大型放射光施設 SPring-8、BL26B1 の IP ディテクターを用いて行った。Coot によるモデル構築、精密化は Shelxl および Phenix により行った。
[結果]グリースマトリックス法を用いた解析で分解能 2.0Åのデータを収集することに成功した。84078 枚のイメージを収集し 8856 枚指数付け可能であった。積分データを 2 分割した強度データの指標、Rsplit は 16.4%, 相関係数 CC1/2 は 91.8%であった。モデル精密化後の R/Rfree 値は 15.7/20.0、r.m.s.d bond lengths, angles はそれぞれ 0.008Å、1.132° であった。SFX で得られたソーマチンの構造は凍結結晶で見られるクレフト内部のグリセロール分子は観察されず、また分子表面に存在するいくつかの酸性アミノ酸残基側鎖の電子密度が明瞭に観察された。
（1） Sugahara *et al.*, *Nature Methods* in press
（2） Masuda *et al.*, *Acta Crystallogr. Sect.* F67., (2011) 652-658.
本研究は、岩田想を研究代表とする文部科学省 X 線自由電子レーザー重点戦略研究課題の一環として行われた（SACLA BL3, 2013A8039、2013B8045、2014A8032）。ソーマチン単結晶の構造解析は SPring8 BL26B1 にて行われた（2013A1053、2013B1069、2014A1063、2014B1181、2014B1339）。

Serial Femtosecond Crystallography, thaumatin, SACLA

講演番号：3C22a01
講演日時、会場：3 月 28 日 09:00～ C 校舎 22 会場

脱窒菌 *Pseudomonas stutzeri* 由来ケルセチナーゼ遺伝子の大腸菌を用いる異種発現
Heterologous expression of quercetinase gene from denitrifying bacterium *Pseudomonas stutzeri* in *Escherichia coli*
○片岡 邦重、ウィディアトニングラム タリサ、前田 空人、櫻井 武（金沢大院・自然科学）
○ Kunishige KATAOKA, Talitha WIDIATNINGRUM, Sorato MAEDA, Takeshi SAKURAI (Kanazawa Univ.)

【緒言】ケルセチナーゼ(ケルセチン 2,3-ジオキシゲナーゼ)は，クピンスーパーファミリーに属し，フラボノイドの一種であるケルセチンを酸化分解してデプシドと一酸化炭素を生成する反応を触媒する金属酵素である。脱窒菌 *Pseudomonas stutzeri* はケルセチナーゼと同じクピンスーパーファミリーに属するピリン様タンパク質遺伝子を持つことが分かっているが，このピリン様タンパク質の生理的役割は不明である。これまでに本研究室では，*P. stutzeri* Zobell (ATCC 14405)のゲノムからピリン様タンパク質遺伝子を PCR 法によりクローニングし， *Brevibacillus* Expression System(タカラバイオ社)を用いる菌体外発現に成功している。しかしながら，*Brevibacillus* 系ではピリン様タンパク質の発現量が多くなく，目的の組換えタンパク質だけでなく，ほぼ同量の約 2 kDa 低分子量のタンパク質が発現した。低分子量タンパク質は C 末端領域がプロテアーゼで切除された分子種であると考えられ，２種のタンパク質を分離する事も困難であった。また，それらの混合物は低いケルセチナーゼ活性を示した。そこで本研究では，*P. stutzeri* Zobell 由来のピリン様タンパク質遺伝子の大腸菌発現系の構築と，ケルセチナーゼ活性の検討を行った。
【方法及び結果】ピリン様タンパク質遺伝子の終止コドン直前に 6×His タグコード配列を付加した遺伝子を，プラスミドベクターpUC18 の *Eco*RI-*Bam*HI 部位に挿入し発現ベクターを作製した。このベクターを用いて大腸菌 BL21(DE3)株を形質転換し，形質転換菌を LB 培地で培養してピリン様タンパク質を菌体内発現させた。菌体を超音波破砕して得られた可溶性画分から，Ni アフィニティークロマトグラフィーを用いて組換え型タンパク質を精製した。SDS-PAGE を行った結果，目的タンパク質の計算分子量 31 kDa にほぼ一致するタンパク質バンドが確認できたが，*Brevibacillus* 系と同様，サイズが約 2 kDa 異なるタンパク質が確認された。発現タンパク質の N 末端アミノ酸配列を確認したところ，高分子量タンパク質は LacZ の N 末端 20 残基がピリン様タンパク質の N 末端に付加した融合タンパク質であり，低分子量タンパク質が目的物であることが明らかになった。そこで，挿入遺伝子を改変して目的タンパク質のみを発現させる系を構築し，クロマトグラフィーにより組換え型ピリン様タンパク質を均一に精製した。組換え型ピリン様タンパク質（ケルセチナーゼ）はアポ体として発現していたので，1 mM の Cu^{2+}または Fe^{2+}の存在下でケルセチナーゼ活性を測定したところ，*Brevibacillus* をホストに発現させたケルセチナーゼとほぼ同等のケルセチン分解活性を示した。

quercetinase, quercetin, pirin

講演番号：3C22a02
講演日時、会場：3 月 28 日 09:11～ C 校舎 22 会場

酸素耐性の高いヒドロゲナーゼへのアフィニティタグ付加と簡易精製法の検討

Tagging Oxygen-tolerant [NiFeSe] H2ase for facile purification

○井本 知志[1]、三島 朱加[1]、Kasia Bieria[2]、稲垣 賢二[1]、田村 隆[1,3]（[1]岡山大院・環境生命、[2]仏・LCABIE、[3]JST さきがけ）
○Satoshi IMOTO[1], Ayaka MISIMA[1], Bieria Kasia[2], Kenji INAGAKI[1], Takashi TAMURA[1,3]
([1]Grad. Sch. Env. & Life. Sci. Okayama Univ., [2]France, LCABIE, [3]JST PROST)

【目的】

水素燃料はバイオエタノールと共に 21 世紀のエネルギー戦略を描く選択肢の 1 つである。水素の酸化反応を触媒する酵素ヒドロゲナーゼ(H2ase)は，硫化物(H_2S)への高い耐性，酸化・還元の両反応を触媒できる可逆性，熱損失を伴わない高いエネルギー変換効率など，白金触媒にない優れた特性を持つ。一般的に H2ase は酸素に対する感受性が高いので，酸素耐性の高い H2ase の探索とその迅速な調達法が喫緊の課題である。本研究では，大腸菌 MC4100 株が有する耐酸素性ヒドロゲナーゼへのアフィニティタグ導入を検討し，それに基づいて硫酸還元菌の[NiFeSe]型 H2ase の簡易精製法を検討した。

【方法・結果】

大腸菌 MC4100 株が有するヒドロゲナーゼ(HyaAB)は，好気条件から嫌気条件に培養条件が切り替わったときに発現する酸素耐性型[NiFe]H2ase とされている。HyaAB へのアフィニティタグの導入を検討するため HyaA(小サブユニット) C 末端側に His タグを挿入した *hyaAB*(SC-His6)遺伝子と HyaB(大サブユニット)N 末端側に StrepTagII を挿入した *hyaAB*(LN-STII)遺伝子をそれぞれ構築した。大腸菌 MC4100 *ΔhyaAB* 株に形質転換し，アフィニティカラムによる精製を行った。Native-PAGE 後，活性染色により活性を確認した結果，HyaAB(SC-His6)は通過と溶出の両画分に H2ase 活性を示したのに対し，HyaAB(LN-STII)は通過画分に残らず，溶出画分にのみ分画された。

硫酸還元菌の中には活性中心の Ni-Fe を支える Cys の 1 つがセレノシステイン(Sec)に置換した[NiFeSe]型 H2ase を持つことが報告されており，Sec の低い還元電位により高い酸素耐性を示す。Native-Page で分画した H2ase の ICP-MS 解析の結果，複数の硫酸還元菌から Se を持つ H2ase の存在が検出された。これらの硫酸還元菌から簡便に[NiFeSe]型 H2ase を精製するために，pirλに依存する複製起点 R6Kori を活用した接合伝達ベクターを構築した。接合と相同組換えによりアフィニティタグ配列をゲノム上の[NiFeSe]-H2ase に付加する方法を検討している。

[NiFeSe] H2ase, Affinity tag, conjugal transfer

講演番号：3C22a03
講演日時、会場：3 月 28 日 09:22～ C 校舎 22 会場

高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 由来 TthA0610/1422 の発現と諸性質の検討

Expression and characterization of protein disulfide isomerase TthA0610/1422 from *Thermus thermophilus* HB8

○周藤 慎也、福山 慎也、稲垣 賢二、田村 隆（岡山大院・環境生命）
○shinya Suto, shinya Hukuyama, kenji Inagaki, takashi Tamura (Grad. sch. Env.&Life. Sci. Okayama umiv.)

［目的］抗体は，医薬，診断薬，医学生物学研究など幅広く利用されているが，ハイブリドーマ抗体産生細胞に依存する現在の生産方法は非常に高コストである。より低コストの抗体生産方法として大腸菌を使用した組換えタンパク質としての生産が考えられるが，抗体へ複数のジスルフィド架橋を正しく導入することは困難であり，大部分が凝集体として発現されてしまう。この問題の解決として，耐熱性ジスルフィドイソメラーゼを触媒として利用する高温リフォールディングの可能性を検討する。高温リフォールディングとは，高温で凝集体を解きほぐしながら，触媒によって正しいジスルフィド架橋を導入し，正しい構造へとリフォールディングする方法である。触媒として高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 よりジスルフィドイソメラーゼとして同定された TthA0610，TthA1422 に着目した。本研究では，TthA0610/1422 の性質検討を行った。
［方法］TthA0610/1422 はペリプラズム空間に局在する酵素なので，大腸菌の細胞質とペリプラズム空間の 2 通りの局在条件で発現させた。細胞質発現は細胞質を酸化的環境に変化させた *E. coli* SHuffle を利用し，ペリプラズム空間発現は大腸菌ジスルフィドオキシダーゼ DsbA のシグナルペプチドを利用した。精製タンパク質は，菌体破砕によりタンパク質を抽出し，Ni NTA Spin kit または Ni-NTA カラムにより精製を行うことで獲得した。性質検討として，プロテインジスルフィドイソメラーゼ（PDI）活性測定を行った。PDI 活性測定は，基質としてジスルフィド架橋をランダムに掛け替えたスクランブル RNase を使用し，リフォールディング後の RNase 活性をメチレンブルー測定法により測定した。RNase 活性より求められた RNase 回復率を PDI 活性の指標とした。
［結果］細胞質発現とペリプラズム空間発現どちらも精製タンパク質を獲得できた。TthA0610 は TthA1422 に比べて高い PDI 活性を示した為，TthA0610 についてより詳細な性質検討を行った。ペリプラズム空間発現 TthA0610 は細胞質発現 TthA0610 に比べて有意に高い熱安定性を示した。TthA0610 はスクランブル RNase を基質としたとき，反応温度 40℃において最も高い活性を示し，酵素の酸化還元状態を適切に維持する酸化還元 Buffer は還元型グルタチオン（GSH）と酸化型グルタチオン（GSSG）の比 1:1 が最適であると判明した。以上の結果より，ペリプラズム空間発現 TthA0610 は，高い熱安定性と PDI 活性を示すことから，高温リフォールディングの触媒として有用であると考えられる。

protein disulfide isomerase, thermophilic bacteria, refolding

講演番号：3C22a04
講演日時、会場：3 月 28 日 09:33～ C 校舎 22 会場

ヤンバルトサカヤスデ由来マンデロニトリル酸化酵素の性質と組織局在性の解明
Purification, characterization, and tissue-specific localization of mandelonitrile oxidase from the invasive millipede, *Chamberlinius hualienensis*
○石田 裕幸[1,2]、伊奈 隆年[1,2]、浅野 泰久[1,2] ([1]富山県大工・生工研セ、[2]JST, ERATO)
○Yuko ISHIDA[1,2], Atsutoshi INA[1,2], Yasuhisa ASANO[1,2] ([1]Toyama Pref. Univ., Biotech. Res. Center & Dept. Biotech., [2]ERATO, JST)

【目的】ヤンバルトサカヤスデ(*Chamberlinius hualienensis*)の防御物質は、防御態勢の個体からの放出される HCN と benzaldehyde、メタノール抽出物に含まれる mamdelonitrile、benzoyl cyanide、そして両者から Schotten-Baumann 反応によって生成される mandelonitrile benzoate と推定されている。mandelonitirle oxidase (ChuaMOX)は mandelonitrile から benzoyl cyanide への生成反応に関与する酵素として同定、部分精製されてきた。ChuaMOX の反応機構を調べるため、精製法を再検討し、同酵素の性質を明らかにした。また、生物学的機能を考察するため、同酵素の局在性を検討した。

【方法】ChuaMOX 活性は、mandelonitrile を基質とし、生成する H_2O_2 を比色法で測定した。酵素活性は、1 分間当たり 1μmol の H_2O_2 の生成を 1 U と定義した。本酵素は、-80℃で凍結保存された 100 頭のヤンバルトサカヤスデを融解し、腸を取り除いた各体節を 10 mM Tris-HCl, pH 8 中で摩砕して抽出した。そしてイオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過、クロマトフォーカシングで精製した。分子質量は SDS-PAGE とゲルろ過で推定した。酵素に付加した糖鎖は PAS 染色で検出した。部分アミノ酸配列は四重極飛行型質量分析装置で決定した。また ChuaMOX の組織局在性を同定するための各組織は、採血した後、顕微鏡下で摘出した。タンパク質は各組織を 10 mM Tris-HCl, pH 8 で摩砕して抽出し、native PAGE で分離した。ChuaMOX のバンドは活性染色で検出した。

【結果】30 mg の凍結ヤスデから 25μg の ChuaMOX を精製した。同酵素には糖鎖が含まれていた。分子質量は SDS-PAGE で 67 kDa、ゲルろ過で 60 kDa であったことから、単量体と推察される。昨年度の部分精製標品から得られたアミノ酸配列情報から 2 つの ChuaMOXs (ChuaMOX1 と ChuaMOX2)の cDNA がクローニングされたが、本酵素から決定されたアミノ酸配列は ChuaMOX1 の配列を含んでいたことから、今回精製した酵素は ChuaMOX1 と同定された。*ChuaMOX1* 遺伝子は paraterga で発現していたが、その翻訳産物である酵素は主に血液中に含まれており、基質である mandelonitrile とは隔離された場所に局在していた。すなわち、Schotten-Baumann 反応による HCN と mandelonitrile benzoate の急速な生成は、ヤスデが捕食者によって潰された時に生じる反応であり、ヤスデ自身が死亡することで群れの他個体を守る利他的行動をしていると推察した。

mandelonitrile oxidase, benzoyl cyanide, *Chamberlinius hualienensis*

講演番号：3C22a05
講演日時、会場：3 月 28 日 09:44～ C 校舎 22 会場

Aspergillus carbonarius AIU 205 株が産生する３種の 4-アミノブチルアミド酸化能を持つ酵素の性質の比較

Characterization of three enzymes with 4-aminobutylamide oxidase activity from *Aspergillus carbonarius* AIU 205

○礒部 公安[1,2,3]、菅原 麻美[1]、松井 大亮[2,3]、山田 美和[1]、浅野 泰久[2,3]([1]岩手大農、[2]富山県大工・生工研セ、[3]JST ERATO)
○Kimiyasu Isobe[1,2,3], Asami Sugawara[1], Daisuke Matsui[2,3], Miwa Yamada[1], Yasuhisa Asano[2,3]([1]Iwate Univ., [2]Toyama Pref. Univ., [3]ERATO JST)

【目的】我々は *Aspergillus carbonarius* AIU 205 株が 4-アミノブチルアミド酸化能を持つ３種類の酵素を産生することを見出し、１種類の酵素（E-I）の諸性質を明らかにしてきた[１]。本研究では、上記菌株が産生する他の２種類の酵素（E-II, E-III）を精製して諸性質を明らかにし、３種類の酵素の性質を比較した。

【方法】*A. carbonarius* AIU 205 株を *n*-ブチルアミン含有培地で 30℃, ２日間培養し、得られた菌体をガラスビーズで破砕して粗酵素液を調製した。酵素は３段階のカラムクロマトグラフィーで精製した。酵素活性は 4-アミノブチルアミドを基質にして、生成する過酸化水素を比色法で測定して求め、１分間に 1 μmol の過酸化水素を生成する酵素量を１U と定義した。

【結果・考察】上記の方法で精製した E-II と E-III は電気泳動分析で単一バンドであった。両精製酵素は E-I と同様にアミノアミド、脂肪族アミン、芳香族アミン、アミノアルコールを酸化したが、アミノ酸には作用しなかった。また３種類の酵素はいずれも可視部に極大吸収を持つスペクトルを示さず、カルボニル試薬、Isoniazid, Iproniazid で活性が強く阻害された。従って、３種類の酵素はいずれも銅含有アミン酸化酵素に属すと推定された。しかし、３種類の酵素の脂肪族アミンに対する K_m 値を比較すると、E-I は E-II や E-III に比べて脂肪族アミン対する親和性が強く、また短鎖アミンよりも中鎖アミンに対する親和性が強かった。E-III も同様の傾向が認められたが、その K_m 値は、E-I の 10 倍以上高かった。一方、E-II は中鎖アミンよりも短鎖アミンに対する親和性が強かった。また、３酵素の分子質量は E-I が 150 kDa (同一サブユニットの二量体), E-II は 130 kDa (同一サブユニットの二量体), E-III は 65 kDa (単量体)と異なっていた。そして、N末端アミノ酸配列を調べた結果、E-I はブロックされていたが、E-II はペルオキシゾーム銅含有アミン酸化酵素と推定されているタンパク質と高い相同性を示し、E-III は *A. niger* AKU 3302 の銅含有アミン酸化酵素 I[2]と高い相同性を示した。

１． Sugawara, A. et al..: J. Biosci. Bioeng., **117,** 263-268 (2014)
２． Frébort, I. et al.: Eur. J. Biochem., **237**, 255-265 (1996).

4-aminobutylamide, *Aspergillus carbonarius*, amine oxidase

講演番号：3C22a06
講演日時、会場：3 月 28 日 10:05～ C 校舎 22 会場

Ochrobactrum sp. AIU 033 由来アルコール酸化酵素のクローニングと組換え発現系の構築
Cloning and expression of alcohol oxidase from *Ochrobactrum* sp. AIU 033
○武藤 瞳、山田 美和、礒部 公安（岩手大農）
○Hitomi MUTO, Miwa YAMADA, Kimiyasu ISOBE (Iwate Univ.)

【目的】医療、農業、食品工業など幅広い分野で利用可能なグリオキシル酸の酵素合成を目指し、我々は *Ochrobactrum* sp. AIU 033 から新規アルコール酸化酵素を見出してきた[1]。本酵素は、グリコール酸を酸化したが、グリオキシル酸を酸化しなかったので、高純度のグリオキシル酸の生成に適していると考えられた。しかし、*Ochrobactrum* sp. AIU 033 による本酵素の産生量は非常に低く、かつ目的酵素の精製には複数のクロマトグラフィーが必要であった。そこで、本研究では、本酵素遺伝子のクローニング，組換え大腸菌での発現について検討した。
【方法】本酵素の N 末端アミノ酸配列を BLAST 検索し、相同性の最も高い既知酵素の遺伝子情報を基にプライマーを設計し、ゲノム DNA を鋳型として PCR を行い約 2,400bp の DNA 断片を得た。そして、得られた DNA 断片を pTA プラスミドにクローニングし、pTA-GO を作製した。次に、本プラスミドを大腸菌 BL21 株に導入し、IPTG によって目的遺伝子の発現を促した。酵素活性は、グリコール酸の酸化によって生じる過酸化水素を、ペルオキシダーゼとのカップリング反応によって 555 nm で比色測定した。また、休止菌体反応によるグリオキシル酸の生成量は、HPLC で測定した。
【結果・考察】PCR 増幅した約 2,400 bp の DNA 断片の塩基配列を分析した結果、*Ochrobactrum* sp. AIU 033 由来アルコール酸化酵素のαサブユニット、βサブユニットのＮ末端アミノ酸配列と一致する領域が見出され、両サブユニットは隣り合ってゲノム上に位置していることが示された。得られた全アミノ酸配列は、推定 glucose-methanol-choline (GMC) oxidoreductase および 2-keto-gluconate dehydrogenase と高い相同性を示した。アルコール酸化酵素の中には GMC ファミリーに属するものが多数報告されていることから、本酵素がアルコール酸化酵素に分類されることを支持する結果であった。また、pTA-GO で大腸菌 BL21 株を形質転換し、IPTG 誘導を行った結果、菌体破砕液にグリコール酸酸化活性が確認され、その産生量は、80 munit/100 mL broth であり、野生株に比べて約 40 倍向上した。現在、組換え菌と 1 M グリコール酸溶液を緩衝液中で転倒混和し、グリオキシル酸生成量の高い休止菌体反応条件の検討を行っている。

[1] M. Yamada et al., Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 105, 41-48 (2014)

Ochrobactrum sp., alcohol oxidase, Glyoxylic acid

講演番号：3C22a07
講演日時、会場：3 月 28 日 10:16～ C 校舎 22 会場

Ogataea polymorpha NBRC 0799 が産生するアルコール脱水素酵素の精製と性質解明
Purification and characterization of alcohol dehydrogenase from *Ogataea polymorpha* NBRC 0799

○上田 量子[1,2]、松井 大亮[1,2]、礒部 公安[1,2]、西井 哲郎[3]、石井 章央[3]、浅野 泰久[1,2]([1]富山県大工・生工研セ、[2]JST, ERATO、[3]セントラル硝子)
○Ryoko UEDA[1,2], Daisuke MATSUI[1,2], Kimiyasu ISOBE[1,2], Tetsurou NISHII[3], Akihiro ISHII[3], Yasuhisa ASANO[1,2] ([1]Toyama Pref. Univ., [2]ERATO, JST, [3]Central Glass Co., Ltd.)

【目的】
光学活性なトリフルオロメチルアルコール類は、医薬品や農薬などの合成原料として有用であり、その簡便な合成方法の開発が望まれている。当研究室では、*Ogataea polymorpha* NBRC 0799 が 1,1,1-トリフルオロアセトンを (*S*)-1,1,1-トリフルオロ-2-プロパノールに還元することを見出している。本研究では、この反応を触媒する酵素を精製し、その諸性質を明らかにした。

【方法】
O. polymorpha NBRC 0799 は YM 培地を用いて 30℃ で 24 時間培養した。酵素は、菌体をガラスビーズで破砕した後、遠心分離で得た上清液を硫安分画、フェニル-トヨパール、Q-セファロース、ヒドロキシアパタイトの各クロマトグラフィーを行って精製した。酵素活性は 1,1,1-トリフルオロアセトンを基質として、pH 6.0 で NADH の減少速度を吸光度 340 nm で測定し、１分間に１μmol の NADH の減少を触媒する酵素量を１Ｕと定義した。また(*S*)-1,1,1-トリフルオロ-2-プロパノールの生成量はガスクロマトグラフィーで測定した。

【結果】
本菌株の酵素生成量は 24 時間培養で最大に達し、その後徐々に減少した。そこで、24 時間培養した菌体を破砕して粗酵素液を調製し、上記の方法で酵素を精製した。その結果、本精製による活性回収率は約 9%で、比活性は約 120 倍上昇し、精製酵素の比活性は 26 U/mg であった。精製酵素標品は Native および SDS-PAGE で単一のバンドで、サブユニットの分子質量は 44.1 kDa と算出された。本酵素は pH 6.0～7.0 で最も安定で、pH 5.5～6.0 で最大活性を示した。最適温度は 30～35℃ で、pH 6.0 で 50℃, 1 時間加熱した結果、約 70%の活性が残存していた。また本酵素の等電点は 5.5 で、N 末端アミノ酸配列は MKALCYLGQNKGIRW であった。その他の性質についても報告する。

Alcohol dehydrogenase, *Ogataea polymorpha*, 1,1,1-Trifluoroacetone

講演番号：3C22a08
講演日時、会場：3 月 28 日 10:27～ C 校舎 22 会場

好熱性水素細菌 *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6 のフェレドキシン還元系に関する研究

Study on the ferredoxin reduction system in a thermophilic hydrogen oxidizing bacterium, *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6

○小倉 一将、新井 博之、石井 正治（東大院農生科・応生工）
○Kazumasa OGURA, Hiroyuki ARAI, Masaharu ISHII (The Univ. of Tokyo)

好熱性水素細菌 *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6 は水素をエネルギー源、二酸化炭素を唯一の炭素源として 70°C で生育する独立栄養細菌である。本菌は還元的 TCA 回路という特徴的な代謝経路によって炭酸を固定するが、その鍵酵素の反応にはフェレドキシンが電子供与体として用いられる。一方でフェレドキシンの還元機構は未解明である。

フェレドキシンのような酸化還元電位が低い物質を還元する反応機構として Electron bifurcation が知られている。これは酸化還元的な吸エルゴン反応と発エルゴン反応を同時に行うことでエネルギー的に不利な反応を進めることができる機構である。この機構を持つ酵素は複数種類確認されているが、その一つの例として水素の酸化を還元力として用いるものが挙げられる。この酵素は水素の酸化と NAD^+および酸化型フェレドキシンの還元がカップリングした反応を触媒することが報告されている。この酵素と相同性を持つ遺伝子が *H. thermophilus* でも確認されたことから、本研究ではこの遺伝子に着目しながら、*H. thermophilus* におけるフェレドキシン還元系の解明に向けた研究を行った。

H. thermophilus の Cell free extract (CFE)に対して NAD^+の還元活性を測定したところ、水素存在条件下で NADH の生成が確認された。このことは本菌の CFE 中に、NAD^+の還元を行うヒドロゲナーゼが存在していることを示唆している。また、この系に過剰量のメチルビオロゲンを加えると、NADH の生成量は有意に増加し、さらにメチルビオロゲンの還元も見られた。この結果は、メチルビオロゲンの還元が NADH の生成量増加に影響を及ぼしたことを意味している。さらにこの反応は同時に進行したことから、*H. thermophilus* の生体内において、水素の還元力を用いることで、NAD^+と他の物質を同時に還元する機構が存在することが示された。本発表では、この酵素系について他の知見も含め報告する。

redox, Ferredoxin, Hydrogenase

講演番号：3C22a09
講演日時、会場：3 月 28 日 10:38～ C 校舎 22 会場

Lactobacillus casei 由来の L 型乳酸脱水素酵素におけるアロステリック部位変異体の解析
Analysis of allosteric site mutants in the L-lactate dehydrogenase from *Lactobacillus casei*
○久保 志歩、古川 那由太、簗瀬 優、中島 将博、田口 速男（東理大院）
○Shiho KUBO, Nayuta FURUKAWA, Yu YANASE, Masahiro NAKAJIMA, Hayao TAGUCHI (TUS)

L 型乳酸脱水素酵素(L-LDH)は、補酵素 NAD(H)を用いてピルビン酸と L 型乳酸との間の酸化還元反応を触媒する。*Lactobacillus casei* 由来の L-LDH(LcLDH)はフルクトース 1,6-ビスリン酸(FBP)によって活性化されるアロステリック酵素であり、FBP 非存在下では S 字型の基質飽和曲線を、すなわち基質によるホモトロピックな活性化を示すが、FBP 存在下では双曲線型の基質飽和曲線を示す。立体構造解析から、LcLDH のアロステリック転移は、基質親和性の高い R 状態と基質親和性の低い T 状態の２つをとる協奏（MWC）モデルに従うことが明らかになっている。アロステリック部位は P 軸サブユニット接触面に存在し、FBP の結合とそれを通しての活性化に Arg173 と His188 残基が必須な役割を果たしている。また、LcLDH では、FBP 非存在下で基質ピルビン酸がアロステリック部位に結合することが示されており、この結合が基質によるホモトロピックな活性化効果に関与する可能性が考えられる。この際、His188 は結合した基質の C3 側鎖近傍に位置すると予測され、この残基を置換することでアロステリック部位に結合する活性化因子（FBP や 2-ケト酸）の特異性が変化することが予想される。そこで本研究では、LcLDH の His188 を Ala および Gln に置換して FBP 非存在下での 2-ケト酸の活性化効果を解析した。

2 つの変異型酵素では、FBP は活性化効果を示さず、高濃度でむしろ阻害効果を示した。このことは、変異型酵素においては、R 状態よりも T 状態のほうが、FBP に対してより高い親和性をもつことを示唆している。一方、FBP 非存在下においては、変異型酵素では、いずれも見かけ上のピルビン酸親和性が低下（基質 $S_{0.5}$ 値が増大）しており、その低下の度合いは、Ala 型の変異体がより顕著であった。以上の結果は、His188 の置換が、FBP だけでなく、ピルビン酸の活性化効果までも減少させたことを示している。さらに、野生型酵素ではオキサロ酢酸や 2-ケトグルタル酸が活性化効果を示したのに対し、2 つの変異型酵素では、これらはいずれも顕著な活性化効果を示さなかった。しかしながら、興味深いことに、野生型酵素に対しては活性化効果を示さなかったフェニルピルビン酸や 2-ケトイソカプロン酸が、変異型酵素に対しては顕著な活性化効果を示した。この活性化効果は Gln 変異体においてより顕著にみられ、基質親和性に加えて V_{max} にも顕著な増加がみられた。以上の結果は、LcLDH においては、188 位のアミノ酸側鎖がアロステリック部位の電荷や大きさ、形状を決め、すなわちアロステリック因子の特異性や調節特性を決める上に重要な役割を担っていることを強く示唆している。

L-lactate dehydrogenase, allosteric regulation, *Lactobacillus casei*

講演番号：3C22a10
講演日時、会場：3 月 28 日 10:49～ C 校舎 22 会場

グラム陰性細菌由来アロステリック型四量体 D 型乳酸脱水素酵素の機能と構造における多様性
Variety of allosteric and tetrameric D-lactate dehydrogenase from Gram-negative bacteria

○古川 那由太[1]、宮永 顕正[2]、戸川 美里[1]、中島 将博[1]、田口 速男[1] ([1]東理大院、[2]東工大院)
○Nayuta FURUKAWA[1], Akimasa MIYANAGA[2], Misato TOGAWA[1], Masahiro NAKAJIMA[1], Hayao TAGUCHI[1] ([1]TUS, [2]Tokyo Tech)

D 型乳酸脱水素酵素(D-LDH)は、補酵素 NAD を用いてピルビン酸と D 型乳酸との間の酸化還元反応を触媒する酵素で、生理的には L 型乳酸脱水素酵素(L-LDH)と同様、嫌気的解糖経路の最終段階を担う酵素として知られている。また、近年生分解性プラスチックであるポリ乳酸の合成に有用であることから、産業的にも注目されている。これまで、乳酸菌由来の D-LDH においては、機能と構造に関する研究が精力的に進められ、これらが非アロステリック型酵素で、ホモ二量体構造をとることが知られている。一方、これらと系統的に隔たるグラム陰性細菌由来の酵素についてはほとんど知見がない。そこで本研究では、偏性嫌気性の *Fusobacterium nucleatum* (FNLDH)、好気性の *Pseudomonas aeruginosa* (PALDH)、通性嫌気性の大腸菌 (ECLDH)と、進化系統的に遠縁で、タイプが異なる代表的な 3 種類のグラム陰性細菌由来の D-LDH の生化学的解析と X 線結晶構造解析を行った。

反応速度論解析の結果、弱アルカリ性において、FNLDH と ECLDH は基質ピルビン酸によって正のアロステリック協同効果を示したが、PALDH は逆に負のアロステリック協同効果を示した。また、細菌アロステリック L-LDH の活性化因子として知られている解糖系中間代謝産物の Fructose-1,6-bisphosphate や、二価金属イオンの Mg^{2+}は、ECLDH に対して有意な活性化効果を示さなかったが、FNLDH と PALDH に対しては顕著な活性化効果を示した。さらに、これらの酵素の構造解析を行い、FNLDH と PALDH はアポ型構造 (分解能はそれぞれ 2.5 Å と 2.3 Å) と基質類似体、NADH が結合したホロ型構造 (分解能はそれぞれ 2.3 Å と 2.0 Å)、ECLDH はアポ型構造(分解能は 2.1 Å)を決定することに成功した。3 種類の酵素はいずれも新規なホモ四量体構造をもっており、新規なサブユニット間では、触媒ドメインが互いに近接した位置におかれていた。FNLDH と PALDH のアポ型構造とホロ型構造を比較したところ、ホロ型構造では触媒ドメインが基質を挟み込むように閉じており、その結果として、アポ型構造よりもサブユニット間で互いに離れた位置におかれていた。また、表面静電ポテンシャルから、FNLDH と ECLDH は 2 つの触媒ドメイン間で静電的引力が、PALDH は負電荷による静電的斥力が生じていることが示唆された。以上の観察結果は、触媒ドメインのサブユニット間相互作用が、基質結合にともなう触媒ドメインの開閉運動に影響を与え、結果的に、基質によるホモトロピックなアロステリック協同効果を生み出していることを示唆している。そして、その相互作用の相違が、これらの D-LDH に多様な調節特性を生み出す大きな要因となっていることを強く示唆している。

D-lactate dehydrogenase, Gram-negative bacteria, allosteric regulation

講演番号：3C22a11
講演日時、会場：3 月 28 日 11:10～ C 校舎 22 会場

ニワトリ脂肪肝で特異的に発現する NAD(P)H 依存性カルボニル還元酵素のＸ線結晶構造解析

Crystal structure analysis of NAD(P)H-dependent carbonyl reductase specifically expressed in thyroidectomized chicken fatty liver

○福田 雄大[1]、曽根 孟起[1]、荒木 朋洋[1]、仁木 隆博[1]、櫻庭 春彦[2]、大島 敏久[3]、芝田 猛[1]、米田 一成[1] ([1]東海大学、[2]香川大学、[3]大阪工業大学)

○ Yudai Fukuda[1], Takeki Sone[1], Tomohiro Araki[1], Takahiro Niki[1], Haruhiko Sakuraba[2], Toshihisa Ohshima[3], Takeshi Shibata[1], Kazunari Yoneda[1] ([1]Tokai University, [2]Kagawa University, [3]Osaka Institute of Technology)

【目的】ニワトリの脂肪肝で特異的に発現するタンパク質には 3 種類のベタイン-ホモシステイン S-メチルトランスフェラーゼ(BHMT;45 kDa)、機能未知タンパク質(27 kDa)の合計 4 種類のタンパク質が確認されている。本研究ではこの機能未知である 27 kDa のタンパク質に着目し、研究を行った。本機能未知タンパク質の機能、立体構造解析を行うことで、ニワトリ脂肪肝中での機能未知タンパク質の生理的意義解明や脂肪蓄積メカニズムの基礎的な解明を行うことを目的としている。脂肪蓄積メカニズムの解明は動物生産及び肥満における代謝異常改善、低脂肪計の作出につながると考えられる。
【方法・結果】外科的甲状腺除去により人工的に脂肪蓄積を亢進させたニワトリを作成し、このニワトリの脂肪肝由来タンパク質を 2 次元電気泳動で分離後、正常肝と比較することで、肝臓において脂肪蓄積亢進とともに発現が増強しているタンパク質を検出した[1)]。ニワトリのゲノム情報から脂肪肝特異的に発現するタンパク質をコードする機能未知遺伝子(NCBI-XP_414028)を同定後、本遺伝子の合成を行い、大腸菌発現用ベクターである pET15b に挿入し、大腸菌 BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL 株を用いて IPTG による遺伝子の発現を行った。アミノ酸配列の特徴から機能を予測し、酵素活性測定を行った結果、NAD(P)H 依存性カルボニル還元酵素(CR)活性の検出に成功した。さらに基質特異性、阻害剤などの酵素化学的性質についても明らかにした。さらに、精製酵素を用いて本酵素の結晶化を試みたところ、PEG5000 を沈殿剤として NADPH との複合体結晶を取得し、高エネルギー加速器研究機構において X 線解析実験を行った[2)]。分子置換法により CR-NADPH-エチレングリコールの 3 者複合体を分解能 1.98Å で構造決定に成功した。本酵素は非対称単位中に 2 分子存在し、A サブユニットの基質結合部位にのみクロイオプロテクタントであるエチレングリコールが結合していた。AB サブユニットの構造を比較したところ基質結合ループに存在する Y172 の側鎖が 103.7° 回転することにより基質結合部位に蓋をする役割があることが推察された。他の生物種由来の CR にはこの Y172 に相当するアミノ酸残基が全く保存されていないことから、ニワトリ CR に特有の新規な知見であると考えられる。現在この仮説を検証するため Y172 の変異体の作成を行っている。

[1)] Shibata, T., *et al*. *Poultry Science* 82 (2003), 207-213.

[2)] Yoneda, K., *et al*. *Acta Crystallographica Section F* 68 (2012), 1568-1570.

NAD(P)H-dependent carbonyl reductase, crystal structure, short-chain dehydrogenase/reductase family

講演番号：3C22a12
講演日時、会場：3 月 28 日 11:21～ C 校舎 22 会場

超好熱性古細菌フェレドキシン NADP+ レダクターゼの構造と機能

Structure and function of ferredoxin NADP+ reductase from a hyperthermophile

イェン チェン、馬込 明音、荒川 孝俊、伏信 進矢、○若木 高善（東京大学・院農生科・応生工）
Zhen YAN, Akane MAGOME, Takatoshi ARAKAWA, Shinya FUSHINOBU, ○ Takayoshi WAKAGI (The Univ. Tokyo, Dept. Biotechnol.)

超好熱性古細菌の原始的中央代謝系においては、フェレドキシン（Fd）が可逆的な炭酸固定などで重要な役割を果たしている。Fd の酸化還元に関与する酵素として、フェレドキシン NADP+ レダクターゼ（FNR）が知られている。超好熱性古細菌においてはこれまでに、*Pyrococcus furiosus* 由来のヘテロダイマー酵素（PfFNR）と、*Sulfolobus tokodaii* ST2133 由来のホモダイマー酵素(StFNR)が報告されている。両者のホモロジーは低く、PfFNR は亜硫酸還元酵素の活性をも示す。昨年我々は、ST2133 が多機能性の酵素で、FNR 活性やチオレドキシン還元酵素（TrxR）様の活性などを併せ持つことを報告した。同属の *Sulfolobus solfataricus* 由来の類縁酵素には、Sso2222（NADH oxidase or Trx-B1）、Sso2416（Trx-B2）、Sso2765（Trx-B3, 3F8P）があるが、これらの FNR 活性は報告されていない。

今回の報告では、StFNR の多様な機能の構造基盤を明らかにするために、立体構造の解析を目指した。各種のリガンド共存下に酵素の結晶化を試みる一方で、ホモロジーモデリング（SWISS-MODEL）によって立体構造の推定をおこなった。

鋳型として *Thermus thermophilus* HB8 由来 TrxR 様蛋白質（2ZBW, FAD との複合体）（50% identity）を用いて推定構造を得た。ST2133 のオルソログ酵素 Sso-TrxB3 は identity 32%であった。推定構造は 2zbw と RMS = 0.094 オングストローム(3843/4252 原子)で重ね合わせられた。全体構造はホモダイマーで、モノマーは二つのドメイン（1 – 119, 247 – 332 のコアドメイン[サブユニットの会合に関わる]と 120 – 246 の外部ドメイン）からなり、 内在性の FAD はコアドメインに結合すると思われる。NADP 結合部位や、StFNR で特徴的な、FMN による顕著な活性化の原因などを探索中である。

oxidoreductase, hyperthermophile, ferredoxin

講演番号：3C22a13
講演日時、会場：3 月 28 日 11:32～ C 校舎 22 会場

Amphibacillus xylanus の NADH oxidase (Nox)-AhpC (Prx)複合体の溶液構造
The solution structure of NADH oxidase (Nox)-AhpC (Prx) complex from *Amphibacillus xylanus*

○木俣 真弥[1]、望月 大地[1]、原 敬太[1]、松本 崇[2]、矢嶋 俊介[1]、有坂 文雄[3]、金丸 周司[3]、佐藤 純一[1]、川崎 信治[1]、新村 洋一[1] ([1]東農大応生科・バイオ、[2]リガク、[3]東工大生命理工・分子生命科学)
○Shinya KIMATA[1], Daichi MOCHIZUKI[1], Keita HARA[1], Takashi MATSUMOTO[2], Shunsuke YAJIMA[1], Fumio ARISAKA[3], Shuji KANAMARU[3], Junichi SATO[1], Shinji KAWASAKI[1], Youichi NIIMURA[1] ([1]Dept. Bio. Tokyo Univ. Agric., [2]Rigaku Co., [3]Dept. Bio. and Biotec. Tokyo Inst. Teck.)

〈背景・目的〉

Amphibacillus xylanus は呼吸鎖だけでなくカタラーゼを欠如するが、良好な好気的生育と大腸菌に匹敵する酸素吸収力を示す。本菌の酸素代謝酵素 NADH oxidase (Nox) は β-NADH を電子供与体として酸素を過酸化水素に還元し、AhpC (Prx) 存在下で過酸化物 (過酸化水素や過酸化アルキル) を還元する [1)]。したがって Nox-Prx 系は細胞内の酸化還元バランス維持と酸素代謝を同時に行う重要酵素系である [2)]。本酵素系の過酸化物還元反応は、電子が 2 タンパク質に存在する合計 4 つの官能基 (1 FAD と 3 ジスルフィド) を経由して進行するが [1)]、初期反応の FAD 還元速度 (200 sec^{-1}) とほぼ同速 (150~180 sec^{-1}) で最終的な過酸化物還元反応が完結するため [1)]、Nox と Prx の密接な相互作用が推定される。Nox-Prx 複合体のイオン強度依存性形成は表面プラズモン共鳴法、動的光散乱法 (DLS)、超遠心沈降速度法 (AUC) の結果から支持されている [3)]。 そこで、本大会では Nox-Prx 複合体の溶液構造を X 線小角散乱法 (株式会社リガク製 BioSAXS-1000) にて検討した。

〈方法・結果〉

以前の解析結果を基に、複合体形成最適条件 (300 mM 硫酸アンモニウム) で以下の実験を行った。

Ⅰ. Prx の溶液構造 ： 我々は以前に DLS と結晶構造解析 [4)]により Prx の 10 量体形成を報告した。観察された Prx 溶液構造は、結晶構造解析結果を支持した。

Ⅱ. NADH oxidase の溶液構造とモデル構築 ：AhpF は Nox と同じ Prx oxidoreductase family に属し、51.2%のアミノ酸一配列相同性を有す。X 線小角散乱解析で得られた Nox のビーズモデルに、AhpF の結晶構造を当てはめた。ドメインごとにモデリングした結果、推定された Nox の溶液構造は AhpF の結晶構造と異なったが、その還元反応時における推定構造［Wood ら, *Biochemistry*. (2001).］を支持した。

Ⅲ. NADH oxidase-Prx 複合体の溶液構造: AUC で Nox-Prx 複合体に対応する単一のシグナルピークが観察された最適条件 (Nox : Prx = 1 : 10) にて Nox-Prx 複合体の形成が観察された。

以上の結果を基に Nox-Prx 複合体形成と高速な過酸化物還元反応の関係を考察する。

〈参考文献〉

1) Niimura, Y. et al. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 25645-25650. 2) Mochizuki, D. et al. (2014) *Microbiology.***160,** 340-352. 3) 望月大地ら (2014) 農芸化学会. 4) Kitano, K. et al. (2005) *Proteins.* **59**, 644-647.

NADH oxidase, Prx, Complex

講演番号：3C22a14
講演日時、会場：3 月 28 日 11:43～ C 校舎 22 会場

Crystal structure of 5-formyl-3-hydroxy-2-methylpyridine 4-carboxylic acid 5-dehydrogenase, an NAD^+-dependent dismutase from *Mesorhizobium loti*

○ANDREW MUGO[1], Jun Kobayashi[2], Bunzo Mikami[2], Yu Yoshikane[1], Toshiharu Yagi[1], Kouhei Ohnishi[1] ([1]Kochi Univ., [2]Kyoto Univ.)

5-Formyl-3-hydroxy-2-methylpyridine 4-carboxylic acid 5-dehydrogenase (FHMPCDH) from *Mesorhizobium loti* is the fifth enzyme in degradation pathway I for pyridoxine. The enzyme catalyzes a dismutation reaction: the oxidation of 5-formyl-3-hydroxy-2-methylpyridine 4-carboxylic acid (FHMPC) to 3-hydroxy-2-methylpyridine 4, 5-dicarboxylic acid (HMPDC) with NAD^+ and reduction of FHMPC to 4-pyridoxic acid with NADH. FHMPCDH belongs to the L-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (HAD) family. The crystal structure was determined by molecular replacement and refined to a resolution of 1.55 Å (R-factor of 16.4%, R_{free}=19.4%). There were two monomers in the asymmetric unit. The overall structure of the monomer consisted of N-and C-terminal domains connected by a short linker loop. The monomer was similar to members of the HAD family (RMSD=1.9 Å).The active site was located between the domains and highly conserved to that of human heart HAD (HhHAD). His-Glu catalytic dyad, a serine and two asparagine residues of HhHAD were conserved. Ser116, His137 and Glu149 in FHMPCDH are connected by a hydrogen bonding network forming a catalytic triad. Asn188 may be involved in substrate-binding and stabilization of the bound substrate during the catalysis. Asn140, which is located near the nicotinamide ring, is likely involved in substrate anchoring.

5-Formyl-3-hydroxy-2-methylpyridine 4-carboxylic acid 5-dehydrogenase, degradation pathway I for pyridoxine, catalytic triad

講演番号：3C22a15
講演日時、会場：3 月 28 日 11:54～ C 校舎 22 会場

ジベンゾチオフェンモノオキシゲナーゼ（TdsC）の立体構造解析と機能改変
Strucural analysis and improvement of dibenzothiophene monooxygenase (TdsC)
○浜本 春香[1]、日野 智也[1]、八木 寿梓[2]、鈴木 宏和[1]、永野 真吾[1]、大城 隆[1] ([1]鳥取大院・工、[2]鳥取大・工・GSC)
○Haruka HAMAMOTO[1], Tomoya HINO[1], Hisashi YAGI[2], Hirokazu SUZUKI[1], Shingo NAGANO[1], Takashi OHSHIRO[1] ([1]Tottori Univ., [2]Tottri Univ. GSC)

【目的】
フラビン依存性二成分型モノオキシゲナーゼは、様々な抗生物質の生合成や有機硫黄化合物の分解代謝などの広範な生体反応に関わることが知られている。このモノオキシゲナーゼは不安定な還元型フラビンを補酵素として利用するため、NAD(P)H を電子供与体として還元型フラビンを供給するフラビンレダクターゼとカップリングして酵素反応が進行する。これまでに当研究室では、微生物脱硫に関する研究を実施し、モデル化合物ジベンゾチオフェン（DBT）の代謝にフラビン依存性モノオキシゲナーゼが関与することを明らかにした。好熱菌 *Paenibacillus* sp. A11-2 由来のジベンゾチオフェンモノオキシゲナーゼ（TdsC）は、DBT やベンゾチオフェン（BT）の硫黄原子に酸素を添加する反応を触媒し，また Indole を基質としてインジゴを生成する。類似の酵素としては *Rhodococcus erythropolis* 由来の DszC が知られているが、これは基質特異性や熱安定性において TdsC とは大きく異なる。本研究では、TdsC の立体構造解析を行い，その基質結合部位を明らかにした。さらに，得られた知見に基づいた TdsC 酵素機能の改変も試みた。
【方法・結果】
TdsC を高生産する組換え大腸菌を構築し、得られた精製酵素を用いて TdsC の結晶を作成し、立体構造を決定した。さらに TdsC の結晶を DBT 溶液（β-シクロデキストリン溶液に溶解）あるいは FMN、Indole 溶液にソーキング後、X 線結晶構造解析を行ったところ、分解能 1.7～1.9 Å で TdsC-FMN、TdsC-Indole、TdsC-DBT-FMN、TdsC-Indole-FMN 等の酵素‐基質複合体の立体構造を明らかにすることができた。遊離型 TdsC と各基質結合型 TdsC の立体構造を比較することにより、FMN の結合に伴って FMN 結合部位付近の Ala127-Arg139 のループ領域の位置が移動することが明らかになった。遊離型 TdsC には基質および FMN が結合するキャビティーがなく、FMN 結合型ではキャビティーが存在していることから、FMN が結合するときにループ領域が動き、基質および FMN が結合するキャビティーを形成するのではないかと考えられた。また、FMN・基質結合部位近傍に存在する Tyr93 と His388 が酸素添加に直接関わっていると考え、Ala への置換を行ったところ、Y93A 置換体では DBT に対する活性が上昇し、BT と Indole に対する活性は著しく減少した。これは Tyr が Ala に変化し基質結合部位のキャビティーが大きくなったことにより、分子量の大きな DBT が結合しやすくなり、小さな BT や Indole は安定化されにくくなったことによるものと考えられた。

dibenzothiophene, monooxygenase, protein structure

講演番号：3C22p01
講演日時、会場：3 月 28 日 14:00～ C 校舎 22 会場

海洋性アンモニア酸化細菌 Nitrosomonas cryotolerans のシトクロム c554 の精製と発現系の構築
Purification, characterization, and expression of cytochrome c554 from marine ammonia-oxidizing bacterium Nitrosomonas cryotolerans

○塩谷 惟、藤原 健智 (静岡大学)
○Yui SHIOYA, Taketomo FUJIWARA (Shizuoka Univ.)

【目的】　アンモニア酸化細菌（ammonia-oxidizing bacteria：AOB）は化学合成独立栄養細菌であり、アンモニウム塩を亜硝酸塩へ酸化する硝化作用をつかさどる重要な環境微生物である。AOB によるアンモニア酸化は、β-プロテオバクテリアに属する土壌性の AOB である *Nitrosomonas europaea*、およびγ-プロテオバクテリアに属する海洋性の *Nitrosococcus oceani* を対象として研究が進められ、次のような生化学的機構が明らかとなっている。すなわち、ammonia monooxygenase（AMO）によってアンモニウム塩から生じたヒドロキシルアミン（NH2OH）は、hydroxylamine oxidoreductase（HAO）によって 4 電子酸化され、亜硝酸塩に変換される。その際、HAO からの電子は、シトクロム *c*554 と呼ばれる *c* 型シトクロムを経て、AMO 反応および呼吸鎖電子伝達系へと伝達される。今回私は、海洋環境におけるアンモニア酸化反応の特徴付けを目的として、海洋性のβ-AOB である *Nitrosomonas cryotolerans* からシトクロム *c*554 を精製し、その分子的性質を明らかにするとともにその遺伝子クローニングを行った。さらにその過剰発現系の構築に成功した。

【結果と考察】　アンモニウム塩を加え MOPS で緩衝させた人工海水を用いて培養した *N. cryotolerans*（ATCC49181）から、硫酸アンモニウムによる塩析と水素結合クロマトグラフィーによってシトクロム c554 を電気泳動的に均一に精製した。得られたシトクロム c554 は、高スピン型ヘムと低スピン型ヘムの混在を表す特徴的な可視吸収スペクトルを示した。また、精製標品の N 末端アミノ酸配列、および他の AOB のゲノム情報に基づいて設計したプライマーを用いて *N. cryotolerans* シトクロム *c*554 遺伝子の PCR 増幅を行い、前駆体全長をコードする DNA 配列を決定した。さらに、*Shewanella oneidensis* を宿主とする *N. cryotolerans* シトクロム *c*554 の発現系の構築を試みた。シトクロム *c*554 前駆体遺伝子のうち、輸送シグナル配列を除いた領域を、*S. oneidensis* で高発現する *c* 型シトクロム CctA の遺伝子プロモーターおよびシグナル配列と連結することで、シトクロム *c*554 の発現プラスミドを作成した。これを *S. oneidensis* に形質転換したところ、培養液 1L あたり 1,7mg のシトクロム *c*554 組み換え体の発現と精製に成功した。今後は、シトクロム *c*554 組み換え体を用いて、その分子的構造と機能との関連を分析していく予定である。

ammonia oxidation, nitrosomonas cryotolerans, nitrification

講演番号：3C22p02
講演日時、会場：3 月 28 日 14:11～ C 校舎 22 会場

マグネタイトの生合成における磁性細菌特有の *c* 型シトクロム MamP の役割

Role of magnetotactic bacteria-specific *c*-type cytochrome MamP in magnetite biomineralization

○江口 友佳子[1]、見世 慎吾[1]、田岡 東[2,3]、福森 義宏[2,3] ([1]金沢大院自然科学、[2]金沢大理工、[3]金沢大バイオ AFM 先端研究センター)
○Yukako EGUCHI[1], Shingo MISE[1], Azuma TAOKA[2,3], Yoshihiro FUKUMORI[2,3] ([1]Grad. Sch. Nat. Sci. Tech., Kanazawa Univ., [2]Coll. Sci. Eng., Kanazawa Univ., [3]Bio-AFM Front. Res. Cent., Kanazawa Univ.)

磁性細菌 *Magnetospirillum magneticum* AMB-1 は、膜小胞内にマグネタイト(Fe_3O_4)を生合成することで、マグネトソームという磁気オルガネラを形成する。マグネトソーム形成の分子機構は不明であるが、その形成に必須の遺伝子群はゲノム上のマグネトソームアイランド(MAI)と呼ばれる領域内に集約されている。MAI の遺伝子群にコードされる蛋白質のうち、MamE, P, T, 及び X はアミノ酸配列中に推定膜貫通領域と、2 つの保存されたヘム *c* 結合モチーフを持つ。マグネタイトは Fe^{2+} と Fe^{3+} から構成され、その合成には鉄の酸化還元反応が必要である。このことから、MAI にコードされるヘム蛋白質はマグネタイトの生合成のための鉄の酸化還元反応を担っていると考えられる。近年 MamP の可溶性領域の立体構造が明らかにされ、MamP は 2 分子のヘム *c* を持つ新規の *c* 型シトクロムであることが明らかになった。そこで本研究では MamP に着目し、その生理的機能解析を試みた。
まず、MamP が膜結合型の *c* 型シトクロムかどうかを調べるため、AMB-1 における MamP の細胞内局在を調べた。AMB-1 細胞を可溶性画分、膜画分、マグネトソーム画分に分画し、イムノブロッティングを行った結果、MamP は主に膜画分に局在していた。また、抗 MamP 抗体を用いた免疫蛍光染色の結果、MamP はマグネトソームではなく、細胞質膜に局在していることが示された。
次に、MamP の機能を解析するため、*M. magneticum* AMB-1 野生株において、蛋白質発現ベクターを用いて、野生型 MamP またはヘム *c* 結合モチーフを変異させた変異型 MamP を過剰発現させた。ヘム *c* 結合モチーフ変異型 MamP にはヘム c が結合できないことを大腸菌で確認した。野生型 MamP 過剰発現株、変異型 MamP 過剰発現株の表現型を透過型電子顕微鏡により観察した。その結果、野生型 MamP 過剰発現株では、野生株と比較して対数増殖期の細胞内のマグネタイト結晶の数が顕著に増加した。一方、変異型 MamP 過剰発現株では、結晶の数の増加は見られず、野生株との違いはなかった。さらに、変異型 MamP 過剰発現株において、マグネタイト結晶のサイズが野生株と比較して小さくなった。以上の結果から、MamP はマグネタイトの結晶成長に関わる膜結合型の *c* 型シトクロムであることが示唆された。現在、MamP がどのような電子伝達経路に関わるシトクロムなのかを明らかにするため、呼吸鎖電子伝達系と MamP との関連を解析している。

magnetotactic bacteria, biomineralization, *c*-type cytochrome

講演番号：3C22p03
講演日時、会場：3 月 28 日 14:22～ C 校舎 22 会場

化学修飾されたチロシンが配位したヘムを有する anammox 菌由来のシトクロム *c*

Cytochrome *c* having a chemically modified tyrosine-coordinated heme from an anammox bacterium strain KSU-1

○平 大輔[1]、能登原 暁穂[1]、中村 照也[2]、山縣 ゆり子[2]、古川 憲治[3]、藤井 隆夫[1]([1]崇城大応生命、[2]熊大院薬、[3]熊大院自然科学)

○ Daisuke HIRA[1], Akio NOTOHARA[1], Teruya NAKAMURA[2], Yuriko YAMAGATA[2], Kenji FURUKAWA[3], Takao FUJII[1] ([1]Dep. Appl. Life Sci., Sojo Univ., [2]Grad. Sch. Pharm. Sci., Kumamoto Univ., [3]Grad. Sch. Sci. Tech., Kumamoto Univ.)

【目的】ある種の細菌は嫌気的にアンモニアを酸化する（anaerobic ammonium oxidation：anammox）反応を行っている。anammox 反応では、亜硝酸が酸化剤となり、アンモニアと亜硝酸の窒素原子由来の窒素ガスが嫌気的に生じる。この反応過程においてヒドラジンが中間体となることが明らかとなっているが、反応機構の全容解明には至っていない。我々は独自に集積した anammox 菌 KSU-1 株よりヘムタンパク質ならびにヘム酵素群を精製し、反応機構の解明に取り組んできた。本研究では、精製過程で得られた特徴的な分光学的性質を示す低分子量モノヘムシトクロム *c*（遺伝子番号 c_855）について、その生化学的性質を明らかにし、X 線結晶構造解析による立体構造解明を行った。

【方法】anammox 菌 KSU-1 株より精製・同定した低分子量モノヘムシトクロム *c* 遺伝子 c_855 をプラスミド pET20 に挿入し、大腸菌 BL21(DE3)株で発現させた。発現させたシトクロム *c*（c_855）を各種カラムクロマトグラフィにより精製し、吸収スペクトル測定、MALDI-Tof MS による分子量測定を行った。また、蒸気拡散法により c_855 の単結晶化を行い、SPring-8 bl44XU にて X 線回折データ収集を行い、 立体構造の解明を行った。

【結果・考察】精製した c_855 は典型的な His/Met もしくは His/His 配位の *c* 型ヘムタンパク質とは異なる吸収スペクトルを示した。さらに、還元後にヒドロキシルアミンもしくは一酸化窒素を添加することでスペクトルが変化し、これら窒素小分子との結合能を有していることが推定された。c_855 の単結晶は硫酸アンモニウムを沈殿剤とした結晶化条件で得ることができ、X 線回折データをもとに Fe-SAD 法によって立体構造の解明に成功した。その結果、c_855 はαヘリックスから成る class I のシトクロム *c* に特徴的な 3 次構造を形成していることが明らかとなった。一方、そのヘム鉄には第 5 配位子 His 15 の側鎖による結合に加えて、第 6 配位子として Tyr 60 の側鎖が近接していた。また、その Tyr 側鎖には帰属出来ない余分な電子密度が確認され、Tyr 60 側鎖は化学修飾されておりその部分がヘム鉄と結合しているようにみえた。さらに、MALDI-Tof MS による分子量測定の結果と c_855 の計算分子量の差より、余分な電子密度は OH であり、Tyr 60 は DOPA (3,4-ジヒドロキシフェニルアラニン)へと化学修飾されていると帰属出来た。c_855 は His/DOPA 配位の新奇なヘムを有していることが明らかとなった。

anammox, cytochrome c, heme

講演番号：3C22p04
講演日時、会場：3 月 28 日 14:33～ C 校舎 22 会場

好熱菌および常温菌由来シトクロム c'への変異導入による安定性変化

Stability changes of homologous cytochrome c' from thermophile and mesophile by mutation analysis

○藤井 創太郎[1]、山根 大典[1]、政成 美沙[1]、若井 暁[2]、山中 優[3]、三本木 至宏[1]([1]広島大生物圏、[2]神戸大自然、[3]奈良先物質)
○ Sotaro FUJII[1], Daisuke YAMANE[1], Misa MASANARI[1], Satoshi WAKAI[2], Masaru YAMANAKA[3], Yoshihiro SAMBONGI[1] ([1]Hiroshima Univ., [2]Kobe Univ., [3]NAIST)

【目的】　シトクロム *c′* は、ヘム蛋白質の一種であり、細菌のみが有する。その多くはホモ 2 量体で存在し、各サブユニットは4-ヘリックスバンドルと呼ばれる筒状の構造をとる。生体内では、脱窒時の NO 伝達に機能していると言われている。その中でも、常温菌 *Allochromatium vinosum* 由来シトクロム *c′*（AVCP）は、ヘムに CO が結合するとサブユニットが解離することが分かっており、ガスセンサーとして応用できる可能性を持つ。

しかしながら、AVCP は安定性が低く、応用する上では安定であることが望ましい。当研究室で、アミノ酸配列が 55%一致する好熱菌 *Hydrogenophilus thermoluteolus* 由来シトクロム *c′*（PHCP）を導入し、PHCP のほうが AVCP よりも高い熱安定性を持つことを明らかにした。さらに、PHCP の X 線結晶構造を決定し、その構造から安定化に寄与しているアミノ酸側鎖を推定した。PHCP と AVCP のアミノ酸残基を相互に入れ替える変異導入を行うことで、PHCP の安定化機構を解明する。

【方法・結果】　AVCP のアミノ酸側鎖を PHCP に近づける変異体 F18T、A20G、Y37F、A39Q、D71F、A97Q/A116Q、135insE を大腸菌の異種発現によって作製した。CD スペクトルを測定すると、野生型および全ての変異体で 208 nm および 222 nm を観測した。昇温にともなう CD スペクトル 222 nm の変化から、熱安定性を測定した。野生型 AVCP の変性温度中点 T_m は 52°C であり、安定性の向上が観測できたのは F18T（+6°C）、A20G（+7°C）、D71F（+1°C）であった。PHCP の構造上、Thr18 はもう一方のサブユニットの Thr18 と水素結合を形成し、Phe71 は互いにπ–πスタッキングしている。Ala20 は、ヘムとの疎水性相互作用の向上およびヘリックスの安定化に寄与していると考えられる。AVCP 変異体での安定性の向上は、PHCP で観測される相互作用が AVCP でも形成されていることを示唆する。また、Y37F、A39Q、135insE では安定性の大きな差はみられず、A97Q/A116Q では安定性が大きく低下した（-10°C）。

また、PHCP のアミノ酸側鎖を AVCP に近づける変異体 A20G を作製し、CD スペクトルで熱安定性を測定した。野生型 PHCP の T_m = 87°C と比較して、A20G の T_m は 3°C 低下した。以上の結果から、PHCP の安定化要因として、Ala20 が寄与することを示した。

Cytochrome c, CD spectrum, Thermal stability

講演番号：3C22p05
講演日時、会場：3 月 28 日 14:44～ C 校舎 22 会場

常温菌 Shewanella amazonensis 由来シトクロム c′ の熱安定性
Thermal stability of cytochrome c' from mesophilic Shewanella amazonensis
○加藤 雄基[1]、藤井 創太郎[2]、政成 美沙[2]、三本木 至宏[2] ([1]広島大・生物生産、[2]広島大院・生物圏)
○Yuki KATO[1], Sotaro FUJII[2], Misa MASANARI[2], Yosihiro SAMBONGI[2] ([1]Hiroshima Univ, [2]Hiroshima Graduate School)

【目的】シトクロム *c′* は、1991 年 R. P. Ambler によって分類され、シトクロム *c* の 4 つのクラスの中においてクラスⅡに属している。その構造は、4 本のαヘリックスが束になった 4-helix bundle であり、多くは 2 量体として存在する。本研究室では、52℃の好熱菌 *Hydrogenophilus thermoluteolus* 由来シトクロム *c′*（PHCP）の安定性が、至適生育温度 25℃の常温菌 *Allochromatium vinosum* 由来シトクロム *c′*（AVCP）よりも高いことを示している。*Shewanella amazonensis* は至適生育温度 37℃の常温菌であり、既知の 2 種の至適生育温度の中間に位置する菌である。*S. amazonensis* 由来シトクロム *c′*（SACP）の熱安定性を測定することで、菌の至適生育温度とシトクロム *c′* の熱安定性の相関性を明らかにする。

【方法・結果】LB 液体培地で培養した *S. amazonensis* 菌体をフレンチプレスで破砕し、可溶性画分を得た。この可溶性画分から DEAE、Hi-trap Q、Hi-trap SP、およびゲル濾過カラムを用いて SACP を精製した。プロテインシーケンサーにより SACP の N 末端配列を決定したところ、ゲノムデータベース上の配列と一致した。精製 SACP 蛋白質溶液の CD（円偏光二色性）スペクトルを測定すると、208nm および 222nm に負のピークを持つことがわかった。これは AVCP と PHCP で得られる CD スペクトルと同様であり、SACP も 2 次構造としてαヘリックスを持った構造をしていることがわかった。

次に CD スペクトル 222nm を追うことによって熱安定性を測定したところ、SACP の変性中点温度 T_m が 62℃であることがわかった。AVCP と PHCP の T_m はそれぞれ 52℃、87℃であるので、SACP の T_m はその中間となった。また熱変性に伴うエンタルピーとエントロピーの変化の値についても、SACP は AVCP と PHCP の間の値を示した。

以上の結果から SACP の熱安定性は AVCP と PHCP の中間であり、由来する菌の至適生育温度とシトクロム *c′* 熱安定性に相関があると結論づけた。SWISS-MODEL により SACP の構造をシミュレーションすると、主鎖の構造は AVCP や PHCP と似ていることがわかった。αヘリックス領域中の Gly に着目すると、その数が多いほど安定性が下がる傾向があることを見出した。

cytochrome c', Shewanella amazonensis, thermal stability

講演番号：3C22p06
講演日時、会場：3 月 28 日 15:05～ C 校舎 22 会場

CYP105A1 三重変異体発現 *Rhodococcus* 属放線菌を用いたビタミン D 水酸化体の生産
Production of hydroxylated Vitamin D in *Rhodococcus erythropolis* cells expressing CYP105A1 variants

○余語 祐哉[1]、安田 佳織[1]、真野 寛生[1]、林 恵子[1]、杉本 宏[2]、滝田 禎亮[3]、保川 清[3]、安武 義晃[4]、田村 具博[4]、太田 美穂[5]、鎌倉 昌樹[1]、生城 真一[1]、榊 利之[1] ([1]富県大・工・生物工、[2]理研播磨、[3]京大院・農、[4]産総研、[5]相愛大・人間発達)
○Yuya YOGO[1], Kaori YASUDA[1], Hiroki MANO[1], Keiko HAYASHI[1], Hiroshi SUGIMOTO[2], Teisuke TAKITA[3], Kiyoshi YASUKAWA[3], Yoshiaki YASUTAKE[4], Tomohiro TAMURA[4], Miho OHTA[5], Masaki KAMAKURA[1], Shinichi IKUSHIRO[1], Toshiyuki SAKAKI[1] ([1]Dep. of Biotech., Fac. of Engineer., Toyama Pref. Univ., [2]RIKEN Spring-8, Harima Inst., [3]Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [4]AIST, [5]Dept. Develop, Soai Univ.)

放線菌 *Streptomyces griseolus* 由来 CYP105A1 はビタミン D_3(VD_3)の 25 位および 1α 位を水酸化し、活性型 VD_3 である 1α,25-ジヒドロキシビタミン D_3(1α,25(OH)$_2D_3$)を生成する。我々は CYP105A1 の立体構造に基づいた部位特異的変異導入により、野生型 CYP105A1 よりも 400 倍高い活性を有する CYP105A1 二重変異体(R73V/R84A あるいは R73A/R84A)を得た [1)]。この変異体を放線菌 *Streptomyces lividans* に発現させ、VD_3 を基質に 25-ヒドロキシビタミン D_3(25(OH)D_3)および 1α,25(OH)$_2D_3$ の生産に成功している [2)]。しかし、この宿主は培養や形質転換の操作が煩雑で増殖速度が遅いなどの欠点があった。そこで操作が容易で増殖が速く、ナイシン処理により VD_3 の細胞内取り込みが飛躍的に上昇する放線菌 *Rhodococcus erythropolis* を宿主として用いることを試みた。

R73V/R84A、電子伝達系であるフェレドキシンおよびフェレドキシン還元酵素の同時発現プラスミドを *R. erythropolis* に導入し、培養液に基質 VD_3(終濃度 100 μM)、2-ヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリン(終濃度 0.2%)を添加した。経時的に培養液を採取し、代謝物を HPLC 分析した。その結果、経時的に VD_3 が減少し、25(OH)D_3 及び 1α,25(OH)$_2D_3$ の生成がみられた。現在、更なる生産性の向上を目指し、培養条件を検討している。

また R73V/R84A および R73A/R84A は VD_3 に対して 1α 位と 25 位の両方に対して水酸化活性を持つ一方で、ビタミン D_2(VD_2)に対しては 1α 位水酸化活性をほとんど示さなかった。VD_2 から 1α,25-ジヒドロキシビタミン D_2(1α,25(OH)$_2D_2$)を生産する目的で、変異導入により 1α 位水酸化活性を上昇させることを試みた。

R73A/R84A と 25(OH)D_3 及び 25-ヒドロキシビタミン D_2(25(OH)D_2)のドッキングモデルから Met239 が VD_2 と立体障害を起こしている可能性が示された。そこで Met239 を様々なアミノ酸に置換した CYP105A1 三重変異体を作製した。得られた変異体を大腸菌で発現させ、その粗酵素画分を用いて 25(OH)D_2 に対する 1α 位水酸化活性を測定した。その結果、様々な三重変異体の中で Met239 を Ala あるいは Ser に置換したものが 25(OH)D_2 に対して著しく高い 1α 位水酸化活性を示した。最も高い 1α 位水酸化活性を示した三重変異体(R73A/R84A/M239A)を放線菌 *R. erythropolis* に発現させ、その菌体懸濁液に 25(OH)D_2 を添加することで、1α,25(OH)$_2D_2$ 及びその他のビタミン D_2 水酸化体の生産に成功した。

1) Hayashi et al.(2008) *Biochemistry*, 47, 11964-11972
2) Hayashi et al.(2010) *FEBS Journal*, 277, 3999-4009

P450, Vitamin D, *Rhodococcus erythropolis*

講演番号：3C22p07
講演日時、会場：3 月 28 日 15:16～ C 校舎 22 会場

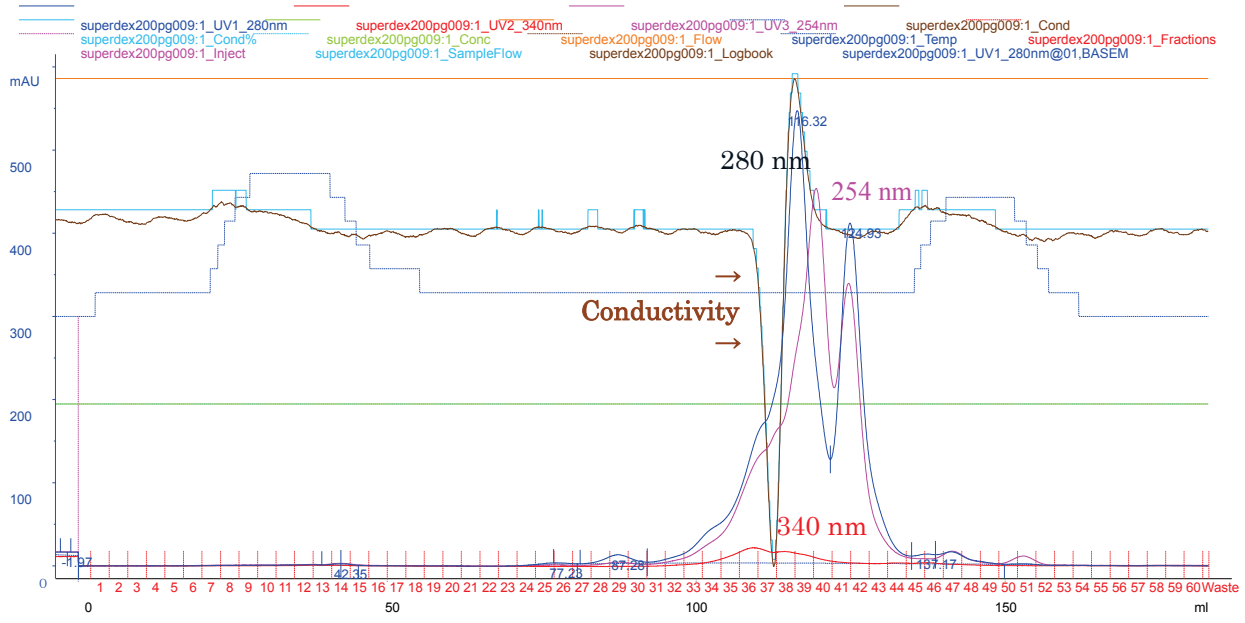
不斉酸化反応を有する植物由来ヘム結合タンパク質の新精製法(SanCat-R)

Purification of a HasA eluted from Encapsulated Pea Plant to an Asymmetric Oxidation Catalysis (SanCat-R)

○永岡 宏行（サンヨー食品開発）
○Hiroyuki NAGAOKA (Sanyo Foods Co., Ltd. R&D)

【目的】 医薬中間体や香料・食品添加物などの合成用酵素として、SanCat-R（不斉酸化触媒）が和光純薬工業(株)より登場している（Code No. 351-34213）。該 SanCat-R 反応素子は、酸素駆動式 HasA と示唆され[1-3]、そのラマン解析や ESR 測定の確認データが期待されている。今回、その測定におけるサンプル調整法、該ヘム結合タンパク質（HBP）精製方法について報告する。

【結果】エンドウ蛋白をアルギン酸Ｃａ$^{2+}$に包括・空気酸化→24ｈ（温水）振とうの懸濁液→遠心分離（8000G×10分）・上清（10mL）・濾過（HiLoad 16/10 Phenyl Sepharose HP）→ゲル濾過分取（ÄKTA explorer10S：105mL～115mL）にて好適に得られる。ゲル濾過分取の条件－カラム：HiLoad 16/600 Superdex 200 pg、－溶離液：50mMトリス塩酸緩衝液（pH8.0）/150mM NaCl、－流速：0.5 mL/min、－該HBPの所在：Conductivity降下部分100mL～120mL付近を回収する（下図参照）。



【参考文献】 (1) H. Nagaoka, K. Udagawa and K. Kirimura, *Biotechnol. Prog.* 2012, **28**, 953. (2) H. Nagaoka, *ACS Catal.* 2014, **4**, 553. (3) H. Nagaoka, *RSC Adv.* 2014, **4**, 16333.

heme-binding protein, hemophore, asymmetric oxidation

講演番号：3C22p08
講演日時、会場：3 月 28 日 15:27～ C 校舎 22 会場

フルクトシルペプチドオキシダーゼによる N^{α}-(1-deoxy-D-fructos-1-yl)-L-valyl-L-histidine 酸化反応の構造基盤

Structural basis for N^{α}-(1-deoxy-D-fructos-1-yl)-L-valyl-L-histidine oxidation of fructosyl peptide oxidase

○一柳 敦[1]、渡辺 文太[2]、五味 恵子[1]、中津 亨[3]、加藤 博章[3] ([1]キッコーマン研究開発本部、[2]京大化研、[3]京大院薬)
○Atsushi ICHIYANAGI[1], Bunta WATANABE[2], Keiko GOMI[1], Toru NAKATSU[3], Hiroaki KATO[3] ([1]R&D Div., Kikkoman Corp., [2]Inst. Chem. Res., Kyoto Univ., [3]Grad. Sch. Pharm. Sci., Kyoto Univ.)

【目的】世界の糖尿病患者数は 2014 年に 3 億 8700 万人に達し、2035 年には 5 億 9200 万人まで増加すると予測されており、それに伴い糖尿病診断の重要性も増している。日本国内では 2010 年に糖尿病診断基準が改定され、血糖値とともにヘモグロビン A1c (HbA1c)値が糖尿病診断用マーカーとして重要視されている。HbA1c はヘモグロビンの β 鎖 N 末端のバリン残基に血中のグルコースが結合し、アマドリ転移して生成する糖化タンパク質であり、血中の総ヘモグロビンに占める HbA1c の割合は過去 1~2 ヶ月の平均血糖値を反映する。我々はこれまでに、HbA1c の β 鎖 N 末端から遊離される N^{α}-(1-deoxy-D-fructos-1-yl)-L-valyl-L-histidine (F-VH)を酸化的に脱糖化する酵素 fructosyl peptide oxidase (FPOX)を発見し、世界初となる酵素による HbA1c 測定法を開発した(1)。本研究では、F-VH に対する触媒効率の高い *Coniochaeta* 属由来 FPOX (FPOX-CET)と F-VH アナログ複合体の結晶構造を決定し、その構造的特徴を明らかにしたので報告する。
【方法】F-VH の第二級アミノ基を硫黄原子に置換した酵素反応阻害剤(F-VH アナログ)を合成し、FPOX-CET との複合体結晶の調製に使用した。複合体結晶は、沈殿剤として NaH_2PO_4、Na_2HPO_4、PEG400 を用いてシッティングドロップ蒸気拡散法により調製した。複合体結晶の回折データは大型放射光施設 SPring-8 を利用して 1.7 Å 分解能まで収集した。以前構造決定した阻害剤非結合型 FPOX の結晶構造を利用した分子置換法により初期位相を決定し、FPOX と F-VH アナログ複合体の分子モデルの構築および精密化を行った。
【結果】FPOX-CET の複合体結晶の空間群は $P4_12_12$ であり、非対称単位中に二つの独立な FPOX-CET 分子が観察された。FPOX-CET の活性部位は FAD、8 本の β-ストランドから成る β-シート、1 本の β-ストランド、2 本の α-ヘリックス、および 4 本のループ(AL1-4)で構成されていた。非対称単位中の両分子では AL1 の異なるコンフォメーションが観測され、F-VH アナログの C 末端カルボキシ基と相互作用するアミノ酸残基が異なっていた(Arg62, Arg64)。R62A, R64A 変異体を作製し、触媒効率を測定したところ、それぞれ野生型の 1.4 倍、0.3 倍の値を示し、Arg64 と F-VH アナログが相互作用するコンフォメーションの方が F-VH 酸化反応にとって有利であることが示唆された。また、FPOX-CET の疎水性ポケットには F-VH アナログのイソプロピル基が、親水性平面にはイミダゾリル基が配置されており、FPOX-CET は、これらの相互作用により F-VH に対して高い触媒活性を示すと考えられた。
(1) Hirokawa, K., *et al.* (2005) *Biotech. Lett.* **27**, 963-968

fructosyl peptide oxidase, crystal structure, diagnosis of diabetes

講演番号：3C22p09
講演日時、会場：3 月 28 日 15:38～ C 校舎 22 会場

マルチ銅オキシダーゼとヨウ化物イオンを用いたフェノール性人工色素の脱色

Decolorization of artificial phenolic dyes by a multicopper oxidase and iodide as a redox mediator

○田口 太郎[1]、土肥 博史[2]、西田 芳弘[2]、吉川 潤[3]、堀口 博文[3]、天知 誠吾[1]([1]千葉大院・園芸、[2]千葉大院・融合、[3]合同酒精(株) 酵医研)
○Taro TAGUCHI[1], Hirofumi Dohi[2], Yoshihiro Nishida[2], Jun Yoshikawa[3], Hirofumi Horiguchi[3], Seigo Amachi[1] ([1]Grad. Sch. Horticul., Chiba Univ., [2]Grad. Sch. Adv. Int. Sci., Chiba Univ., [3]GODO SHUSEI CO., LTD.)

【背景と目的】
工業設備等から排出されるフェノール性色素による土壌・排水の汚染が問題となっており、その対策としてマルチ銅オキシダーゼ（MCO）の一種であるラッカーゼを用いた酸化分解処理が注目されている。当研究室ではこれまで、ヨウ化物イオン酸化能を持つ MCO を生産する細菌 Q-1 株を宮崎県の天然ガスかん水中より単離し、その構造遺伝子の特定に成功している。本研究では、Q-1 株由来 MCO を用いたフェノール性人工色素の脱色、特に酸化還元メディエーターを用いた反応性向上について検討した。さらに、メディエーターによる脱色メカニズムの解明を試みた。
【方法】
Q-1 株を Marine broth で培養し、その上清を粗酵素液とした。フェノール性色素（Remazol brilliant blue R、Orange G、Amido black、Methyl red、Indigo carmine）を粗酵素液、およびメディエーターとしてヨウ化カリウムと共にインキュベートし、吸光度の減少から脱色能を評価した。
【結果】
Q-1 株由来 MCO 単独で脱色能は観察されなかったが、ヨウ化カリウムを添加すると全ての色素に対して高い脱色能が確認された。反応速度論的解析より、ヨウ化カリウム添加条件では、糸状菌（カワラタケ、ヒラタケ）由来ラッカーゼと比べ脱色効率が 6～370 倍高いことがわかった。また、至適 pH は中性付近に存在し、温度や塩化物イオンに対する安定性も糸状菌由来ラッカーゼより高いことがわかった。さらに、脱色反応中のヨウ化物イオンを定量したところ、全ての分子状ヨウ素が再びヨウ化物イオンに還元されることがわかった。このことから、ヨウ化物イオンは色素をヨード化しているのではなく、メディエーターとして機能していることが強く示唆された。ヨウ化物イオンは ABTS や HOBt などの合成メディエーターと比べ環境負荷が低く、安全かつ安価なため、Q-1 株由来 MCO の工業的利用が期待される。現在、核磁気共鳴装置を用いて脱色後の色素の構造決定を試みている。

Laccase, Iodide, Decolorization

講演番号：3C22p10
講演日時、会場：3 月 28 日 15:49～ C 校舎 22 会場

細菌由来マルチ銅オキシダーゼを用いた新規なヨウ素系芽胞殺菌システム

A novel disinfection system of Bacillus spores by a bacterial multicopper oxidase in combination with iodide

○海老原 京太[1]、トリ ユリアナ[1,2]、天知 誠吾[1] ([1]千葉大・園芸、[2]パジャジャラン大)
○Kyota Ebihara[1], Yuliana Tri[1,2], Seigo Amachi[1] ([1]Chiba Univ., [2]Univ. of Padjadjaran)

【背景及び目的】

宮崎県のガスかん水より単離されたヨウ素酸化細菌 Q-1 株が生産する細胞外マルチ銅オキシダーゼ（MCO）は、酸素とヨウ化物イオン存在下で殺菌力の強い分子状ヨウ素（I_2）を効率よく生成する。市販のヨウ素系殺菌剤としてポビドンヨード（PVP-I）がよく知られており、一部の芽胞にも効果があるが、高分子物質や界面活性剤を含む。これに対し、天然の酵素パーオキシダーゼを用いたヨウ素殺菌システムが実用化されているが、毒性のある過酸化水素を用いる欠点がある。MCO は過酸化水素を必要としないため、従来法に比べ安全、簡便、かつ環境負荷の低いヨウ素系殺菌システムの構築が期待できる。そこで本研究では、Q-1 株の MCO を用いた殺菌システムについて、主に細菌芽胞への殺菌力を指標として、PVP-I とその効果を比較した。また殺菌力の本体とされる遊離ヨウ素を定量し、両殺菌システムの効果の違いを明らかにすることを試みた。

【方法】

Q-1 株を Marine Broth 2216 にて 2 日間振盪培養し、培養上清を粗酵素液とした。リン酸バッファー（pH6.5）に KI（20 mM）および MCO（300 mU mL^{-1}）を添加し、30˚C で 24 時間反応させた。ここに *Bacillus subtilis*（Bs と表記）、*Bacillus cereus*（Bc）、または *Geobacillus stearothermophilus*（Gs）の芽胞を 10^8 spores mL^{-1} 程度となるよう添加し、希釈平板法により経時的に芽胞生残数を測定した。PVP-I は 0.01%～1%の範囲で使用した。また、MCO の反応液および PVP-I 溶液中の遊離ヨウ素を、膜透過実験装置 PERMCELL を用いて定量した。

【結果・考察】

Q-1 株の MCO を用いた殺菌システムは、種々の細菌、酵母、糸状菌に対し優れた殺菌力を示した。またその殺菌力は MCO 濃度と KI 濃度に依存した。次に、MCO システムの細菌芽胞に対する効果を PVP-I と比較した。PVP-I は 0.1%の時に最も殺芽胞効果が高く、Bs および Bc 芽胞を 30 分で 90%殺菌した。しかしながら、Gs 芽胞に対しては 60 分で有意な効果は示さなかった。一方、MCO システムは Bs および Bc 芽胞を 10 分で 99.9999%以上殺菌し（次亜塩素酸ナトリウムと同等）、Gs 芽胞も 60 分で 99%殺菌できた。膜透過実験装置を用いた遊離ヨウ素定量の結果、PVP-I では 0.1%の時に最も遊離ヨウ素濃度が高いこと（25 ppm）、さらに MCO システムでは 0.1% PVP-I の 10 倍以上の遊離ヨウ素を含むことが明らかとなった。以上のことから、MCO システムは PVP-I よりも高濃度の遊離ヨウ素濃度を維持し、そのため PVP-I よりも優れた殺芽胞効果を示すことが示唆された。MCO システムでは芽胞殺菌によりヨウ化物イオンに還元されたヨウ素が、MCO により速やかに再酸化され、結果的に高い遊離ヨウ素濃度を維持するものと推察された。

multicopper oxidase, iodine, disinfection

講演番号：3C22p11
講演日時、会場：3 月 28 日 16:10～ C 校舎 22 会場

好熱性水素細菌 *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6 の酸化ストレス防御酵素 Bacterioferritin comigratory protein の反応機構解析
Study on the mechanism of an oxidative-stress defense enzyme, bacterioferritin comigratory protein, of *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6

○加藤 真美[1]、佐藤 由也[2]、新井 博之[1]、石井 正治[1] ([1]東大院・農生科、[2]産総研・環境管理)
○Mami KATO[1], Yuya SATO[2], Hiroyuki ARAI[1], Masaharu ISHII[1] ([1]Univ. Tokyo, [2]AIST EMTech)

好熱性水素細菌 *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6 は還元的 TCA 回路という特徴的な回路で二酸化炭素を固定している。この回路は TCA 回路を逆回しにした回路であり、酸化ストレスに弱いことが知られている。そのため、還元的 TCA 回路を持つ生物のほとんどが嫌気性あるいは微好気性であるが、本菌は高い酸素濃度条件下でも生育することが可能である。本研究室ではこの事実に着目し、本菌の酸化ストレス防御機構について研究を進め、これまでに好気生育に必須な新規酵素 Fpx (Ferriperoxin)を発見している。

本菌ゲノムからは Fpx の他に数種類の酸化ストレス防御酵素遺伝子が見出されているが、本研究ではそれらのうち過酸化物解毒酵素の一種である Bacterioferritin comigratory protein (BCP)に着目した。BCP には 1～3 つの Cys が保持されていることが一般的だが、本菌由来 BCP は 4 つの Cys (Cys12, 26, 48, 53) を有しており、新たな反応機構を持つことが期待された。これまでの当研究室の研究により、本菌 BCP において Cys48 が活性に必須であり、その他の Cys 残基は活性に必須ではないことを示してきた。加えて、Cys12 と Cys26 間、Cys48 と Cys53 間で S-S 結合が形成されることを明らかにした。一方、Cys53 変異体においては、Cys48 同士による S-S 結合形成により二量体が形成されていることが分かった。しかし、高濃度の H_2O_2 処理後では二量体形成は起こらなかった。

本研究では、本菌 BCP の生理学的機能をさらに解明することを目的とした。精製された BCP (WT, Cys53 変異体)を用い、dithiothreitol を電子供与体として過酸化物の還元活性を測定した。WT においては Km = 240 μM、 Vmax = 520 nmol/min/mg-protein であり、Cys53 変異体においては Km = 270 μM、Vmax = 1720 nmol/min/mg-protein となった。なお、発表においては分子モデリング等に基づいた討論を予定している。

さらに、WT と Cys53 変異体を 5mM の H_2O_2 あるいは t-butyl hydroperoxide で処理した後、過酸化物の還元活性を測定した。その結果、BCP は不可逆的に活性を失うことが明らかとなった。高濃度の過酸化物存在下では Cys 残基の過酸化により S-OOH や S-OOOH が形成され、BCP は活性を失ったことが示唆された。

oxidative stress, peroxidase, bacterioferritin comigratory protein

講演番号：3C22p12
講演日時、会場：3 月 28 日 16:21～ C 校舎 22 会場

好気性光合成細菌 Roseobacter denitrificans OCh114 の持つ alternative oxidase の酵素学的解析

Enzymatic analysis of an alternative oxidase from an aerobic photosynthetic bacterium Roseobacter denitrificans OCh114

○江草 啓晶、石井 正治、新井 博之（東大院農生科・応生工）
○Hiroaki Egusa, Masaharu Ishii, Hiroyuki Arai (Univ. of Tokyo)

Alternative oxidase(AOX)は、植物のミトコンドリアで発見された好気呼吸鎖末端酸化酵素の一つであり、キノールから直接電子を受け取るキノールオキシダーゼとしてシアン耐性呼吸や熱産生に関わることが知られている。また、AOX は酸素還元に共役したプロトン排出能をもたないため、ATP 産生に寄与せず、キノンプールからの電子を積極的に酸素に捨てているという特徴を持つ。そのため、AOX はエネルギー産生よりもむしろ膜内の過還元状態を解消し、細胞内の酸化還元バランスを保つことで、活性酸素種の発生を防ぐ役割があると考えられている。実際に植物では低温や強光などの酸化ストレス条件下で重要な働きを持つことがわかっている。近年の環境微生物を対象にしたメタゲノム解析の結果、植物の *aox* 遺伝子と相同な遺伝子がバクテリア、特に海洋性細菌のゲノム中に広く存在することが明らかとなっている。AOX に関する研究は植物や原生生物では多くなされているが、細菌の AOX についての研究は現在までほとんど行われておらず、その機能については未知の部分が多い。

Roseobacter denitrificans OCh114 は、α-プロテオバクテリアに属する海洋性の好気性光合成細菌の一種であり、ゲノム中に AOX をコードする遺伝子 *aox* を持つ。好気性光合成細菌は海洋に広く分布しており、海域によっては優占種の一つであると考えられている。環境優占化のために、好気性光合成細菌は様々な環境ストレスに適応した生体機構を持つと考えられる。我々は、*R. denitrificans* の *aox* 欠損株では低温での生育が抑制されることを報告しており、AOX が低温環境下でのストレス耐性に関わることが予想される。本発表では、*R. denitrificans* における AOX の酵素学的解析に関する研究成果を紹介する。

R. denitrificans の *aox* 遺伝子をクローニングし、大腸菌を宿主として異種発現株を構築した。大量培養、酵素精製により精製酵素を獲得し、AOX のユビキノール酸化活性、至適反応温度及び分子量の測定を行った。また、緑膿菌の末端酸化酵素欠損株に *aox* 遺伝子を相補した株を用いることで酸素親和性の測定を行った。これらの結果から、*R. denitrificans* の AOX は低温においてもキノール酸化活性をもち、好気呼吸を担い得ることが明らかとなった。また、AOX は酸素に対する親和性が非常に高く、酸化ストレス防御に働くと考えられた。

quinol oxidase, photosynthetic bacteria, respiration

講演番号：3C22p13
講演日時、会場：3 月 28 日 16:32～ C 校舎 22 会場

Differential activity of rice thiol-disulfide oxidoreductases for disulfide bond formation and reduction

○Yayoi ONDA, Kumiko AIHARA, Yohei KOBORI (Yamagata Univ.)

Disulfide bonds, which impart thermodynamic stability to proteins, permit redox control of protein packaging. Protein disulfide isomerases (PDIs), a family of thiol-disulfide oxidoreductases that are ubiquitous in all eukaryotes, are the principal catalysts for disulfide bond formation. The genome of rice (*Oryza sativa*) encodes seven members of the PDI family, which contain two redox-active thioredoxin-fold domains (each possesses a pair of Cys residues) and at least one redox-inactive domain and show a variation in domain organization. Here we investigated three rice PDI family members, PDIL1;1, PDIL1;4, and PDIL2;3, and found that PDIL1;1 exhibited the highest catalytic activity for both disulfide bond formation and disulfide bond reduction. The activity of PDIL1;1-catalyzed disulfide bond reduction, in which two redox-active Cys residues were involved, was enhanced by increasing the glutathione concentration. These results suggest that PDIL1;1 plays primary roles in both disulfide bond formation and disulfide bond reduction, which allow for redox control of protein quality and packaging. We discuss specific but coordinated functions of PDIs in the formation of native disulfide bonds and the development of protein storage organelles in the endosperm cells.

Disulfide bond, Thiol-disulfide oxidoreductase, Rice

講演番号：3C22p14
講演日時、会場：3 月 28 日 16:43～ C 校舎 22 会場

深海微生物 Shewanella violacea DSS12 における D-アミノ酸脱水素酵素の mRNA 発現量と圧力耐性

The expression of mRNA and pressure-resistant of D-amino acid dehydrogenase in the deep-sea bacterium Shewanella violacea DSS12

○鈴本 浩一朗[1]、渡邉 翔太[1]、谷川 実[1]、西村 克史[1]、為我井 秀行[1]、加藤 千明[2] ([1]日本大学、[2]海洋研究開発機構)
○Koichiro SUZUMOTO[1], Shota WATANABE[1], Minoru TANIGAWA[1], Katsushi NISHIMURA[1], Hideyuki TAMEGAI[1], Chiaki KATO[2] ([1]Nihon Univ., [2]JAMSTEC)

D-アミノ酸脱水素酵素 (DAD) は, D-アミノ酸の酸化的脱アミノ反応を触媒する膜結合型酵素である。DAD が D-アミノ酸から引き抜いた電子は, 電子伝達系に伝達され, ATP 合成に関与することがわかっている。本研究で扱う *Shewanella violacea* DSS12 (*S. violacea*) は深海に生息する好冷好圧性細菌であり, そのゲノム上には DAD をコードすると推定される遺伝子が存在する。しかし, *S. violacea* においては,「どの生育時期に DAD の発現が盛んであるか」,「何のために D-アミノ酸を代謝するのか」など, DAD の生理的役割は未知のままである。本研究では, *S. violacea* の DAD の生理的役割を解明することを目的として, DAD の mRNA 発現量や DAD 活性を測定した。

S. violacea を大気圧下で好気条件 (振とう) および, 微好気条件 (静置) で培養し, 生育環境の違いにより DAD 発現に差が見られるのかどうかを調べた。好気条件では 20, 30, 40, 50, 60 時間, 微好気条件では 30, 40, 50, 60, 70 時間培養し, 生育における DAD 発現の経時的変化を調べた。

リアルタイム PCR によって DAD の mRNA の発現量を測定した結果, 好気条件では対数増殖前期に mRNA の発現量が最大となり, 微好気条件では対数増殖中期に最大となった。好気条件における mRNA の最大発現量は, 微好気条件における発現量の約 10 倍であった。次に, *S. violacea* の無細胞抽出液中の DAD 活性を測定したところ, 好気および微好気条件において, D-Pro および D-Ser に対する DAD 活性が検出され, どちらの場合も D-Pro に対する活性が D-Ser に対する活性より高いことがわかった。好気条件では D-Pro に対する活性は D-Ser に対する活性の約 10 倍であった。加圧条件下において DAD の活性を測定した結果, 50 MPa の圧力下では大気圧下の約 50%の活性を維持していた。同条件で測定した好冷性細菌 *Shewanella livingstonensis* の DAD は, 50 MPa の圧力下では活性が完全に失われた。この結果から, *S. violacea* の DAD は圧力耐性を持っていることがわかった。

先行研究によって, *S. violacea* の生育は D-Ser により阻害されることや, D-Pro を基質として用いた場合に DAD が電子伝達系に関与することがわかっている。従って, *S. violacea* において, DAD の発現量が対数増殖前期～中期に多くなるのは, 生育に有害な D-Ser を代謝して無害なものに変換したり, D-Pro を分解し, 増殖に必要なエネルギーを生産するためであると考えられた。

Shewanella violacea DSS12, D-amino acid dehydrogenase, electron transfer system

講演番号：3C22p15
講演日時、会場：3 月 28 日 16:54～ C 校舎 22 会場

深海性 *Shewanella* 属細菌由来シトクロム *c* の圧力適応機構

Pressure adaptation mechanism of cytochrome *c* from deep-sea *Shewanella*

○政成 美沙[1]、西山 雅祥[2]、三本木 至宏[1] ([1]広島大生物圏、[2]京都大白眉)
○Misa MASANARI[1], Masayoshi NISHIYAMA[2], Yoshihiro SAMBONGI[1] ([1]Hiroshima Univ., [2]Kyoto Univ.)

【背景・目的】

Shewanella 属細菌は海洋環境に生息し，浅瀬から深海まで広く分布している。深海は高圧力環境であるため，通常の生物の蛋白質は圧力による影響を受ける。本研究では，深海由来の *S. benthica*, *S. violacea* と浅瀬由来の *S. livingstonensis*, *S. amazonensis* の相同シトクロム *c* (以下それぞれ SB, SV, SL, SA)を比較することで，深海微生物の蛋白質の圧力適応機構をアミノ酸レベルで解明することを目的としている。

【方法・結果】

4 種の *Shewanella* 属細菌由来シトクロム *c* をクローニングし，大腸菌にて異種発現した。得られたシトクロム *c* について，Differential scanning calorimetry (DSC)を使用して熱安定性を，分光光度計を用いて変性剤(GdnHCl)耐性を測定した。その結果，深海由来の SB および SV は，浅瀬由来の SA や SL に比べて，熱安定性および変性剤耐性が高かった。*Shewanella* 属細菌のシトクロム *c* のアミノ酸配列に基づいた系統樹を作成すると，深海由来のものと浅瀬由来のもので大きく 2 つのグループに分かれた。配列を比較すると，深海由来と浅瀬由来で異なる特徴をもつアミノ酸をいくつか見出した。それらのうち，50 番目のアミノ酸 (深海由来は Lys，浅瀬由来は Leu)については，SV と SL で相互に入れ替えた変異体 (SV-K50L, SL-L50K)を作成し，熱安定性を測定した。その結果，SV-K50L は野生体よりも下がったが，SL-L50K は野生体と同じ値を示した。また，圧力耐性を測定するために，変性剤耐性の測定を 0.1～150 MPa の加圧下で行った。その結果，深海，浅瀬由来ともに加圧によって変性剤耐性は低下した。

【考察・展望】

一般的に，生物の生育温度と蛋白質の安定性が正の相関を示すことは知られている。しかし，深海由来の SB や SV はこの相関から外れ，高い安定性を示した。その代わりに，本研究では新たに，生物の生育圧力と蛋白質の安定性の相関性を見出した。深海由来シトクロム *c* の高圧力への適応が，結果として熱安定性の向上にもつながったと考えられる。50 番目のアミノ酸への変異導入では，浅瀬由来シトクロム *c* の安定化には繋がらなかったが，コンピュータ上の構造シミュレーションから，変異導入によって 51 番目のアミノ酸との立体障害が起きている可能性を見出した。今後は 51 番目のアミノ酸との二重変異株や，他の特徴的なアミノ酸について変異導入を行い、並行して結晶構造解析も行う予定である。

Shewanella, pressure adaptation, cytochrome *c*

講演番号：3C22p16
講演日時、会場：3 月 28 日 17:15～ C 校舎 22 会場

軸配位子置換を用いた酵素-電極反応における酵素内電子伝達経路解明へのアプローチ

Analysis of Electron Transfer Pathway in Enzyme-electrode Reaction

○日比野 佑哉、河井 翔太、杉本 悠、北隅 優希、白井 理、加納 健司（京大院農）
○Yuya Hibino, Shota Kawai, Yu Sugimoto, Yuki Kitazumi, Osamu Shirai, Kenji Kano (Kyoto Univ.)

【目的】

酸化還元酵素反応と電極反応を共役させたバイオエレクトロカタリシスは, 様々な生物電気化学デバイスに利用できる．とりわけ電極を一方の基質とみなした直接電子移動(DET)型反応は，最もシンプルなバイオエレクトロカタリシス系として, 次世代バイオデバイス構築という応用研究も含め，世界的に注目されている．しかし，DET 型反応の詳細なメカニズムは不明である．

酢酸菌由来の膜結合型酵素である FDH は, DET 型反応を行い, その触媒電流密度が非常に高い．FDH は触媒活性中心である FAD に加え 3 つのヘム C を有している．先行研究により， ヘム C サブユニット部分で電極と直接電子移動すること, また 3 つのヘム C の酸化還元電位を基礎にした電流－電圧曲線の解析から，DET 型触媒反応サイクル過程では，3 つのうち 1 つのヘム C が DET 型反応に関与しないと結論した(1)．しかし，電子移動経路の詳細は未だ不明のままである．そこで, 本研究では, フルクトース脱水素酵素(FDH)をモデルとした DET 型反応のメカニズムの解明を最終目標として，タンパク質工学的にヘムの軸配位子を変異させることにより，電子移動特性がどのような影響をうけるか観察することを目的とした．ここではまず，FDH の 3 つのヘム C のうち最表面に位置すると推測されるヘム C の第六軸配位子である Met を置換した変異体の発現と特性評価を行った．

【結果・考察】

構築済みの FDH 発現用プラスミドを改変し, FDH の 3 つのヘム C のうち最も N 末端側に位置するヘム C の第六軸配位子である Met301 を Ala に置換した変異体 M301A を構築した. *Gluconobacter suboxydans* で発現し，カラムクロマグラフィーにより精製した．M301 のフルクトース酸化活性の pH 依存性， 比活性，安定性において，FDH との顕著な差異はみられなかった．DET 型バイオエレクトロカタリシス活性もあり，その電流－電圧曲線特性も，FDH とほぼ同じようであった．こうした実験結果は，今回変異を施した 3 つのヘム C のうち最表面に位置すると推測されるヘム C は DET 型触媒反応に関与していない可能性が示唆され，先の提案を裏付けるものである．今後は置換するアミノ酸や対象とするヘム C を変更した変異体を構築し, その特性を評価する予定である．

(1)S. Kawai, et al. *Electrochem. Commun.*, 2014, **38**, 28.

fructose dehydrogenase, direct electron transfer, hemeC

講演番号：3C22p17
講演日時、会場：3 月 28 日 17:26～ C 校舎 22 会場

サブユニットの分離と復元からみるフルクトース脱水素酵素の直接電子移動反応機構

The Analysis of Electrochemical Characterization on Reconstruction of the Subunits in Heterotrimeric Fructose Dehydrogenase

○河井 翔太、北隅 優希、白井 理、加納 健司（京大院農）
○Shota KAWAI, Yuki KITAZUMI, Osamu SHIRAI, Kenji KANO (Kyoto Univ.)

【緒言】

酸化還元酵素が電極と直接電子の授受を行う反応を直接電子移動（DET）型酵素電極反応と呼ぶ。バイオ電池やバイオセンサといったデバイスへの展開が期待される、一方、DET 型酵素の報告例は少なく、その反応性も決して高くない。更なる精良なバイオデバイス開発のためには、DET 反応性の改善や新規有用酵素の探索が必須である。

Gluconobacter sp. 由来のフルクトース脱水素酵素（FDH）はコファクターとして FAD と 3 つのヘム C を有し、その DET 活性は極めて高い。こうした背景のもと、我々はタンパク質工学と電気化学の手法を主体に、本酵素の DET 反応機構の解明を目的として検討してきた。本発表では種々の FDH 変異体とその電極応答性の変化を基に DET 反応における FDH 内のコファクターの機能について考察することを目的とした。

【実験方法】

ヘテロトリマー構造（FdhS、FdhC、FdhL）からなる FDH を、FdhSL 複合体および FdhC に分離するため、遺伝子工学的手法によりそれぞれの発現系の構築並びに精製を行った。FdhSL 及び FdhC の濃度はそれぞれが有する FAD 及びヘム C の吸光係数から算出した。電気化学測定は McIlvaine 緩衝液中にて行った。

【結果と考察】

FdhSL 複合体はフルクトース触媒活性を有していたが DET 反応能力を消失していた。一方、FdhSL 複合体に対し FdhC を *in vitro* で混合することで、明瞭なフルクトース酸化由来の触媒型 DET 反応を確認した。しかしながら、FdhC のみで電極応答を確認したところ、シグナルを観測できなかった。

ゲル濾過カラムクロマトグラフィーにより、FdhC のサイズは 200 kDa 以上と算出した。アミノ酸配列から推定される分子質量は約 50 kDa であり、FdhC は 4 量体以上で存在していると判断した。一方、同様の方法により、FDH は 2 量体で存在していることが判明した。以上の結果より、FDH の DET 反応部位は FdhC のヘム C であるが、FdhC のみの場合は過度の凝集によって反応が妨害される可能性が示唆された。

本発表ではその他に得た知見を基に FDH の DET 反応電子伝達経路モデルについて報告する。

Fructose dehydrogenase, Direct electron transfer, Heme C

講演番号：3C22p18
講演日時、会場：3 月 28 日 17:37～ C 校舎 22 会場

FAD 依存性グルコースデヒドロゲナーゼのメディエータに関する検討

Redox mediators for FAD-dependent glucose dehydrogenase

○辻村 清也、村田 一樹、定兼 拓也、鶴岡 望（筑波大数理）
○Seiya Tsujimura, Kazuki Murata, Takuya Sadakane, Nozomu Tsuruoka (Univ. of Tsukuba)

FAD を補酵素とするグルコースデヒドロゲナーゼ（FAD-GDH）は，酸素を電子受容体とせず，グルコースに対する選択性が高く，電気化学式自己血糖計測分野において大変注目を集めている．本酵素は電極に直接電子を受け渡すことができずメディエータを必要とし，これまでヘキサシアノ鉄酸イオンを電子伝達メディエータに用いてきた（*Biosci., Biotech., Biochem.*, 70, 654 (2006)）．本報告では，*Aspergillus terreus* 由来 FAD-GDH（池田糖化）のメディエータの探索を行った結果について報告する．各種電子伝達メディエータと酵素を中性の緩衝液中に溶解し，電気化学測定を行うことで，酵素―電極間電子移動を評価した．

まず，ヘキサシアノ鉄酸イオンとの反応速度が遅い理由について，静電的相互作用（斥力）が働いていることが考えられる．各種イオンを比較的高い濃度となるように加え，イオン強度を上げることで，酵素との反応性を向上させることができた．一方，比較的負電位を有する 9,10-フェナントレンキノンやナフトキノンなどのキノン類は良好なメディエータとして機能することがわかった．酵素としてグルコースオキシダーゼを用いた場合に比べて，数桁高い反応速度定数を示した．炭素電極上に吸着したメディエータ分子も機能することがわかった．

オスミウム錯体は正電荷を有し，酵素と大変よい反応性を示した．特に，ポリマーに連結したオスミウム錯体（例えば，poly(1-vinyl imidazole)に $Os(bipyridine)_2Cl$ が配位したポリマー）をメディエータとして用いる場合，酵素分子表面の糖鎖を除去することで電流値の大幅な向上が確認された．オスミウム錯体の酵素活性中心へのアクセスのしやすさの向上あるいは酵素固定化膜の構造の変化が理由として挙げられる．また，メチレングリーンやトルイジンブルーなどのアジン色素もメディエータとして機能した．さらに，こうした分子を電解重合することで得られた高分子も，メディエータとして機能することがわかった．

これまで一般的に用いられてきたグルコースオキシダーゼと比較して高い触媒活性を示すことが分かり，さらに，酵素と高分子状のメディエータを電極上に固定化することができ，バイオ燃料電池や連続血糖計測システムへの応用が期待される．

Glucose dehydrogenase, electrode, mediator

講演番号：3C22p19
講演日時、会場：3 月 28 日 17:48～ C 校舎 22 会場

FAD 定量バイオセンサ用素子としての色素依存性 D-乳酸脱水素酵素の機能評価

Functional analysis of a dye-linked D-lactate dehydrogenase as an element for FAD-biosensor

○前田 英利[1]、里村 武範[1,2]、櫻庭 春彦[3]、大島 敏久[4]、末 信一朗[1,2,5] ([1]福井大院工・生物応用化、[2]福井大・生命セ、[3]香川大農、[4]大阪工大、[5]福井大院工・繊維)
○Hidetoshi MAEDA[1], Takenori SATOMURA[1,2], Haruhiko SAKURABA[3], Toshihisa OHSHIMA[4], Shin-ichiro SUYE[1,2,5] ([1]Dept. Appl. Chem. Biotechnol., Grad. Sch. Eng., Univ. Fukui, [2]Res. Edu. Prog. Life Sci., Univ. Fukui, [3]Kagawa Univ., [4]Osaka Inst. Tech., [5]Dept. Front. Fib., Grad. Sch. Eng., Univ. Fukui)

[背景・目的]

近年、脂肪細胞のエネルギー代謝関連遺伝子の制御に細胞内のフラビンアデニンジヌクレオチド(FAD) が関与していることが報告されている [1)]。このことから、FAD が細胞内のエネルギー状態を判定するバイオマーカーになる可能性が示唆されている。現在、一般的に用いられている HPLC による FAD 定量法では、装置自体が高価かつ大型であり、操作が煩雑かつ長時間の測定が必要である。一方、酵素を測定用素子としたバイオセンサは装置の小型化が可能であり、迅速な測定が可能である。しかしながら、FAD 定量用バイオセンサ素子として利用可能な FAD 依存性脱水素酵素のほとんどは FAD と酵素が強固に結合しているため直接、FAD 定量用バイオセンサ素子として利用するのは困難である。FAD をバイオセンサ用素子として利用するには、FAD を酵素から酸処理や熱処理を行わなければならず、FAD 検出のためのバイオセンサへの応用は進んでいない。我々は、超好熱菌より FAD と酵素の結合が非常に弱い FAD 依存性の色素依存性 D-乳酸脱水素酵素(DLDH)を見出した。本研究では、この超好熱菌由来 DLDH に着目し、FAD 定量用バイオセンサ用素子としての評価を行った。

[方法・結果]

我々が見出した *Aeropyrum pernix* および *Thermoproteus tenax* 由来 DLDH の大腸菌を宿主とした発現および精製を行った。精製した酵素について FAD に対するミカエリス定数(Km 値)の測定を行った。その結果、*A. pernix* 由来の DLDH の FAD に対する Km 値は 1.5 mM, *T. tenax* 由来 DLDH の FAD に対する Km 値は 9.7×10^{-4} mMであった。この結果より、センサ用素子としては *T. tenax* 由来 DLDH が有用であることが判明した。また、FAD 以外のフラビン類に対する特異性を検討した結果、FAD に対して特異的であることが明らかとなり、FAD 定量用素子として利用できることが明らかとなった。

1) S. Hino *et al.*, *Nature Communications*, **3**:758 (2012)

FAD sensor, dye-linked D-lactate dehydrogenase, hyperthermophile

講演番号：3C22p20
講演日時、会場：3 月 28 日 17:59～ C 校舎 22 会場

超好熱菌 *Pyrobaculum calidifontis* 由来 Coenzyme A disulfide reductase の機能解析
Characterization of a Coenzyme A disulfide reductase from hyperthermophilic archaeaon, *Pyrobaculum calidifontis*
○里村 武範[1]、田邊 瑞季[1]、櫻庭 春彦[2]、大島 敏久[3]、末 信一朗[1] ([1]福井大院工、[2]香川大農、[3]大阪工大工)
○Takenori SATOMURA[1], MIZUKI TANABE[1], Haruhiko SAKURABA[2], Toshihisa OHSHIMA[3], Shin-ichiro SUYE[1] ([1]Univ. Fukui, [2]Kagawa Univ., [3]Osaka Inst. Tech.)

[目的]
我々は好気性超好熱アーキア *Pyrobaculum calidifontis* のゲノム配列から新規酸化還元酵素の探索を進めてきた。その結果、NADH オキシターゼをコードしていると予測される Pcal_1700 遺伝子を見出した。この遺伝子について大腸菌によるタンパク質発現系を構築し、組換えタンパク質の機能解析を行ったところ、NADH オキシターゼ活性を検出することに成功した。さらに本酵素の詳細に解析を進めたところ、本酵素は NADH 依存性の Coenzyme A disulfide reductase（CoADR）活性も有していることが明らかとなった。
Coenzyme A disulfide reductase（CoADR）は NAD(P)H を電子供与体として酸化型 Coenzyme A（CoA-S-S-CoA）の還元反応を触媒する酵素である。還元型 Coenzyme A（CoA-SH）は超好熱菌体内の還元状態を維持するのに重要な役割を果たしていると考えられている。本研究では *P. cakidifontis* から見いだされた Pcal_1700 遺伝子発現産物のより詳細な機能解析を行った。

[方法・結果]
Pcal_1700 を大腸菌により発現し、80℃、10 分間の熱処理、Q-セファロースカラムクロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィーの 3 段階の精製法によって電気泳動的に均一に精製した。精製タンパク質について酵素化学的な性質の解析を行ったところ、本酵素は人工酸化還元色素である 2,6-ジクロロインドフェノールも電子受容体とすることが可能であることが判明し、NADH オキシターゼ活性、CoADR 活性だけではなく、色素依存性 NADH 脱水素酵素も有していることが明らかとなった。また、本酵素の電子受容体特異性を詳細に検討したところ、CoA-S-S-CoA に対して最も高い反応性を示した。このことから、生体内では本酵素は NADH オキシターゼとしてではなく CoADR として機能していることが示唆された。また、本酵素はオキシターゼ活性において 50℃、30 分間の処理において pH4.0 から 11 の範囲で失活せず、高い安定性を示した。さらに、本酵素をコードする遺伝子の周辺の遺伝子を解析したところ、チオレドキシン、グルタレドキシン様タンパク質をコードする遺伝子が存在しており、これら遺伝子は CoADR をコードする Pcal_1700 遺伝子とクラスターを形成していた。これらの結果から、この CoADR を含む遺伝子クラスターは細胞内の酸化還元に深く関与していることが示唆された。

Coenzyme A disulfide reductase, hyperthermophile

講演番号：3E32a01
講演日時、会場：3 月 28 日 09:00～ E 校舎 32 会場

Paenibacillus polymxya 由来β-アミラーゼとマルトースおよびマルトペンタオースとの複合体の X 線結晶構造解析

Crystal structure of *Paenibacillus polymxya* beta-amylase complexed with maltose and maltopentaose

○肥垣津 雄日[1]、多田 俊治[2]、炭谷 順一[1]、川口 剛司[1]、乾 隆[1]、西村 重徳[1]([1]阪府大院・生環科、[2]阪府大院・理)

○ Yuhi Koegaitsu[1], Toshiji Tada[2], Junichi Sumitani[1], Takashi Kawaguchi[1], Takashi Inui[1], Shigenori Nishimura[1] ([1]Grad. sch Life & Envi. Sci., Osaka Pref. Univ., [2]Grad. sch Bio. Sci., Osaka Pref. Univ.)

【背景および目的】*Paenibacillus polymyxa* 由来β-アミラーゼ（PPB）は触媒ドメイン（PPB-CD）と２つのデンプン結合ドメインがタンデムに連結した構造を持ち，マルトオリゴ糖などの可溶性基質のみならず，生デンプンなどの固体基質も加水分解することができる。PPB の可溶性基質に対する反応速度パラメーターは，同じ *Bacillus* 科に分類され 54%の相同性を有する *Bacillus cereus* 由来β-アミラーゼ（BCB）と比較すると，約 10 分の 1 の K_m，および k_0 値を示し，この値はむしろ，35%の相同性を有する植物由来β-アミラーゼに近い値である。このような可溶性基質に対する活性の違いを立体構造的に説明するために，PPB-CD の反応座標に沿った様々な状態での三次元構造を解析している。さらに，他のβ-アミラーゼと比較することによって，β-アミラーゼの触媒反応機構のさらなる解明が期待される。

我々は，すでに PPB-CD のアポ体の立体構造をＸ線結晶構造解析によって明らかにしている（PDB ID：3VOC)。本発表では，PPB-CD と生成物であるマルトースとの複合体の立体構造，および PPB-CD の触媒残基 Glu359 を Ala に置換した変異体 E359A と基質であるマルトペンタオースとの複合体の立体構造について報告する。

【方法および結果】実験には，大腸菌発現系において発現，精製した酵素を用いた。PPB-CD と E359A をそれぞれ 10 mM マルトース，および 10 mM マルトペンタオース共存下で結晶化し，SPring-8 BL38B1 でＸ線回折データの収集を行った。構造の精密化は分解能 1.45～1.6 Å までのデータを用い，CCP4i によって行った。

PPB-CD とマルトースとの複合体では，マルトース分子はサブサイト-2 と-1 のみに結合していた。他のβ-アミラーゼと同様に，マルトースの結合にともないフレキシブルループ（Gly85～Asp89）はオープン型からクローズ型に変化していた。

E359A とマルトペンタオースとの複合体では，マルトペンタオースがサブサイト-2～+3 に加水分解されずに結合していたことから，この複合体は反応座標における ES 複合体に相当すると考えられる。各サブサイトに結合したグルコース残基は，どれも安定な Ｃ１イス型構造をとっており，サブサイト-1 と+1 の間でグルコシド結合が大きくねじれていた。

講演では酵素と基質との相互作用について，他起源のβ-アミラーゼとの比較も含めて考察する。

β-amylase, X-ray crystal analysis, enzyme mechanism

講演番号：3E32a02
講演日時、会場：3 月 28 日 09:11～ E 校舎 32 会場

Microbacterium saccharophilum K-1 由来β-フルクトフラノシダーゼと生成物の立体構造解析
Crystal structure of ß-fructofuranosidase from *Microbacterium saccharophilum* K-1 complexed with products

○佐藤 祥名[1]、宮崎 剛亜[1]、大田 ゆかり[2]、嶋根 康弘[2]、臼井 けい子[2]、秦田 勇二[2]、藤田 孝輝[3]、伊藤 哲也[3]、西河 淳[1]、殿塚 隆史[1] ([1]東京農工大・院農、[2]海洋研究開発機構、[3]塩水港精糖株式会社)
○Shona SATO[1], Takatsugu Miyazaki[1], Yukari Ohta[2], Yasuhiro Shimane[2], Keiko Usui[2], Yuji Hatada[2], Koki Fujita[3], Tetsuya Ito[3], Atsushi Nishikawa[1], Takashi Tonozuka[1] ([1]Tokyo Univ. of Agriculture and Technology, [2]JAMSTEC, [3]Ensuiko Sugar Refining Co., Ltd.)

【緒言】*Microbacterium saccharophilum* K-1 由来 β-フルクトフラノシダーゼ（以下 *Ms*FFase）は、Glycoside hydrolase family 68 に属する酵素で、スクロースのみが基質の場合は主に加水分解反応を進行させるが、スクロースとラクトースの混合物に対しては、機能性オリゴ糖として知られるラクトスクロース（Gal-β(1→4)-Glc-α(1↔2)β-Fru）を生成させる酵素である。ラクトースは、本来の基質ではないと考えられるため、*Ms*FFase がどうしてラクトスクロースを生成させるのか興味が持たれる。本研究では、ラクトスクロースとの複合体、および、マイナーな生成物として得られる 1-ケストース（Glc-α(1↔2)β-Fru-(1←2)β-Fru）との複合体の立体構造解析を行った。

【方法】*Ms*FFase の触媒残基の一つである Glu374 を Ala に置換した変異酵素を構築し、pET28 ベクターに組み込んだ発現ベクターにより大腸菌で生産させた。Ni-NTA カラムによるアフィニティークロマトグラフィーで精製し、結晶化した。結晶にラクトスクロースおよび 1-ケストースをソーキングさせ、X 線回折データを収集し立体構造を決定した。

【結果】ラクトスクロースとの複合体について 1.9Å分解能で、1-ケストースとの複合体について 1.6Å分解能で、それぞれ立体構造を決定した。*Ms*FFase は、β-プロペラフォールドおよびα-ヘリックスから成る小ドメインから構成されており、ラクトスクロースおよび 1-ケストースとも、β-プロペラの中心に存在する活性中心に結合していた。両構造を比較したところ、ラクトスクロースおよび 1-ケストースとの複合体ともに、サブサイト-1 および+1 に結合する糖の残基は似たような位置に存在していたが、サブサイト+2 に結合する糖の残基である、ラクトスクロースのガラクトース残基および 1-ケストースのグルコース残基については、立体構造の異なる位置に存在していた。

ラクトスクロースのガラクトース残基については、水酸基はどのアミノ酸残基に対しても直接水素結合しておらず、全て水分子を介して水素結合していることが分かった。このことから、ラクトスクロースのガラクトース残基の酵素に対する結合は特異的なものではなく、水分子を含めた構造がたまたまガラクトース残基を結合できるような構造となっているものと考えられた。

β-fructofuranosidase, lactosucrose, GH68

講演番号：3E32a03
講演日時、会場：3 月 28 日 09:22～ E 校舎 32 会場

Pedobacter saltans 由来 GH31 α-ガラクトシダーゼとリガンドとの複合体構造解析
Crystal structures of GH31 α-galactosidase from *Pedobacter saltans* complexed with ligands
○宮崎 剛亜、石嵜 雄一、西河 淳、殿塚 隆史（東京農工大・院農）
○Takatsugu MIYAZAKI, Yuichi ISHIZAKI, Atsushi NISHIKAWA, Takashi TONOZUKA (Tokyo Univ. of Agriculture and Technology)

【背景と目的】Glycoside hydrolase family 31（GH31）には α-グルコシドあるいは α-キシロシドに作用する酵素が分類されているが、多くの機能未知タンパク質も存在する。我々は以前、真正細菌 *Pedobacter saltans* 由来 タンパク質 Pedsa3617 が *p*-nitrophenyl α-glucopyranoside および *p*-nitrophenyl α-xylopyranoside にほとんど作用せず、α-galactopyranosyl fluoride および *p*-nitrophenyl α-galactopyranoside（pNPGal）を加水分解する α-ガラクトシダーゼであることを見出した。本酵素は pNPGal のほかメリビオース（Gal-α(1→6)-Glc）をごくわずかに加水分解するが、α-1,3-ガラクトシドやα-1,4-ガラクトシドに対してはほとんど活性を示さず、既知のα-ガラクトシダーゼとも異なる基質特異性を有している。本研究では、Pedsa3617 の構造–基質特異性相関の解明を目的とし、リガンドとの複合体構造解析を行った。

【方法】Pedsa3617 を pET28a ベクターに組み込んだ発現プラスミドを用い、大腸菌 BL21(DE3)を宿主とし、His タグ融合タンパク質として発現させた。Ni-NTA アフィニティークロマトグラフィーで精製した。また、求核触媒残基である Asp365 を Ala に置換した変異体 D365A を作製し、野生型と同様に発現と精製を行った。ハンギングドロップ蒸気拡散法にて結晶を作製し、さまざまな糖にソーキング、X 線回折データを収集し立体構造を決定した。

【結果と考察】野生型と D-ガラクトース（WT-Gal）または L-フコース（WT-Fuc）、D365A と pNP-Gal（D365A-pNPGal）との複合体構造をそれぞれ、2.30 Å、1.85 Å、2.10 Å 分解能で決定した。WT-Gal および D365A-pNPGal では、それぞれのリガンドが活性部位に 1 分子ずつ結合しているのに対し、WT-Fuc では 3 分子の Fuc が結合しており、そのうちの 1 分子（Fuc1）が活性部位近傍に結合していた。構造を比較すると、WT-Gal と D365A-pNPGal ではいずれも Gal がサブサイト-1 に位置しており、pNPGal の pNP 基および Fuc1 はサブサイト+1 と考えられる部位に位置していた。本酵素はホモ二量体を形成しているが、他方のサブユニットの特徴的なループが活性部位近傍に位置しており、ループ上にある Arg175 が pNP 基または Fuc1 と水素結合を形成していた。D365A-pNPGal と WT-Fuc とを重ね合わせると、Gal の C1 炭素と Fuc1 の 2 位 OH 基がグリコシド結合しうる距離にあることから、本酵素の基質は 2-*O*-α-galactopyranosyl-L-fucose ではないかと推定される。

α-galactosidase, fucose, GH31

講演番号：3E32a04
講演日時、会場：3 月 28 日 09:33～ E 校舎 32 会場

1,2-β-マンノビオースホスホリラーゼの X 線結晶構造解析

X-ray Crystallography of GH130 1,2-beta-mannobiose phosphorylase.

○津田 智弘[1]、仁平 高則[2]、荒川 孝俊[1]、中井 博之[2]、北岡 本光[3]、伏信 進矢[1] ([1]東大・院農、[2]新潟大農、[3]農研機構　食総研)
○Tomohiro TSUDA[1], Takanori NIHIRA[2], Takatoshi ARAKAWA[1], Hiroyuki NAKAI[2], Motomitsu KITAOKA[3], Shinya FUSHINOBU[1] ([1]Grad. School of Agricultural Life Sciences, Tokyo Univ., [2]Niigata Univ., [3]NFRI, NARO)

糖質加リン酸分解酵素ホスホリラーゼは，その厳密な基質特異性と反応の可逆性から，オリゴ糖合成に有効な酵素のひとつである。現在、糖質ホスホリラーゼは５つのファミリーが知られているが、既知ホスホリラーゼの種類自体は少ないことからその利用は未だ限定的で，かつ反応生成糖の構造情報についても不足している。糖質ホスホリラーゼファミリーの中でも、糖質加水分解酵（GH）ファミリー130 は，β-マンノシドを加リン酸分解してα-マンノース 1-リン酸を遊離する酵素として知られている。

通性嫌気性の無芽胞グラム陽性桿菌である *Listeria innocua* Clip11262 由来 1,2-β-マンノビオースホスホリラーゼ(Lin0857)は GH130 に属し、1,2-β-マンノビオースの加リン酸分解を触媒する。Lin0857 はマンノトリオースまで 1,2-β-オリゴマンナン合成反応を行うことが確認されている。我々はこれまでに Lin0857 とマンノース及び、1,2-β-マンノビオースの複合体構造を決定している。今回はマンノトリオースとの複合体結晶の構造解析を行った。

Lin0857 の His-tag 融合組み換えタンパク質を大腸菌を宿主として発現し、精製したタンパク質を用いて結晶を作成し、マンノトリオースをソーキング法を用いて結合させた。KEK-PF-AR　NW12A において 2.7Å分解能の X 線回折を測定し、分子置換法によって複合体構造を決定した。

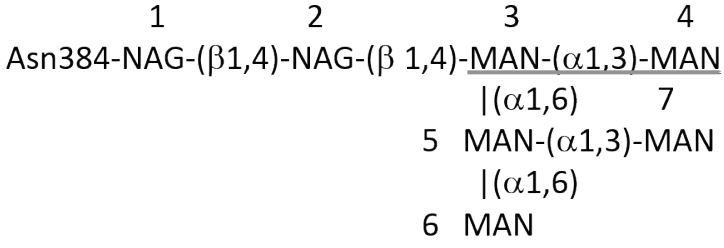
結晶格子中の Lin0857 は既知の GH130 ファミリーと同様にβバレル構造を有しており、ホモダイマーを形成している。触媒部位にはマンノトリオースの電子密度が確認された。電子密度マップ中ではサブサイト＋２に結合したマンノースは不明瞭であったが、大体の結合位置が確認できた。

Glycoside Hydrolase Famiry 130, Phosphorylase, Crystal Structure

講演番号：3E32a05
講演日時、会場：3 月 28 日 09:44～ E 校舎 32 会場

麹菌 *Aspergillus oryzae* 由来グルコアミラーゼの X 線構造解析
X-ray crystallographic analysis of glucoamylase from *Aspergillus oryzae.*
○永吉 恵美[1]、水谷 公彦[2]、高橋 延行[2]、三上 文三[2]、瀧井 幸男[1] ([1]京都学園大学、[2]京都大学)
○emi nagayoshi[1], kimihiko mizutani[2], nobuyuki takahashi[2], bunzo mikami[2], yukio takii[1] ([1]Kyouto Gakuen Univ., [2]kyouto Univ.)

【目的】
グルコアミラーゼ [EC 3.2.1.3](1, 4-α-グルカン glucohydrolases) は、デンプンの非還元末端からのグルコースを遊離し、Cazy データベース (http://www.cazy.org) では GH15 ファミリーに属する反転型 (inverting) 酵素として分類されている。麹菌の酵素は、酒、醤油、酢などの伝統的な日本の発酵製品の生産で重要である。今回、演者らは麹菌 *A.oryzae* のグルコアミラーゼの結晶構造解析を行い、構造既知のグルコアミラーゼ(糸状菌 *Aspergillus awamori*、*Aspergillus niger*、*Rhyzopus oryzae*、酵母 *Sacharomyces Thermoanaerobacterium*、細菌 *saccharolyticum*) との構造比較を行った。
【方法・結果】
A.oryzae のグルコアミラーゼ (55ｋDa) は、グルコアミラーゼ遺伝子 (*glaB*) をセルフクローニングした麹菌より発現させ、イオン交換クロマトグラフィーを用いて精製した。その精製酵素を用いて結晶化の初期スクリーニング (800 条件) を行った結果、PEG3000 を沈殿剤としたシッティングドロップ蒸気拡散法により 20℃で約 1 カ月間で結晶化に成功した。得られた結晶は、$P2_12_12$ の空間群に属し、格子定数は a＝79.66、b＝102.17、c＝59.12 Å であり、非対称単位当たり 1 分子を含むと推定された。*A.nidulans* のグルコアミラーゼをサーチモデルとする分子置換法により初期位相を決定し、PHENIX を用いて最終的に 1.5Å分解能で R＝0.138、R_{free}＝0.178 まで精密化された結晶構造を決定することができた。全体的な構造は、*A.awamori*、*A.niger* のグルコアミラーゼとほぼ同じ (α/α)$_6$バレル構造を持ち、非対称単位に 466 個の アミノ酸残基、22 個のの糖残基、558 個の水分子を含んでいた。また、酵素表面にはＮアセチルグルコサミン (NAG) やマンノース (MAN) で構成された６本のＮ型糖鎖と２本のＯ型糖鎖の付加が確認され、最長のものは右の図のように同定され、その枝部分のマンノース (３, ４) が本酵素の活性部位に結合していることが明らかになった。この結果を基に本酵素の触媒メカニズムについて検討した。



glucoamylase, *Aspergillus oryzae*

講演番号：3E32a06
講演日時、会場：3 月 28 日 10:05～ E 校舎 32 会場

β - アミラーゼ／マルトース複合体結晶構造の pH 変化

Crystal structure of β-amylase/maltose complex in different pH conditions

○三上 文三[1]、河村 和広[1]、安達 基泰[2]、水谷 公彦[1]、高橋 延行[1] ([1]京大院農、[2]日本原子力機構)
○Bunzou Mikami[1], Kazuhiro Kawamura[1], Motoyasu Adachi[2], Kimihiko Mizutani[1], Nobuyuki Takahashi[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Japan Atomic Energy Agency)

【目的】βーアミラーゼの活性部位には触媒残基である二つのGlu残基の他に、最大11Å移動する9残基のフレキシブルループと構造が切り換わる5残基のインナーループの二つの可動ループが存在する。また、触媒残基の近くに存在するLys295は基質の結合状態によってその側鎖の構造を変化させる。本酵素の生成物であるマルトースは活性部位の-2～-1と+1～+2のサブサイトに連続して2分子が結合するが、-1 サイトのグルコースの環はαアノマーのボート型に歪むことが知られている。この歪みが生ずる原因を探るために、キャピラリーを用いた非凍結状態でのＸ線結晶構造解析を行い、マルトースの結合と-1 サイトのグルコースの環の歪みのpH依存性について検討した。
【方法】野生型β - アミラーゼの三方晶の結晶はpH5.4、42%飽和硫安溶液中でハンギングドロップ蒸気拡散法によって作製した。得られた結晶はpH 3.3～8.8に調整したマルトースを含む母液に５分間ソーキングした後にガラスキャピラリーに封じ、SPring-8のBL26B1で非凍結状態で回折データの収集を行った。一部のデータは30%グリセロールを含む母液を用いて凍結し、凍結状態でより高分解能のデータを同様に収集した。構造の精密化にはSHELXLを用いた。各pHで異なるマルトース濃度での回折データを収集してマルトース結合の濃度依存性を調べた。
【結果】非凍結状態での回析データの分解能は1.5～1.9Åであった。本酵素の至適pHである5.4ではマルトースは本酵素の-2～-1と+1～+2のサブサイトに連続して2分子が結合し、-1 サイトのグルコースの環はαアノマーのボート型に歪む。ｐＨを変化させると、ｐＨ４以下では-1 サイトのグルコースの環はイス型になり、α、βの両アノマーが結合する。αアノマーが結合すると、+1サイトの４位の酸素原子と衝突するため、+1～+2のサブサイトに結合しているマルトースは+2～+3サイトに移動して結合することが明らかになった。-1サイトに結合しているグルコース残基の構造変化のｐＨ依存性から、ボート型の歪みには塩基触媒残基の解離が関係していると推定された。一方、凍結結晶を用いた場合にはマルトースの結合のpH変化に再現性が乏しく、凍結によるpHの変化と結晶格子の縮小の影響が大きいと考えられた。以上のことから、結晶構造を用いた酵素の構造変化の評価には非凍結状態での構造解析が有用であることが示された。

beta-amylase, X-ray crystallography, enzyme mechanism

講演番号：3E32a07
講演日時、会場：3 月 28 日 10:16～ E 校舎 32 会場

連鎖球菌による哺乳類細胞外マトリクス（グリコサミノグリカン）の分解：不飽和グルクロニルヒドロラーゼの反応機構
Degradation of mammalian extracellular matrices, glycosaminoglycans, by streptococci: Reaction mechanism of unsaturated glucuronyl hydrolase
中道 優介[1]、老木 紗予子[1]、三上 文三[1]、村田 幸作[2]、○橋本 渉[1] ([1]京大院・農、[2]摂南大・理工)
Yusuke Nakamichi[1], Sayoko Oiki[1], Bunzo Mikami[1], Kousaku Murata[2], ○Wataru Hashimoto[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Setsunan Univ.)

【背景と目的】グリコサミノグリカンは、動物の細胞外マトリクスとして存在する酸性多糖であり、細胞間相互作用に重要な機能を示す。これまでに、病原性連鎖球菌が多糖リアーゼと不飽和グルクロニルヒドロラーゼ（UGL）の協調作用によりグリコサミノグリカンを単糖にまで分解し、宿主細胞に侵入・感染することを示唆してきた。UGL は、1 つのアスパラギン酸残基を酸と塩基の両触媒基として、断片化グリコサミノグリカン（不飽和二糖）の二重結合を水和することにより反応を開始し、グリコシド結合を切断する。連鎖球菌 *Streptococcus agalactiae* に由来する UGL（SagUGL）において、本アスパラギン酸残基は Asp-175 である。一方、SagUGL の活性部位に位置する Asp-115 は細菌由来 UGL に広く保存されているにもかかわらず、その役割は不明である。本研究では、SagUGL における Asp-115 の変異体（D115N）の X 線結晶構造解析を進め、当該残基の機能を明らかにすることを目指した。また、UGL の反応阻害剤は医薬への応用が期待されるため、本酵素のグリシンによる反応阻害を解析した。
【方法と結果】SagUGL の Asp-115 を Asn に置換した変異体（D115N）を構築した。組換え変異体の酵素活性を測定したところ、顕著に活性が低下したため、速度パラメーターを決定するには至らなかった。そこで、本変異体の X 線結晶構造解析に着手した。硫酸アンモニウムを主要な沈殿剤とする条件で得られた結晶から、分解能 2.0 Å までの X 線回折データを収集し、変異体の立体構造を決定した。変異体は、野生型酵素と同等の立体構造（基本骨格：α6/α6-バレル）を示した。しかし、野生型酵素と比較して、変異体の Asn-115（野生型：Asp-115）と触媒残基 Asp-175 の側鎖の配向が異なっている。Asn-115 は、Gly-117、Phe-118、Asp-175、および Asn-179 との間で、5 本の水素結合を形成していた。本酵素は、Asp-175 が不活性型から活性型に配置をシフトすることにより触媒反応を行う。したがって、変異体では、Asn-115 が Asp-175 と相互作用することにより、Asp-175 が活性型の位置にシフトできなくなり、変異体酵素の活性低下が引き起こされることが明らかになった。
以前に、*Bacillus* 属細菌由来 UGL の酵素反応がグリシンにより阻害されることを見出している。そこで、SagUGL のグリシンによる阻害効果を調べた。その結果、グリシンは SagUGL の反応を阻害し、その阻害定数は 3.6 mM であった。
【考察】SagUGL の Asp-115 は、触媒残基である Asp-175 と静電的に反発することにより、Asp-175 を活性型配置にシフトさせることに機能すると考えられた。
本研究の一部は、水谷糖質科学振興財団の研究助成により行われた。

glycosaminoglycan, *Streptococcus*, unsaturated glucuronyl hydroalse

講演番号：3E32a08
講演日時、会場：3 月 28 日 10:27～ E 校舎 32 会場

Prosthecobacter debontii RU3 由来アルギン酸分解酵素の遺伝子クローニングと異種生産
Cloning and heterogenous expression of alginate degrading enzyme gene of *Prosthecobacter debontii* RU3

○山崎 まいこ[1]、小林 泰明[1]、川本 仁志[2]、三木 康成[2]、中川 純一[3]、八木 寿梓[4]、鈴木 宏和[1]、大城 隆[1] ([1]鳥取大院・工、[2]海産物のきむらや、[3]東京農大、[4]鳥取大・工・GSC)
○Maiko YAMASAKI[1], Yasuaki KOBAYASHI[1], Hitoshi KAWAMOTO[2], Yasunari MIKI[2], Junichi NAKAGAWA[3], Hisashi YAGI[4], Hirokazu SUZUKI[1], Takashi OHSHIRO[1] ([1]Tottori Univ., [2]Marine Products Kimuraya, [3]Tokyo Univ. Agriculture, [4]Tottori Univ. GSC)

【目的】

コンブ、ワカメなどの褐藻類に含まれるフコイダンは、様々な生理活性が報告されているヘテロ硫酸化多糖であり、健康食品素材として近年注目を集めている。しかし、フコイダンの構造は褐藻の種類によって大きく異なり、フコイダン分子構造（重合度）と報告されているフコイダン生理機能の構造活性相関については未解明な点が多い。このことから当研究室では、フコイダンの酵素的低分子化に関する研究を目的とし、これまでにオキナワモズク由来フコイダンを単一炭素源とした微生物スクリーニングによって、複数のフコイダン資化性菌を単離および同定してきた。興味深いことに、そのうちの *Prosthecobacter debontii* RU3 は、フコイダン資化性に加えてアルギン酸資化性も示す。アルギン酸はフコイダンと同じく褐藻に特有な多糖で、その分解産物には様々な応用が期待されている。そこで本研究では、RU3 株が有するアルギン酸分解酵素遺伝子の同定を目的とし、本菌株のゲノム配列解析、ゲノムマイニング手法による候補遺伝子のクローニング、そして候補遺伝子の大腸菌異種発現を行った。

【方法・結果】

フコイダンを単一炭素源とした培地中で、RU3 株を 30℃、3 日間振とう培養し、得られた菌体を超音波破砕した。得られた無細胞抽出液中には明確なアルギン酸分解活性が見出され、本株がアルギン酸分解酵素を産生していることが示唆された。そこで RU3 株の全ゲノム配列を次世代シークエンサーと in silico Molecular Cloning プログラムを用いて解析し、得られた配列情報から既知アルギン酸リアーゼ遺伝子と相同性を示す遺伝子を探索したところ、候補遺伝子が 1 つだけ見出された。本遺伝子の ORF は 795 bp から構成され、その発現産物の推定分子量は 29 kDa であった。本候補遺伝子を pET-21a に連結し、得られたプラスミドで大腸菌 BL21(DE3)を形質転換した。得られた形質転換体を 20℃で培養したところ、遺伝子発現産物が His-Tag 融合タンパク質として生産され、当該菌体から調製された無細胞抽出液中には明確なアルギン酸分解活性が確認できた。現在、固定化金属イオンアフィニティークロマトグラフィーを用いた発現産物の精製ならびに酵素諸性質の分析を行っている。

alginate, fucoidan, algae

講演番号：3E32a09
講演日時、会場：3 月 28 日 10:38～ E 校舎 32 会場

Luteolibacter algae H18 由来フコイダンデアセチラーゼの遺伝子クローニングと異種生産

Cloning and heterogenous expression of fucoidan deacetylase gene of *Luteolibacter algae* H18

○長尾 達彦[1]、隈部 絢子[1]、川本 仁志[2]、三木 康成[2]、中川 純一[3]、八木 寿梓[4]、鈴木 宏和[1]、大城 隆[1] ([1]鳥取大院・工、[2]海産物のきむらや、[3]東京農大、[4]鳥取大・工・GSC)

○ Tatsuhiko NAGAO[1], Ayako KUMABE[1], Hitoshi KAWAMOTO[2], Yasunari MIKI[2], Junichi NAKAGAWA[3], Hisashi YAGI[4], Hirokazu SUZUKI[1], Takashi OHSHIRO[1] ([1]Tottori Univ., [2]Marine Products Kimuraya, [3]Tokyo Univ. Agriculture, [4]Tottori Univ.GSC)

【目的】

フコイダンは、褐藻類や棘皮類の粘質物に含まれ、主鎖であるフコースに硫酸基やウロン酸が結合したヘテロ多糖である。海藻由来のフコイダンの生理活性は、抗血液凝固作用や抗ウイルス作用、抗ガン作用など多岐にわたり、これらの性質を利用した医療や健康食品への応用が期待されている。しかしながら、褐藻の種類によってフコイダンの構造は大きく異なり、構造と生理活性との関連には不明な点が多いのが現状である。当研究室では、オキナワモズク（*Cladosiphon okamuranus*）由来フコイダンの生理活性機構の解明を目指して、酵素的な低分子化に取り組んでいる。すでに単離しているフコイダン分解菌 *Luteolibacter algae* H18 株は、フコイダン分解酵素を細胞内に有しており、フコイダンの脱アセチル化反応の後に低分子化反応が起こることが明らかになっている。そこで今回、脱アセチル化反応を触媒するデアセチラーゼを精製するとともに、新たに明らかにした H18 株のゲノム情報を利用して、酵素遺伝子のクローニングおよび大腸菌での発現を行った。

【方法・結果】

フコイダンを単一炭素源として 0.5% 含む完全合成培地で H18 株を 30℃、3 日間振とう培養し、得られた菌体を超音波破砕することにより無細胞抽出液を調製した。酵素活性測定はフコイダンを基質とし、遊離する酢酸濃度を酵素的に定量する方法と、イオンクロマトグラフィーにより定量する方法で実施した。各種カラムクロマトグラフィーを用いて部分精製酵素を取得し、2 つの内部アミノ酸配列の決定を行った。

H18 株のゲノム DNA の解析を行ったところ、上記 2 つのアミノ酸配列を有している ORF（1,887 bp、628 aa）が見出された。この DNA 断片を PCR 増幅し、発現ベクターに連結して遺伝子のクローニングを行い、大腸菌でのタンパク質発現検討と酵素活性の測定を行った。その結果、目的タンパク質を大腸菌可溶性画分に発現させることができ、組換え菌株の無細胞抽出液はオキナワモズク由来フコイダンに対する脱アセチル化活性を有していることが明らかになった。本酵素の諸性質については、現在検討中である。

fucoidan, deacetylase, esterase

講演番号：3E32a10
講演日時、会場：3 月 28 日 10:49～ E 校舎 32 会場

糸状菌 *Aspergillus nidulans* が分泌する新規 *endo*-1,4-β-マンナナーゼの発見と機能解析
Didcovery of novel *endo*-1,4-ß-mannanase from fungus *Aspergillus nidulans*
○石原 紗彩耶[1]、金子 優平[1]、望月 麻衣[1]、山本 竜也[1]、山田 みゆき[1]、井村 宗仁[1]、小林 哲夫[2]、志水 元亨[1]、加藤 雅士[1] ([1]名城大・農、[2]名大院・生命農)
○Saaya ISHIHARA[1], Yuuhei KANEKO[1], Mai MOCHIZUKI[1], Tatuya YAMAMOTO[1], Miyuki YAMADA[1], Takahito IMURA[1], Tetsuo KOBAYASHI[2], Motoyuki SHIMIZU[1], Masashi KATO[1] ([1]Meijo Univ., [2]Nagoya Univ.)

【目的】
β-マンナンは針葉樹、グァーガムやコーヒー豆などの様々な植物に含まれる難分解性の多糖で、環境中に多く存在する未利用バイオマスの１つである。我々は、β-マンナンを唯一の炭素源として糸状菌 *Aspergillus nidulans* を生育させた際に、glycoside hydrolase family 5 (GH5) に属する一般的な *endo*-1,4-β-マンナナーゼと共に多量に細胞外に分泌される機能未知タンパク質 (HP) を見出した。HP は、機能が分かっている既知のタンパク質と全く相同性を有しておらず、推定される機能ドメインも含んでいなかった。本研究では β-マンナン応答的に生産される HP の機能を明らかにすることを目的とした。
【方法・結果】
様々な多糖類を炭素源として *A. nidulans* を生育させた際の *hp* 遺伝子の転写量を定量 PCR にて測定した。その結果、タンパク質レベルでの解析結果と同様に、β-マンナンを炭素源とした場合でのみ *hp* は発現していた。このことから、HP は β-マンナンの分解に関わっていることが示唆された。そこで、大腸菌を宿主として、N-末端に 6×His タグを付与した HP のリコンビナントタンパク質 (rHP) を作製した。種々の多糖を基質として rHP による分解活性を測定したところ、rHP は β-マンナンのみを特異的に加水分解した。rHP による β-マンナンの分解産物を TLC にて解析したところ、マンノペンタオース、マンノテトラオースおよびマンノトリオースが生成していた。一方、GH5 に属する *A. nidulans* 由来 *endo*-1,4-β-マンナナーゼを *Pichia pastris* にて発現させ同様に解析したところ、単糖にまで分解されていた。さらに、糸状菌に広く分布する既知の *endo*-1,4-β-マンナナーゼである GH5 と GH26、および一部の糸状菌のみが有する HP のアミノ酸配列を基に分子系統樹を作成したところ、HP は GH5、GH26 と異なるクラスターを形成した。これらのことから、今回発見した *A. nidulans* 由来の HP は、新規の *endo*-1,4-β-マンナナーゼであり、新しい GH ファミリーに属するものであることが示された。
なお、本研究の一部は生研センター「イノベージョン創出基礎的研究推進事業」の支援を受けて行われた。

endo-1,4-ß-mannanase, *Aspergillus nidulans*, ß-mannan

講演番号：3E32a11
講演日時、会場：3 月 28 日 11:10～ E 校舎 32 会場

糸状菌 *Aspergillus nidulans* が分泌する新規 *endo*-1,4-β-マンナナーゼの生理学的役割
Physiological role of novel *endo*-1,4-ß-mannanase in *Aspergillus nidulans*
○山田 みゆき[1]、金子 優平[1]、石原 紗彩耶[1]、望月 麻衣[1]、山本 竜也[1]、井村 宗仁[1]、小林 哲夫[2]、志水 元亨[1]、加藤 雅士[1] ([1]名城大・農、[2]名大院・生命農)
○ Miyuki YAMADA[1], Yuhei KANEKO[1], Saaya ISHIHARA[1], Mai MOCHIZUKI[1], Tatsuya YAMAMOTO[1], Takahito IMURA[1], Tetsuo KOBAYASHI[2], Motoyuki SHIMIZU[1], Masashi KATO[1] ([1]Meijo Univ., [2]Nagoya Univ.)

【目的】

我々は、β-マンナンを唯一の炭素源として糸状菌 *Aspergillus nidulans* を生育させた際に細胞外に分泌される新規 *endo*-1,4-β-マンナナーゼ (HP) を発見した。HP は既知の *endo*-1,4-β-マンナナーゼである glycoside hydrolase family 5 (GH5) および GH26 とは異なるファミリーに属することが明らかとなった。また、 HP は、β-マンナンを基質とした際、GH5 に属する *endo*-1,4-β-マンナナーゼ (Man5A) とは異なる分解物を生成し、酵素的な性質も大きく異なっていた。しかしながら、HP の生理学的役割については明らかになっていないため、本研究では β-マンナン分解における HP の役割の解明を目的とした。

【方法・結果】

hp 遺伝子破壊株 (*Δhp* 株) を作製し、種々の多糖を唯一の炭素源とした最少培地 (pH6.5) において生育させた。その結果、野生株 (WT 株) に比べて、β-マンナンのみを唯一の炭素源とした培地において *Δhp* 株の生育が抑制された。一方、セルロース、キチン、キシラン、マンノース、グルコースのみを炭素源とした培地では、どちらの株でも同様に生育したことから、HP は β-マンナンの資化に何らかの重要な役割を果たしていることが示唆された。そこで、HP および *A. nidulans* における既知の *endo*-1,4-β-マンナナーゼ (Man5A) のリコンビナントタンパク質を調製し、それらのグルコマンナンに対する酵素活性を測定することで、至適 pH および酵素学的パラメーターを算出した。その結果、グルコマンナンを基質にした場合、Man5A の至適 pH が 4.0 であるのに対して、 HP の至適 pH は 7.0 であったことから、HP は中性付近の pH において β-マンナンの分解に寄与していることが考えられた。グルコマンナンを炭素源とした培地 (グルコマンナン培地) において、 pH が生育に与える影響を WT 株と *Δhp* 株を用いて比較したところ、 培地の pH が中性付近のとき、WT 株に比べて *Δhp* 株では生育が抑制された。また、pH6.5 のグルコマンナン培地でそれぞれの株を生育させた際に得られた培養液中の *endo*-1,4-β-マンナナーゼ活性を測定したところ、*Δhp* 株では大きく低下していた。以上の結果から、HP は特に中性付近の生育条件において β-マンナンの分解に関与していることが強く示唆された。

本研究の一部は生研センター「イノベーション創出基礎的研究推進事業」の支援を受けて行われた。

Aspergillus nidulans, *endo*-1,4-ß-mannanase, ß-mannan

講演番号：3E32a12
講演日時、会場：3 月 28 日 11:21～ E 校舎 32 会場

カラギーナン分解酵素によるオリゴ糖の生産

Production of oligosaccharides by carrageenan-hydrolyzing enzyme.

○倉掛 昌裕、前野 裕紀、地頭 俊樹（福山大海洋生物）
○Masahiro Kurakake, Hiroki Maeno, Tishiki Jito (Fukuyama Univ.)

【目的】カラギーナンは紅藻類海藻から抽出される多糖類で、ガラクトースがα-1，3およびβ-1，4結合した基本構造から成っている。食品添加物としてゲル化剤や増粘多糖類に広く用いられている。このカラギーナンを酵素で加水分解することで付加価値のあるオリゴ糖の生産が可能となる。本研究では、カラギーナン分解菌を土壌より分離し、生産酵素によるオリゴ糖生成能について調べた。カラギーナンにはκ、λ等のタイプがあるが、ここでは実験操作上、流動性があり強固にゲル化しないλ-カラギーナンを実験試料として用いた。

【方法】カラギーナン分解菌の分離には、0.5％λ-カラギーナン、1.5％寒天末の平板培地を用い、30℃で培養を行った。分離菌の液体培養には0.5％λ-カラギーナン、0.2％酵母エキスの培地を用い、30℃で3日間試験管にて振とう培養した。カラギーナン分解活性は、1％λ-カラギーナン水溶液0.45mlに培養液上清を0.05ml加え混ぜ、pH5、40℃にて30分間反応させ、生成還元糖量を3，5-ジニトロサリチル酸法（DNS法）で測定することで求めた。1分間に1μmolのグルコースに相当する還元糖を生成する酵素量を１Uと定義した。酵素反応によりカラギーナンから遊離する糖類の分析にはHPLC（GL-C610カラム；日立化成(株)、キャリアー；水、流速；1.0ml/min、カラム温度：60℃）を用いた。

【結果】土壌からのカラギーナン分解菌の分離の結果、11 カ所の採取地より、生育の良いものとして細菌 63 株、放線菌 18 株、カビ 6 株の計 87 株が得られた。液体培養を行い、酵素活性を測定したところ、３株の菌体の酵素が比較的高活性となった。酵素生産に及ぼす炭素源の影響を調べるため、λ-カラギーナンの他にシュクロース、ガラクトースおよびグルコースを培地に用いて液体培養した。その結果、３株ともλ-カラギーナンの炭素源での酵素生産性が最も高くなり、λ-カラギーナンによる酵素誘導性が高いことがわかった。次に酵素活性に及ぼす温度の影響について調べた。反応温度を 40、50、60℃として酵素活性を測定した結果、いずれの菌でも 50℃で酵素活性値が最大だったことから、50℃付近が最適温度だと考えられた。λ-カラギーナンを基質として、pH 5、40℃で 24 時間反応させ、生成糖量およびオリゴ糖の生成能について調べた。

carrageenan, oligosaccharide, enzyme

講演番号：3E32a13
講演日時、会場：3 月 28 日 11:32～ E 校舎 32 会場

麹菌由来の新規β-1,6-グルコシダーゼ(BglH)の酵素学的諸性質
Purification and enzymatic characterization of a novel β-1,6-glucosidase (BglH) from *Aspergillus oryzae*
○渡部 昭、鈴木 萌、工藤 佳那子、氏家 成隆、五味 勝也（東北大院農・生物産業創成）
○Akira WATANABE, Moe SUZUKI, Kanako KUDOU, Seiryu UJIIE, Katsuya GOMI (Tohoku Univ.)

【目的】我々は、麹菌(*Aspergillus oryzae*)ゲノム情報を元に未解析の新規β-グルコシダーゼの機能解明をこれまで行ってきており、作製したβ-グルコシダーゼ遺伝子の網羅的高発現株から新規なβ-グルコシダーゼを精製しその酵素学的諸性質を報告してきた（１、２、３、４）。昨年度の本大会で報告した、麹菌由来の特徴的な基質特異性を持つβ-グルコシダーゼ(BglH)の酵素学的諸性質をさらに検討したので報告する。
【方法】麹菌ゲノムデータベース(DOGAN: http://www.bio.nite.go.jp/dogan/top、AspGD:http://www.aspgd.org/)を用いて探索し、麹菌ゲノム DNA を鋳型とした PCR 反応で目的 DNA 断片を増幅後、麹菌高発現用ベクター(pNGA142)に組み込み作製した推定β-グルコシダーゼ遺伝子の網羅的高発現株から取得した新規β-グルコシダーゼ(BglH)を、硫安塩析、陰イオン交換クロマトグラフィーを用いて精製し酵素学的諸性質を調べた。
【結果】BglH は、合成基質の pNPG、天然オリゴ糖のゲンチオビオースに非常に高い特異性を示し、他の基質はほとんど分解しない酵素であったことからβ-1,6-グルコシダーゼであると考えられた。このような基質特異性を示す酵素は糸状菌では初であり、自然界でも *Flavobacterium* 由来の酵素に次ぐ第２例目のものであった。活性に対する各種金属イオン、阻害剤等の影響を調べたところ、本酵素は 5mM の Hg^{2+}、Zn^{2+}の存在下で残存活性がそれぞれ 13.5%、86.1%と低下したが、同濃度の Ca^{2+}、Mg^{2+}、Mn^{2+}、Fe^{3+}の存在下では活性は賦活化され、10mM の EDTA 存在下でも活性に影響はなかった。また、β-グルコシダーゼの代表的阻害剤であるグルコノ-δ-ラクトン(10mM)の存在下で完全に活性を失った。本酵素は、pH が 2 から 8.5 の範囲で安定であり、他の麹菌由来のβ-グルコシダーゼと比較してより酸性側で安定であった。この他、BglH の他の諸性質を合わせて報告する。

なお、本研究は「復興促進プログラム（A-STEP）探索タイプ」の一貫として JST の委託を受けて実施された。
（１） 工藤ほか、2010 年度日本農芸化学会大会講演要旨集、ｐ２５６
（２） 工藤ほか、2011 年度日本農芸化学会大会講演要旨集、ｐ４４
（３） 工藤ほか、2012 年度日本農芸化学会大会講演要旨集、ｐ７９
（４） 渡部ほか、2014 年度日本農芸化学会大会講演要旨集、ｐ９２

β-1,6-glucosidase, *Aspergillus oryzae*, GH3

講演番号：3E32a14
講演日時、会場：3 月 28 日 11:43～ E 校舎 32 会場

Trichoderma reesei 由来β-グルコシダーゼの基質特異性
Substrate specificities of *Trichoderma reesei* β-glucosidases
○佐藤 大輔[1]、平沢 巽[1]、岡田 宏文[2]、尾形 慎[3]、中島 将博[4]、中井 博之[5]、戸谷 一英[1] ([1]一関高専・物化工、[2]長岡技科大・生物、[3]福島高専・物工、[4]東理大院・理工、[5]新潟大・農)
○ Daisuke SATO[1], Tatsumi HIRASAWA[1], Hirofumi OKADA[2], Makoto OGATA[3], Masahiro NAKAJIMA[4], Hiroyuki NAKAI[5], Kazuhide TOTANI[1] ([1]National Institute of Technology, Ichinoseki College, [2]BioEng., Nagaoka Univ. Tech., [3]National Institute of Technology, Fukushima College, [4]Science and Technology, Tokyo University of Science, [5]Faculty of Agriculture Niigata University)

【目的】　糸状菌 *T. reesei* の β-glucosidase (BGL)は BGL I (Cel3A)、BGL II (Cel1A)、Cel3C の 3 種が発現している。菌体内に存在する BGL II は、セルロース分解で生じた Cellobiose を Glc に分解すると推察されているが、菌体外の BGL I はセルロース分解に寄与しておらず生理的役割は不明である。一方、同じ GH family 3 に属するいもち病の病原菌 *Magnaporthe oryzae* 由来の BGL (Cel3A) は、*T. reesei* Cel3A (BGL I)と 66%の高い相同性を有し、β-1,3-グルカンである Laminaran や 2 糖である Laminaribiose に高い活性を持つことが知られている。これまでの研究により *T. reesei* BGL I (Cel3A) も同様の活性を有することが明らかになった。本研究では、異種発現した *T. reesei* BGL I (Cel3A) 、BGL II (Cel1A) に対し、未検討の多糖やオリゴ糖に対する広範な基質特異性や糖転移活性を調べた。
【方法】　*T. reesei* 由来の BGL I 遺伝子(*bgl1*)を組み込んだプラスミド pET *bgl1* を大腸菌 Rosetta-gami B で発現後、超音波で溶菌し、酢酸緩衝液(pH 4.0)で酸沈殿させ、上澄みを限外濾過により濃縮した。BGL II 遺伝子 (*bgl2*)を組み込んだ pET22bs *bgl2* は発現後、His tag 精製キットにより精製した。酵素の均一性は SDS-PAGE で確認した。精製酵素について *p*-nitrophenyl (*p*NP)配糖体、各種 2 糖、オリゴ糖、多糖に対する基質特異性を検討した。加水分解生成物はグルコースキットにより遊離 Glc の定量、Somogyl-Nelson 法、LC-MS による重合度別定量分析を行った。
【結果および考察】　*T. reesei* の BGL I は、Glcβ-*p*NP、Cellobioseβ-*p*NP の順に高い分解活性を示したが、他の *p*NP 配糖体は分解しなかった。本酵素は各種 β-1,3、β-1,4、β-1,6 オリゴ糖や、β-1,3/1,6 多糖(pachyman、Laminaran)をよく加水分解し Glc を生成したが、ドッキング解析から予想されたようにβ-1,2 オリゴ糖は 2 糖(sophorose)しか分解せず、3 糖以上と β-1,2 グルカンは分解しなかった。したがって、*T. reesei* の BGL I は、β-1,3-glucanase 活性を有する β-glucosidase であり、β-1,2 結合は 2 糖しか分解できないことがわかった。BGL II は、同様に Glcβ-*p*NP、Cellobioseβ-*p*NP に高い分解活性を示したが、宿主由来と考えられる β-galactosidase 活性が残存した。BGL II は多糖を分解せず、典型的な β-glucosidase と考えられたが、β-1,4、β-1,3、β1,2 結合した 2 糖を加水分解し、β-1,6 結合 2 糖(gentiobiose)は分解しなかった。生成物の NMR 解析等により cellobiose を基質とした糖転移活性も検討したので併せて報告する。

Trichoderma reesei, β-glucosidase, β-glucanase

講演番号：3E32p01
講演日時、会場：3 月 28 日 14:00～ E 校舎 32 会場

テンサイ α-グルコシダーゼの高重合度基質特異性はらせん構造の長鎖基質に適したサブサイト構造に起因する
Subsite structure of sugar beet α-glucosidase is suitted to bind with single-helical long-chain substrates

○田上 貴祥[1]、山下 恵太郎[2]、奥山 正幸[3]、森 春英[3]、姚 閔[2,4]、木村 淳夫[3]([1]酪農学園大学、[2]北海道大学大学院生命科学院、[3]北海道大学大学院農学院、[4]北海道大学先端生命科学研究院)
○Takayoshi TAGAMI[1], Keitaro Yamashita[2], Masayuki Okuyama[3], Haruhide Mori[3], Min Yao[2,4], Atsuo Kimura[3] ([1]Rakuno Gakuen Univ., [2]Graduate School of Life Science, Hokkaido Univ., [3]Research Faculty of Agriculture, Hokkaido Univ., [4]Faculty of Advanced Life Science, Hokkaido Univ.)

【背景】 α-グルコシダーゼは基質の非還元末端 α-グルコシド結合を加水分解し，α-グルコースを遊離する酵素である．多くの α-グルコシダーゼはポケット型の活性部位構造を持ち，二糖や三糖に対して高い基質特異性を示す．一方，テンサイ由来の α-グルコシダーゼ（SBG）は同じくポケット型の活性部位構造を持つにも関わらず，マルトヘプタオースやアミロースといった高重合度基質に対して高い基質特異性（高 k_{cat}/K_m および低 K_m）を示す．本研究では SBG の長鎖基質結合様式を明らかにすることを目的として，高重合度擬似糖を用いた反応速度論的解析および X 線結晶構造解析を行った．
【方法と結果】 α-グリコシダーゼ阻害剤である擬似四糖（アカボース，AC4）の還元末端側マルトース部分をマルトトリオース～マルトオクタオースに変換した擬似五糖～擬似十糖（アカビオシルマルトオリゴ糖，AC5～AC10）を酵素合成した[Tagami, *et al*., *BBB*, **77**, 312-319 (2013)]．SBG に対する AC4～AC10 の阻害定数（K_i）と阻害型式を Lineweaver-Burk プロットから決定した．阻害型式はいずれも拮抗阻害であり，各阻害剤の K_i（μM）は 15.4±3.5（AC4），2.66±0.21（AC5），1.63±0.73（AC6），0.845±0.160（AC7），0.888±0.032（AC8），0.936±0.177（AC9），および 1.01±0.13（AC10）であった．AC4～AC7 の阻害定数の対数（logK_i）とマルトテトラオース～マルトヘプタオースの加水分解反応における k_{cat}/K_m の逆数の対数（log(K_m/k_{cat})）が正の相関を示したことから，アカビオシルマルトオリゴ糖は SBG の加水分解反応における遷移状態を模倣していることが示された．

SBG と AC8 との複合体結晶構造を 1.5 Å 分解能で決定した．サブサイト+3～+7 に結合した AC8 のマルトオリゴ糖部分は分子内水素結合を形成し，安定ならせん構造をとっていた．サブサイト+4～+7 において基質結合に関与し得るアミノ酸残基を Ala に置換した変異酵素の解析から，Leu240，Ser497 および Val501 の側鎖がサブサイト+4 の形成に重要であることが示された．一方，立体構造上のサブサイト+7 に位置した Lys493 および Pro502 の変異酵素は野生型酵素と同等の K_m 値を示し，両残基が基質結合に寄与しないことが明らかとなった．サブサイト+5 および+7 ではアミノ酸側鎖と基質との相互作用は無く，Ser497 と Gly498 および Gly499 と Arg500 の主鎖カルボニル酸素が基質と水素結合を形成していた．以上の結果から，SBG による高重合度基質の補足には主鎖構造が強く関与していることが明らかとなった．SBG は安定ならせん構造の長鎖マルトオリゴ糖やアミロースと立体障害を生じないサブサイト構造を持っており，基質自身の安定化エネルギーを利用することで高重合度基質に対する K_m の低下および遷移状態の安定化を達成していると考えられる．

α-glucosidase, amylose, inhibitor

講演番号：3E32p02
講演日時、会場：3 月 28 日 14:11～ E 校舎 32 会場

Bacillus sp. AHU 2001 由来 GH31 α-グルコシダーゼの生化学的諸性質と基質認識に重要な構造因子の解析

Biochemical properties and structural elements for substrate recognition of alpha-glucosidase from *Bacillus* sp. AHU 2001

○佐分利 亘、奥山 正幸、熊谷 祐也、木村 淳夫、森 春英（北大院農）
○ Wataru SABURI, Masayuki Okuyama, Yuya Kumagai, Atsuo Kimura, Haruhide Mori (Hokkaido Univ.)

【目的】α-グルコシダーゼは基質の非還元性末端の α-グルコシド結合を加水分解する酵素であり，微生物から哺乳類，植物に至るあらゆる生物に存在する．本酵素は糖質加水分解酵素のアミノ酸配列に基づく分類では主として糖質加水分解酵素ファミリー（GH）13 と 31 に分類される．細菌由来 α-グルコシダーゼの多くは GH13 に分類され，GH31 に分類される酵素は少ない．本研究では，土壌から分離した *Bacillus* sp. AHU 2001 より GH31 に分類される α-グルコシダーゼ（BspAG31A）を見出し，その生化学的諸性質および基質結合部位周辺のアミノ酸残基の機能を解析した．

【結果・考察】マルターゼ生産能を指標に道内土壌より分離した *Bacillus* sp. AHU2001 の無細胞抽出液より BspAG31A を精製した．本酵素の N 末端アミノ酸配列が GH31α-グルコシダーゼと類似性を示したため，この配列と GH31 の保存領域 A に基づき設計したプライマーを用い，PCR により *BspAG31A* 部分配列を取得した．得られた配列を基に逆 PCR を行い，*BspAG31A* 全長（2,373 bp）を含む 9,008 bp の塩基配列を決定した．*BspAG31A* の周辺には，マルトオリゴ糖の代謝に働くと推定される ABC トランスポーターやマルトースホスホリラーゼの遺伝子が見出された．BspAG31A のアミノ酸配列は，既報の細菌由来 GH31α-グルコシダーゼと 27～61%の配列同一性を示し，特に *Bacillus thermoamyloliquefaciens* 由来 α-グルコシダーゼ II と 61%の高い配列同一性を示した．大腸菌により生産した組換え BspAG31A はマルトオリゴ糖に高い特異性を示したが，コージビオース，ニゲロースおよびネオトレハロースも加水分解した。これらの基質に対する k_{cat}/K_m はそれぞれマルトースに対する値の 6.3%, 15%, および 13%であった．GH31α-グルコシダーゼにおいてグルコシド結合への特異性に重要と考えられている活性ドメインの β→α ループ 1 に位置する Tyr268 を Trp に置換した変異酵素では，イソマルトースに対する k_{cat}/K_m が 15 倍に上昇した．当該変異では α1-4 結合からなる基質に対する加水分解活性のみが著しく減少したことから，Tyr268 は α1-4 結合への高い特異性に重要と考えられた．BspAG31A のモデル構造から，N 末端ドメインのループ上の Tyr173 と β→α ループ 1 上の Trp370 はサブサイト+2 において基質を挟むように疎水性相互作用すると推定された．Trp370 については GH31α-グルコシダーゼで完全に保存されており，W370A ではマルトースに対する k_{cat}/K_m が野生型酵素の 0.13%に低下した．一方，Y173A では野生型酵素より 3 糖に対する特異性が低下したため，Tyr173 によるサブサイト+2 の形成への寄与が支持された．また本変異体では 4 糖以上の長鎖マルトオリゴ糖に対する特異性の上昇が確認された．

alpha-glucosidase, glycoside hydrolase family 31, substrate specificity

講演番号：3E32p03
講演日時、会場：3 月 28 日 14:22～ E 校舎 32 会場

Paenibacillus curdlanolyticus B-6 株由来の Xyn10C によるアラビノキシランからのα-L-Ara*f*(1→2)-[α-L-Ara*f*(1→3)]-D-Xyl*p* の生成
Paenibacillus curdlanolyticus B-6 xylanase Xyn10C capable of producing a doubly arabinose-substituted xylose, α-L-Ara*f*(1→2)-[α-L-Ara*f*(1→3)]-D-Xyl*p*, from rye arabinoxylan
○粟冠 真紀子[1]、イムジョリアク シリラック[2]、ジョムエンボウ パタポーン[2]、カルピラノ パイリン[2]、勝崎 裕隆[1]、木村 哲哉[1]、パン パタラ[2]、タチャパイクウン チャクリット[2]、ロンサイウッド ジャリヤ[2]、ラタナカノックチャイ カノック[2]、粟冠 和郎[1] ([1]三重大院、[2]キングモンクット大)
○Makiko SAKKA[1], Siriluck Imjongjairak[2], Pattaporn Jommuengbout[2], Pirin Karpilanondh[2], Hirotaka Katsuzaki[1], Tetsuya Kimura[1], Patthra Pason[2], Chakrit Tachaapaikoon[2], Jariya Romsaiyud[2], Khanok Ratanakhanokchai[2], Kazuo Sakka[1] ([1]Mie Univ., [2]King Mongkut's Univ)

【目的】*Paenibacillus curdlanolyticus* B-6 株は好気的条件下でキシラナーゼを中心とするセルロソーム様の多酵素複合体を形成する。これまでに、Xyn10A、Xyn10B、Xyn10D および Xyn11A について酵素的性質が報告されている。今回は、Xyn10C の酵素特性を調べたところ、ライ麦アラビノキシランを基質としたとき、分解産物として α-L-Ara*f*-(1→2)-[α-L-Ara*f*-(1→3)]-D-Xyl*p* を生じることを見いだしたので報告する。
【方法および結果】
Xyn10C は、シグナルペプチドを含めて 318 アミノ酸からなるキシラナーゼであり、GH10 の触媒モジュールのみからなる酵素である。触媒モジュールをコードする領域を pET-28a に連結し、大腸菌で組換え酵素（rXyn10C）として発現させ、精製した。rXyn10C は、可溶性のライ麦アラビノキシランとバーチウッドキシラン対して強い活性（約 10,000 μmol/min/μmol-protein）を示したのに対して、不溶性小麦アラビノキシランに対しては弱い活性（約 17 μmol/min/μmol-protein）を示した。既に報告した rXyn10D は、Xyn10C と同一性が高い（75%）GH10 と CBM3 からなる酵素であるが、不溶性小麦アラビノキシランに対しても比較的高い活性を示した。Xyn10C と rXyn10D の不溶性基質に対する分解活性の違いは、CBM3 の有無によるものと考え、rXyn10C に CBM3 を付与したが、不溶性基質に対する活性はほとんど変化しなかった。
rXyn10C のキシロオリゴ糖に対する分解活性を TLC で調べたところ、キシロビーオース（X2）には作用せず、X3 に対しては弱い活性を示し、X2 と X1 を生じたが、X3 も残存した。X4 は主に X2 に、X5 と X6 は X3 と X2 に分解された。ライ麦アラビノキシランを基質としたときの分解産物を TLC で分析したところ、X1 の位置よりも上方に未同定の２つのスポットが確認され、下の方から順番に U1、U2 とした。U1 を *Bacillus licheniformis* SVD1 株由来の α-L-アラビノフラノシダーゼ Axh43A で処理したところ、U2 とアラビノースが生じた。また、U1 と U2 を回収し、質量分析に供したところ、U1 はペントース３つ、U2 はペントースが２つからなるオリゴ糖であることが分かった。これらの結果より、U1 は α-L-Ara*f*-(1→2)-[α-L-Ara*f*-(1→3)]-D-Xyl*p* であり、U2 は α-L-Ara*f*-(1→2)-D-Xyl*p* であると結論した。GH10 のキシラナーゼの中では、アラビノースにより修飾されたキシロースの非還元末端側で切断する酵素は知られているが、還元末端側でも切断できる酵素は知られておらず初めての例と思われる。

Paenibacillus curdlanolyticus, Xyn10C, rye arabinoxylan

講演番号：3E32p04
講演日時、会場：3 月 28 日 14:33～ E 校舎 32 会場

HRGP の分解に関与する *Bifidobacterium longum* 由来α-L-アラビノフラノシダーゼの機能解析

Characterization of *Bifidobacterium longum* α-L-arabinofuranosidases which involved in HRGP degradation.

○藤田 清貴[1]、坂本 彩美[1]、下川 倫子[1]、金子 哲[2]、北原 兼文[1]([1]鹿児島大農、[2]食総研)
○ Kiyotaka Fujita[1], Ayami Sakamoto[1], Michiko Shimokawa[1], Satoshi Kaneko[2], Kanefumi Kitahara[1] ([1]Kagoshima Univ., [2]National Food Research Institute)

【目的】

Hydroxyproline-Rich GlycoProtein(HRGP)は、β-アラビノオリゴ糖鎖が付加されたエクステンシンとⅡ型アラビノガラクタン糖鎖(Ⅱ型AG)が付加されたArabinoGalactan-Protein(AGP)に分類される植物プロテオグリカンである。我々は、β-アラビノオリゴ糖鎖とⅡ型AG分解に対する分解酵素群を*Bifidobacterium longum*から見いだし、HRGP分解代謝経路の解明に成功した。本研究では、HRGPの分解に関与する二種類のα-L-アラビノフラノシダーゼ(BLLJ_0213及びBLLJ_1854)の機能解析を目的とした。

【方法】

B. longum JCM1217 からクローニングし、大腸菌で発現させた GH43 に属するα-L-アラビノフラノシダーゼである BLLJ_0213 と BLLJ_1854 を各種α-L-アラビノフラノシド(α-Ara*f*)含有基質を用いて糖分解活性を測定した。使用した基質は、*p*NP-α-L-arabinofuranoside(*p*NP-α-Ara*f*)、Ara*f*-α1,2-Ara*f*-α-OMe(α1,2-Araf_2-OMe)、Ara*f*-α1,3-Ara*f*-α-OMe(α1,3-Araf_2-OMe)、Ara*f*-α1,5-Ara*f*-α-OMe(α1,5-Araf_2-OMe)、Ⅱ型 AG 側鎖のα1,3-Ara*f* で修飾されたガラクトオリゴ糖(α1,3-Ara*f*-Gal$_3$)、β-アラビノオリゴ糖鎖 Ara*f*-α1,3-Ara*f*-β1,2-Ara*f*-β1,2-Ara*f*-β1-Hyp(Araf_4-Hyp)、カラマツ由来のⅡ型 AG(LWAG)、ポテトレクチンである。

【結果】

BLLJ_0213 は、*p*NP-α-Ara*f* に作用せずにα1,3-Araf_2-OMe のみに作用した。また、Araf_4-Hyp やポテトレクチンからもアラビノースを遊離した。このため、β-アラビノオリゴ糖鎖のα1,3-Araf_2の二糖構造を厳密に認識して切断する酵素であると考えられた。BLLJ_1854 は、Araf_4-Hyp に作用せず、*p*NP-α-Ara*f* 及びα1,3-Araf_2-OMe に対して弱い遊離活性を示した。一方、α1,3-Ara*f*-Gal$_3$や LWAG に対して高い切断活性を示した。このため、Ⅱ型 AG の Ara*f*α1,3Gal の二糖構造を認識して切断する酵素であると考えられた。以上の結果、BLLJ_0213 と BLLJ_1854 は、β-アラビノオリゴ糖鎖とⅡ型 AG の末端に付加されているα-Ara*f* 結合を厳密に認識して切断するα-L-アラビノフラノシダーゼであることが明らかとなった。現在、詳細な機能解析を行っている。

α-L-arabinofuranosidase, *Bifidobacterium longum*, HRGP

講演番号：3E32p05
講演日時、会場：3 月 28 日 14:44～ E 校舎 32 会場

Bacteroides thetaiotaomicron 由来 GH97 β-L-アラビノピラノシダーゼの機能解析
Characterization of GH97 ß-L-arabinopyranosidase from *Bacteroides thetaiotaomicron*
○大嵜 翔平、松永 夏奈、奥山 正幸、木村 淳夫 (北大院農)
○Shohei OSAKI, Kana MATSUNAGA, Masayuki OKUYAMA, Atsuo KIMURA (Hokkaido Univ.)

[目的]ヒトの腸内細菌である *Bacteroides* 属の細菌のゲノム配列中には多糖代謝に関わる酵素をコードする遺伝子が数多く存在し、それらの酵素はヒトが消化できない多糖も分解することができる。*Bacteroides thetaiotaomicron* VPI-5482 のゲノム配列中には GH97 パラログが 10 あり、そのうちアノマー反転型 α-グルコシド加水分解酵素 (BtGH97a)およびアノマー保持型 α-ガラクトシド加水分解酵素 (BtGH97b)の機能解析が過去に行われている。本研究ではパラログに含まれる Bt3661 の遺伝子産物の推定・諸性質を検討することを目的とした。
[方法]発現ベクターpCold に Bt3661 遺伝子を導入し、BL21(DE3)を宿主に用い組換え Bt3661 を発現した。発現した組換え酵素を Ni アフィニティクロマトグラフィーにより精製した。本酵素を用いて種々の *p*-nitrophenyl (pNP)合成基質を用いた基質特異性、温度・pH 特性、金属イオン依存性および機能既知の BtGH97b との基質特異性の比較に関する実験を行った。
[結果]本酵素は pNP β-L-arabinopyranoside (pNP β-L-Ara*p*)および pNP α-D-galactopyranoside (pNP α-Gal*p*)に対して活性を示し、その K_m、k_{cat} や k_{cat}/K_m 値はそれぞれ 17.2 mM、9.88 s^{-1}、0.58 $s^{-1}\cdot mM^{-1}$ および 20.8 mM、4.29 s^{-1}、0.255 $s^{-1}\cdot mM^{-1}$ であった。両基質を比べると pNP β-L-Ara*p* に対して良好な特異性を示したので、本酵素を β-L-アラビノピラノシダーゼ (BtAra97c)とした。BtAra97c の至適 pH は 5.5、至適温度は 35 ℃、15 分間の処理による温度安定性は 40 ℃以下、24 時間の処理による pH 安定性は 4.2-7.0 であった。EDTA 存在下における反応速度の低下、その後の $CaCl_2$ 添加による反応速度の回復から BtAra97c はカルシウムイオン要求性を有することがわかった。α-ガラクトシド加水分解酵素である BtGH97b との基質特異性の比較を行い、BtGH97b は pNP β-L-Ara*p* および pNP α-Gal*p* に対する K_m、k_{cat} や k_{cat}/K_m 値はそれぞれ 15.9 mM、68.9 s^{-1}、4.36 $s^{-1}\cdot mM^{-1}$ および 0.313 mM、290 s^{-1}、927 $s^{-1}\cdot mM^{-1}$ であった。BtAra97c は BtGH97b と比べ pNP α-Gal*p* に対する親和性ならびに反応速度が低いことがわかった。現在、変異酵素を用いて BtAra97c と BtGH97b の基質特異性の違いに関わるアミノ酸残基の特定を行っている。

glycoside hydrolase, glycoside hydrolase family 97, ß-L-arabinopyranosidase

講演番号：3E32p06
講演日時、会場：3 月 28 日 15:05～ E 校舎 32 会場

分裂酵母を用いた *Aspergillus aculeatus* 由来ラムノガラクツロナーゼの生産と活性測定法の構築

Production of Rhamnogalacturonase from *Aspergillus aculeatus* in fission yeast

○間平 由梨佳、大橋 貴生、藤山 和仁（大阪大学生物工学国際交流センター）
○Yurika Mabira, Takao Ohashi, Kazuhito Fujiyama (Osaka univ. ICBiotech)

近年、植物細胞壁由来のセルロース系バイオマスを原料としたバイオ燃料が注目されている。バイオ燃料はセルロースを分解することで得られるグルコースを原料とし微生物を用いて醗酵生産されている。植物細胞壁由来のセルロースをセルラーゼにより分解する際にはセルラーゼがセルロースに接触する必要があるが、共存するペクチンなどの存在がそれを困難にしている。そのためペクチンを酵素により分解し除くことは効率的なバイオエタノール生産につながると考えられる。

ペクチンは植物細胞壁の主な構成成分の１つであり成長時に盛んに合成される一次細胞壁と細胞間隙に豊富に存在する。ペクチンはその物性およびその存在様式より細胞接着およびセルロース微小繊維間を充填する役割を果たしている酸性多糖である。ペクチンは、D-ガラクツロン酸がα-1,4 結合したポリガラクツロン酸を主骨格とするホモガラクツロナン、D-ガラクツロン酸と L-ラムノースの二糖繰り返し構造を主骨格に有するラムノガラクツロナン-I、ポリガラクツロン酸主鎖に複雑な構造を有する４つの側鎖がついたラムノガラクツロナン-II の 3 つに分類される。ペクチンはそのような複雑な構造をしているため分解には多くの酵素が関わっていると考えられている。そのうちの一つであるラムノガラクツロナーゼはラムノガラクツロナン-I の D-ガラクツロン酸と L-ラムノースとの結合に作用し還元末端にガラクツロン酸、非還元末端にラムノースを持つ断片を生じる。ラムノガラクツロナーゼ遺伝子は近年、糸状菌 *Aspergillus aculeatus* などで４つの報告があるのみであり、他のペクチン分解酵素に比べ報告例が少なく未解明な部分が多い。そこで本研究では組換えタンパク質宿主として産業使用が行われており、種々に有用宿主が開発されている分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* による生産をを行い、諸性質の解析を試みた。

分裂酵母の高発現遺伝子型コドン使用頻度に最適化した *A. aculeatus* 由来ラムノガラクツロナーゼ遺伝子を全合成し、分泌シグナルを分裂酵母高分泌型に置換した発現ベクターを構築した。発現ベクターを保持した形質転換体を用いて分泌生産させ、ウエスタンブロッティング法により培地中へのラムノガラクツロナーゼ生産を確認した。アゾ色素標識したラムノガラクツロナン-I を基質として用いて、活性測定を行ったところ、分解活性が検出され、活性を有するラムノガラクツロナーゼの生産に成功した。現在、得られた活性型組換えラムノガラクツロナーゼを用いて、基質特異性を含めた諸性質を解析している。

Rhamnogalacturonase, *Aspergillus aculeatus*, *Schizosaccharomyces pombe*

講演番号：3E32p07
講演日時、会場：3 月 28 日 15:16～ E 校舎 32 会場

植物細胞壁多糖ラムノガラクツロナン I 主鎖の生合成に関与する糖転移酵素の連携
Cooperation among glycosyltransferases involved in biosynthesis of rhamnogalacturonan I backbone polysaccharide
○上原 洋平、田村 峻佑、松本 直樹、石水 毅（立命館大生命）
○Yohei UEHARA, Syunsuke TAMURA, Naoki MATSUMOTO, Takeshi ISHIMIZU (Ritsumeikan Univ.)

【背景】植物細胞壁成分のペクチンは構造が複雑であり、その生合成には約 50 種類の糖転移酵素が関与していると考えられている。しかし、ペクチン生合成遺伝子に変異がある植物体の単離例が少なく、これらの酵素の遺伝子はほとんど同定されていない。そのため、ペクチン生合成に関わる糖転移酵素の活性測定法を構築し、遺伝子の同定を進める必要がある。ペクチン構成成分の一つ、ラムノガラクツロナン I の主鎖は、ラムノースとガラクツロン酸の二糖繰り返し構造の多糖である。本研究室ではラムノガラクツロナン I 主鎖のオリゴ糖を調製し、このオリゴ糖を伸長させるラムノース転移酵素(RhaT)の活性測定法を構築し、生化学的解析を行ってきた。本発表では、ラムノガラクツロナン I の主鎖の生合成に関わるもう一つの酵素、ガラクツロン酸転移酵素(GalAT)の活性測定法を構築したことと、これら 2 つの糖転移酵素の連携について報告する。
【方法・結果】アクセプター基質のラムノガラクツロナンオリゴ糖は、市販のラムノガラクツロナン I にドリセラーゼを作用させ、生成した各オリゴ糖を 2-アミノピリジンにより蛍光標識し、陰イオン交換クロマトグラフィーにより分離することで調製した。ドナー基質の UDP-ラムノース、UDP-ガラクツロン酸は、既報の合成法に従い調製した。これらを基質として、ペクチン合成が盛んなアズキ上胚軸のミクロソーム画分を酵素源に用いて、ラムノガラクツロナンオリゴ糖を伸長させる RhaT、GalAT の活性を検出する。これらの糖転移反応は、反応時間に依存して、酵素量に依存して、定量的に進行した。GalAT はアクセプター基質にラムノガラクツロナンオリゴ糖 6 糖を用いた場合、活性が非常に低く、8 糖以上の長さのオリゴ糖で高い活性を示した。RhaT の活性は、ドナー基質 UDP-Rha 存在下より、UDP-Rha と UDP-GalA 共存下の方が活性が高かった。これは RhaT と GalAT が連携し、ラムノガラクツロナン I 主鎖の多糖が効率的に生合成されていることを示唆している。また、アクセプター基質をラムノガラクツロナンオリゴ糖 7 糖とし、ドナー基質には UDP-Rha ならびに UDP-GalAT を用いてミクロソーム画分を酵素反応させたところ、RhaT ならびに GalAT による連続的な糖転移反応を観察した。これにより初めて、15 糖程度の比較的大きなラムノガラクツロナン I 主鎖を試験管内で合成することができた。

Plant cell wall, Pectin, Rhamnogalacturonan-I

講演番号：3E32p08
講演日時、会場：3 月 28 日 15:27～ E 校舎 32 会場

半身萎凋病菌 *Verticillium dahliae* 由来エンドプロセッシブ型キシログルカナーゼの酵素特性

Characterization of an endo-processive type xyloglucanase from *Verticillium dahliae*.

○佐藤 将太[1,2]、児島 薫[2]、吉田 孝[2] ([1]岩手大院連合農、[2]弘前大農学生命)
○Shota SATO[1,2], Kaoru KOJIMA[2], Takashi YOSHIDA[2] ([1]Iwate Univ., [2]Hirosaki Univ.)

【背景】キシログルカンは植物細胞壁に含まれるヘミセルロース多糖の一種である。キシログルカンの構造はβ-1,4 グルカンを主鎖とし、側鎖にα-1,6 結合のキシロース残基を持つ。我々はこれまでに、キシログルカンを特異的に分解する植物病原菌由来の酵素を探索し、*Verticillium dahliae* や *Fusarium* sp. が分泌するエンド型キシログルカナーゼの酵素化学的性質の解析を行ってきた。今回、新たに特徴的なキシログルカナーゼを *V. dahliae* の培養ろ液から精製し、酵素化学的特性を調べた。

【方法】菌株は、*V. dahliae* 2148 株を使用した。ポテトスクロース寒天培地にて *V. dahliae* 2148 株の前培養を行った後、キシログルカン含有 Czapek-Dox 液体培地に移植し、 30℃で 16 日間振とう培養を行った。培養上清を回収し、硫安塩析(80%飽和)、疎水性カラムクロマトグラフィー等により精製を行った。酵素活性はタマリンドキシログルカンを基質とし、生成した還元末端を Somogyi-Nelson 法により定量した。精製酵素をプロテインシーケンサーに供して N 末端アミノ酸配列分析を行い、 Verticillium ゲノムデータベースから本酵素が属する糖質加水分解酵素ファミリー(GH family)を推定した。また、分解産物のキシログルカンオリゴ糖をゲル濾過及び MALDI-TOF MS で分析し、酵素の分解様式を推定した。

【結果】カラムクロマトグラフィーにより精製酵素を得た。本酵素の分子量は SDS-PAGE より 76 kDa と求められた。N 末端アミノ酸配列を用いたホモロジー検索と基質特異性の結果から、本酵素は GH family 74 に属する xyloglucan-specific endo-β-1,4-glucanase であると結論した。分解産物のキシログルカンオリゴ糖の解析から、本酵素の分解様式は、エンド型で分解した後にエキソ型様の分解にシフトするエンド - プロセッシブ型であることが示唆された。

Verticillium, xyloglucanase, GH family 74

講演番号：3E32p09
講演日時、会場：3 月 28 日 15:38～ E 校舎 32 会場

Ruminiclostridium josui のゲノム情報に基づくキシラナーゼの解析
Analysis of *Ruminiclostridium josui* xylanases based on its genome information
織田 拓、粟冠 真紀子、木村 哲哉、○粟冠 和郎（三重大院生資）
Taku Orita, Makiko Sakka, Tetsuya Kimura, ○Kazuo Sakka (Mie Univ.)

Ruminiclostridium josui （旧名 *Clostridium josui*）はセルラーゼ複合体であるセルロソームを生成する嫌気性細菌である。今回、*R. josui* の全ゲノム配列が Joint Genome Institute（米国エネルギー省）により決定され、本菌が *Ruminiclostridium cellulolyticum* に非常に近縁な種であることが再確認された。しかしながら、*R. cellulolyticum* のゲノムが 1 つの環状 DNA（4,068,724 bp）からなるのに対し、*R. josui* のゲノムは 2 つの異なる環状の DNA（3,589,078 bp および 880,602 bp）からなることが判明した。いくつかの生育に必須な遺伝子が小型 DNA にコードされていることから、小型 DNA はプラスミドではなくゲノムの一部であると判断した。セルラーゼやキシラナーゼなどの多くの糖質分解酵素は、大小両方のゲノム DNA 上にコードされていたが、既に知られていた骨格タンパク質 CipA の遺伝子を含むセルラーゼ遺伝子クラスターは、小型ゲノム DNA 上に存在していた。また、複数のヘミセルラーゼをコードする遺伝子クラスターが大型ゲノム DNA 上に見いだされた。全ゲノム配列から、glycoside hydrolase のファミリーにあたる酵素は 65 個見つかり、他にもリアーゼ(43 個)やエステラーゼ(42 個)も多く見られた。ドックリンを含むセルロソームに関係するモジュラー酵素の遺伝子は 67 個発見された。

この情報を基に、セルロソームを構成する骨格タンパク質遺伝子（*cipA*）、セルラーゼ遺伝子（*cel5B*）、キシラナーゼ遺伝子（*xyn10B, xyn10C, xyn11A*）を pET-28a プラスミドベクターを用いて大腸菌 BL21(DE3)で発現させた。これらの酵素を組み合わせや比率を変えて、骨格タンパク質とともに複合体化し、いろいろな基質に対する分解活性を解析した。セルラーゼ(Cel5B)は単独では天然基質に対して活性を示さなかったが、キシラナーゼ(Xyn10B, Xyn10C, Xyn11A)と組み合わせると活性が見られた。また骨格タンパク質に結合させて複合体化させた方が、遊離の状態よりも高い活性を示した。

細菌ゲノムが２つ以上の DNA に分かれているのは比較的珍しいため、パルスフィールドゲル電気泳動で２つのゲノム DNA を分離することを試みている。また、*R. josui* の培養上清に分泌されるセルロソームや遊離の糖質分解酵素などセルロースに吸着するタンパク質のプロテオーム解析を行う予定である。

Clostridium josui, cellulosome, xylanase

講演番号：3E32p10
講演日時、会場：3 月 28 日 15:49～ E 校舎 32 会場

Aspergillus fumigatus TH7-1 株の有する xylanase 遺伝子の発現における pH の影響
Effect of ambient pHs on the expression of xylanase genes from *Aspergillus fumigatus* TH7-1
○高橋 結[1]、榎本 洋平[2]、若井 嘉人[3]、古田 正美[3]、村上 周一郎[1]([1]明治大農・農化、[2]明治大院農・農化、[3]鳥羽水族館)
○Yui TAKAHASHI[1], Yohei ENOMOTO[2], Yoshihito WAKAI[3], Masami HURUTA[3], Shuichiro MURAKAMI[1] ([1]Fac. of Agriculture, Meiji Univ., [2]School of Agriculture, Meiji Univ., [3]Toba aquarium)

【目的】
微生物における酵素の生産は、外環境の影響を受けることが知られている。当研究室においてアオウミガメの糞から分離された *Aspergillus fumigatus* TH7-1 株は、7 種の xylanase 遺伝子（*xynA*－*xynG*）を有しており、本菌株を 1.0%の xylan 培地（pH 7.0）で培養した際、培養経過に伴い xylanase 活性に変化が見られることや、生産される xylanase の種類が異なることが見出されている[1)]。さらに、その時の培養上清の pH が大きく変化することから、xylanase 活性の発現に培地の pH が影響していることが予想される。そこで本研究では、xylanase 遺伝子の発現に対する pH の影響を明らかにするために、種々の pH 条件下で菌体をインキュベートしたときの各 xylanase 遺伝子の発現量を比較し、培養上清中の xylanase 活性の推移を調べることとした。
【方法・結果】
PGY 培地で培養した *A. fumigatus* TH7-1 株の菌糸体を回収し、pH 緩衝能を持たせた 1.0% xylan 培地（pH 3.0、4.0、5.5、7.0）に移した。好気的に 3 時間インキュベートした後に、菌体および培養上清を回収した。得られた菌体から total RNA を調製し、qRT-PCR により *xynA*－*xynG* の発現量を定量した。その結果、酸性条件下でインキュベータした場合、全ての xylanase 遺伝子（*xynA*－*xynG*）において発現量が増加する傾向が見られ、その中でも *xynE* の発現量はどの pH 条件下においても高かった。また、各遺伝子において中性（pH 7.0）および酸性（pH 3.0、pH 4.0）条件下における発現量を比較した場合、*xynA* および *xynD* の発現量が酸性側で著しく増加することが分かった。一方、各 pH に対する応答が小さかった遺伝子は *xynE* および *xynF* であり、これらの中性条件下における遺伝子の発現量は、他の遺伝子と比較して高かった。以上の結果から、7 種の xylanase 遺伝子のうち複数種の遺伝子が pH の変化に応じて発現量が変動することが示唆された。回収した培養上清については、xylanase 活性を測定した。その結果、中性よりも xylanase 発現量が多い酸性側でインキュベートした試料において、同酵素活性が高かった。

1）榎本ら：日本農芸化学会 2014 年度大会要旨集 p.1339

Aspergillus fumigatus, xylanase, pH-responce

講演番号：3E32p11
講演日時、会場：3 月 28 日 16:10～ E 校舎 32 会場

Teratosphaeria acidotherma AIU BGA-1 が産生するアルカリ性β-ガラクトシダーゼの性質
Characterization of alkalophilic β-galactosidase from *Teratosphaeria acidotherma* AIU BGA-1
○千葉 瀬里奈、山田 美和、礒部 公安（岩手大農）
○Serina CHIBA, Miwa YAMADA, Kimiyasu ISOBE (Iwate Univ.)

【目的】我々は、高温酸性温泉地から分離した *Teratosphaeria acidotherma* AIU BGA-1 が、菌体内に 3 種類の酸性 β-ガラクトシダーゼと1種類のアルカリ性 β-ガラクトシダーゼを産生することを見出し、2 種類の酸性β-ガラクトシダーゼについては既に精製し、諸性質を報告してきた[1,2]。本研究では、アルカリ性領域で高い活性を示す酵素を精製し、諸性質を明らかにした。
【方法】本菌は 2%ラクトース含有培地（pH 5.0）で 30ºC，2 日間培養した。粗酵素液は 120 g の湿菌体をマルチビーズショッカーで破砕して調製した。酵素は、イオン交換や疎水性クロマトグラフィーなど4種類のカラムクロマトグラフィーを組み合わせて精製した。酵素活性は、2-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside (2-NPG) を基質とし、pH 8.5 で 37ºC、30 分間反応した後、Na_2CO_3 を添加して反応を停止し、420 nm の吸光度値から遊離の 2-nitrophenol 量を求めて算出した。
【結果】本酵素は、4 種類のカラムクロマトグラフィーによって、電気泳動的に単一に精製できた。酵素は、分子質量 120 kDa の単量体と推定され、これまでに報告されているアルカリ性β-ガラクトシダーゼとは異なっていた。本酵素は 2-NPG（K_m=0.35 mM）、4-NPG（K_m=0.49 mM）に高い活性を示し、反応の最適 pH は 8.0 であり、pH 8.5、9.5 での最適温度はそれぞれ 60ºC、50ºC であった。また、本酵素を pH 7.0，8.5，10.0 で 37ºC、1 時間加温した場合、いずれの pH でも 75%以上の活性が残存していた。したがって、本酵素は、アルカリ領域で高い安定性と活性を示すことが明らかとなった。酵素活性は *N*-エチルマレイド、ヒドラジン、EDTA、Ni^{2+}、Cu^{2+}で阻害され、8-ヒドロキシキノリン、Mn^{2+}の添加により増加した。また、EDTA 処理後の酵素に Mn^{2+}を添加すると活性が回復したため、本酵素の活性には Mn^{2+}が関与していると考えられた。現在まで Mn^{2+}を有するアルカリ性β-ガラクトシダーゼは報告されていない。従って本研究では、複数のβ-ガラクトシダーゼを産生する菌から、中性からアルカリ性領域までの広い pH 範囲で安定であり、高い活性を有する新規β-ガラクトシダーゼを精製し、諸性質を明らかにできたといえる。

[1]Isobe, K., et al.: Acidophilic fungus, *Teratosphaeria acidotherma* AIU BGA-1, produces multiple forms of intracellular β-galactosidase, J. Biosci. Bioeng., 116, 171-174 (2013)
[2]Isobe, K,. et al.: Characterization of new β-galactosidase from acidophilic fungus, *Teratosphaeria acidotherma* AIU BGA-1, J. Biosci. Bioeng., 116, 293-297 (2013)

β-galactosidase, Lactase, *Teratosphaeria acidotherma*

講演番号：3E32p12
講演日時、会場：3 月 28 日 16:21～ E 校舎 32 会場

マツタケ由来β-xylosidase の精製と cDNA クローニング

Purification and cDNA cloning of β-xylosidase from *Tricholoma matsutake*

○亀井 健吾[1]、福田 泰久[1]、楠田 瑞穂[2]、寺下 隆夫[1]、白坂 憲章[1] ([1]近大農、[2]大阪府大)
○Kengo KAMEI[1], Yasuhisa FUKUTA[1], Mizuho KUSUDA[2], Takao TERASHITA[1], Norifumi SHIRASAKA[1] ([1]Kindai Univ., [2]Osaka Pref. Univ.)

【目的】：本研究室ではこれまでマツタケ(*Tricholoma matsutake*)の人工栽培法の確立に向け、マツタケの生産する糖質分解酵素系について検討を行っており、マツタケが比較的強いα-アミラーゼ、β-グルコシダーゼ活性を有することを明らかにしてきた。一方、きのこの生産する酵素としては、ラッカーゼ、ペルオキシダーゼ、セルラーゼなどが挙げられるが、その他にも共通に確認されている糖質分解系酵素としてヘミセルラーゼがあり、マツタケがヘミセルロースを分解、利用できる能力を有すれば、ヘミセルロースを新たな生育炭素源として利用することができる。本研究ではマツタケのヘミセルロース利用能について検討し、デンプン分解活性と同程度のキシラン分解活性が確認されたため、キシラン分解酵素を精製すると共に、N 末端アミノ酸配列の解析、遺伝子クローニングについても検討した。

【方法および結果】:供試菌株には *T. matsutake* NBRC30605 株を用いた。マツタケ改変液体培地を 100ml フラスコに 20ml 分注したものを 100 本、60 日間 24℃明所で静置培養を行った。その後、吸引ろ過により培養液を回収後、70%硫安塩析を行なったものを粗酵素液とし、酵素精製に供した。基質には 1% xylan を用い、30 分 55℃で反応させ、遊離した還元糖を DNS 法を用いて測定した。精製は DEAE650M カラムクロマトグラフィー、Butyl650M カラムクロマトグラフィー、限外ろ過(10 万 cut)、Superdex200 ゲルろ過カラムクロマトグラフィーを用い、単一の酵素を精製した。SDS-PAGE およびゲルろ過によって 88.1kDa のモノマー酵素であることを確認した。精製酵素の N 末端配列解析を行なったところ、配列は L-V-T-F-P-D-C-C-N-G-P-L-K-N であり、ForestGEN *T. matsutake* ゲノムアノテーションシステム上における AUGUSTUS01_g19658 遺伝子(β-xylosidase 様酵素タンパク)と 100%配列が一致した。本塩基配列を基に、設計したプライマーを用いて、cDNA クローニングを行い、現在本遺伝子の異種遺伝子発現条件を検討している。

Tricholoma matsutake, Xylosidase, cDNA cloning

講演番号：3E32p13
講演日時、会場：3 月 28 日 16:32～ E 校舎 32 会場

Streptomyces olivaceoviridis 及び *Talaromyces trachyspermus* 由来 GH3 キシロシダーゼの特性解析

Characterization of two GH3 xylosidases from *Streptomyces olivaceoviridis* and *Talaromyces trachyspermus*.

○前原 智子[1]、紙野 圭[2]、金子 哲[1] ([1]農研機構 食品総合研究所、[2]製品評価技術基盤機構)
○Tomoko MAEHARA[1], Kei KAMINO[2], Satoshi KANEKO[1] ([1]NARO NFRI, [2]NBRC)

【背景】

食料と競合しないリグノセルロースは、バイオマスエネルギーの原料として注目されている。
我々は、このリグノセルロース中に約 20%程度含まれているヘミセルロースをうまく利用していくことが、将来の効率的なバイオマス利用の鍵となると考えている。
本研究では、キシラン分解酵素の一つである糖加水分解酵素ファミリー3 に属するキシロシダーゼについて、詳細な知見を得るために酵素の特性解析を行った。

【方法・結果】

Streptomyces olivaceoviridis E86 株、及び *Talaromyces trachyspermus* B168 株のゲノム配列を解析した結果、GH3 キシロシダーゼと予想される配列を見出し、両遺伝子のクローニングを行った。このうち *T. trachyspermus* B168 の GH3 キシロシダーゼは 5'側の配列情報が不明であったことから、5'RACE 法にて 5'末端配列を決定した。*S. olivaceoviridis* 由来 GH3 キシロシダーゼ(SoGH3)は、*Escherichia coli* BL21(DE3)株を用いて過剰発現させ、Ni-NTA agarose カラムによる精製を行った。
一方、*T. trachyspermus* 由来 GH3 キシロシダーゼ(TtGH3)は、*Pichia pastoris* KM71H 株を宿主としてその発現を行い、Q sepharose カラムおよび superose12 カラムを用いて精製を行った。酵素反応の至適は、SoGH3 で pH 6.5, 50℃、TtGH3 では pH3.5, 65℃にあり、両酵素共 PNP-α-D-xylopyranoside に対する高い分解活性を示すと共に、PNP-α-L-arabinofuranoside に対し弱いながらも活性を持つことが明らかとなった。
現在、バクテリアと菌類という由来の異なる SoGH3 と TtGH3 の性質を詳細に比較するため、酵素反応速度やアラビノキシロオリゴ糖を用いた分解活性等の検討を行っている。

Xylosidase, Glycoside hydrolase family 3, hemicellulose degradation

講演番号：3E32p14
講演日時、会場：3 月 28 日 16:43～ E 校舎 32 会場

Aspergillus niger E-1 株の有する細胞壁結合型 β-xylosidase の解析

Analysis of cell wall-bound β-xylosidases from *Aspergillus niger* E-1

○井上 琴美、高橋 結、村上 周一郎（明治大農・農化）
○Kotomi INOUE, Yui TAKAHASHI, Shuichiro MURAKAMI (Dep. Agricultual Chemistry, School of Agriculture, Meiji Univ.)

【目的】これまでの研究で、ハイイロジェントルキツネザルの糞より分離した *Aspergillus niger* E-1 株において、細胞外画分に 1 つのβ-xylosidase（XlsIV）が発現していることが明らかとなった。[1)] そこで本研究では、細胞壁結合画分と細胞内画分を分離し、本菌におけるβ-xylosidase の局在性を確認することを目的とした。

【方法】0.5% xylan を炭素源とする培地（pH 5.5）を用い、48 時間、および 96 時間培養し細胞外画分と菌糸体を回収した。菌糸体を Yatalase で 2 時間処理し、得られた遠心上清を細胞壁結合画分、またその菌糸体をミルミキサーにより破砕した後の遠心上清を細胞内画分として、β-xylosidase 活性を測定した。次に、48 時間培養して得られた細胞壁結合画分を透析し、DEAE-sepharose により酵素を分析した。得られたβ-xylosidase 活性のピーク画分を SDS-PAGE に供し、得られたバンドに対して MALDI-TOF-MS 分析を行い、タンパク質を同定した。

【結果】細胞外画分中のβ-xylosidase 活性は、培養経過に伴って上昇したにも関わらず、細胞壁結合画分での同酵素活性は培養 96 時間よりも 48 時間の方が高かった。一方、細胞内画分においては有意な活性が見られなかった。そこで 48 時間培養して得られた細胞壁結合画分を DEAE-sepharose カラムクロマトグラフィーで分析したところ、β-xylosidase 活性のピークは、細胞外画分で見出した XlsIV の溶出塩濃度と類似した位置で溶出された。また、SDS-PAGE による分析においても、XlsIV と類似した分子質量を示すタンパク質が見出された。さらにこのタンパク質を MALDI-TOF-MS 分析に供した結果、培養 48 時間の細胞壁結合画分で見出されたβ-xylosidase は、細胞外画分に存在する XlsIV と同じタンパク質であることが明らかになった。以上の結果から、本菌におけるβ-xylosidase XlsIV は培養初期では細胞壁に結合し、その後細胞外へと遊離することが示唆された。

1）井上ら、日本生物工学会 2014 年大会、大会公演要旨集、p. 69.

Aspergillus niger, xylosidase, cell wall-bound enzyme

講演番号：3E32p15
講演日時、会場：3 月 28 日 16:54～ E 校舎 32 会場

ヒトミルクオリゴ糖の酵素合成に向けた高効率 1,2-α-L-フコシンターゼの作出

Generation of highly efficient 1,2-α-L-fucosynthase towards enzymatic synthesis of human milk oligosaccharides

○杉山 友太[1]、後藤 愛那[1]、本多 裕司[1]、吉田 永吏奈[1]、栗原 新[1]、北岡 本光[2]、山本 憲二[1]、片山 高嶺[1] ([1]石川県大、[2]農研機構・食総研)

○Yuta SUGIYAMA[1], Aina GOTOH[1], Yuji HONDA[1], Erina YOSHIDA[1], Shin KURIHARA[1], Motomitsu KITAOKA[2], Kenji YAMAMOTO[1], Takane KATAYAMA[1] ([1]Ishikawa Pref. Univ., [2]NARO)

人乳にはラクトース・脂質に次ぐ成分として重合度 3 以上のオリゴ糖(ヒトミルクオリゴ糖)が 10～20 g/L 程度含まれており、現在までに 100 以上の分子種が単離報告されているが、その主成分は 2'-フコシルラクトース・ラクト-*N*-テトラオース・ラクト-*N*-フコペンタース I・ラクト-*N*-ジフコヘキサオース I であることが知られている（非分泌型個体は除く)。これらのオリゴ糖は、母乳栄養児の腸管におけるビフィズスフローラの形成作用や病原性細菌の感染防御作用など有用な生理機能を有しているためその大量合成法の確立が望まれているが、立体・位置選択的なグリコシド結合の形成は酵素法においても化学法においても困難である場合が多く、その効率的な合成法がないのが現状である。中でも上記オリゴ糖に含まれる Fucα1-2Gal 結合の形成は化学法では最も困難なものの一つとされている。

我々は以前の研究において *Bifidobacterium bifidum* 由来のアノマー反転型 1,2-α-L-フコシダーゼ（AfcA）をグリコシンターゼ化することにより、β-フッ化フコース（β-FucF）とラクトース（Lac）から選択的に 2'-フコシルラクトース（2'-FL）のみを合成することに成功している。しかしながら、その収率はドナーであるβ -FucF に対して 6%程度であった。この低収率の原因は、β-FucF が水溶液中で不安定であることに加え、作製した変異体の合成活性が極めて低いことに由来する。そこで本研究では AfcA の活性中心に様々な変異を加えることで、より高い合成活性を有する 1,2-α-L-フコシンターゼの作出を試みた。

＜方法＞

AfcA の活性中心を形成する残基に様々な組み合わせでアミノ酸置換を導入し、計 35 種の変異型酵素を作製した。組み換え酵素を精製し、β-FucF および Lac を基質として生成される 2'-FL 量を HPLC で測定し、各変異体の 1,2-α-L-フコシンターゼ活性を測定した。

＜結果と考察＞

β-FucF に対する収率が 80% を超える 2 種類の変異体を得ることに成功した。それら酵素の至適反応条件を検討した後、アクセプターの特異性を検討したところ、ラクトースのみならずラクト-*N*-テトラオースにも作用することが明らかとなった。これらの結果は、本変異体がフコシル化ヒトミルクオリゴ糖を合成するのに有用な酵素であることを示唆している。本講演では、以上の結果について報告する。

fucosynthase, human milk oligosaccharides, 2'-fucosyllactose

講演番号：3E32p16
講演日時、会場：3 月 28 日 17:15～ E 校舎 32 会場

植物α1,3/4-フコシダーゼの精製と基質特異性の解析
Purification and analysis of substrate specificity of plant α1,3/4-fucosidase
前田 恵[1,2]、○板野 紗月[1]、木村 吉伸[1,2] ([1]岡山大学農学部、[2]岡山大学大学院環境生命科学研究科)
MEGUMI MAEDA[1,2], ○SATSUKI ITANO[1], YOSHINOBU KIMURA[1,2] ([1]Fac. Agr., Okayama Univ, [2]Grad. Sch., Environ. Life Sci., Okayama Univ)

【目的】植物糖タンパク質には，トリマンノシルコア構造にα1, 3-フコース（Fuc）残基とβ1, 2-キシロース（Xyl）残基が結合した複合型 *N*-グリカンが結合する場合が多い。特に，分泌型糖タンパク質には，それらの非還元末端側にルイス a 抗原（Galβ1-3[Fucα1-4]GlcNAcβ1-）を有する *N*-グリカンが特徴的に見られる。植物複合型 *N*-グリカンはホ乳動物に対して抗原性を示すことが知られているものの，植物における生理機能については未だ明らかにされていない。本研究では，植物複合型 *N*-グリカンの生理機能解明研究の一環として，それらの代謝分解に関与するα-フコシダーゼ（α-Fuc'ase）に注目し，貯蔵糖タンパク質の殆どが植物複合型 *N*-グリカンを有する銀杏種子からのα-Fuc'ase 精製，基質特異性解析，タンパク質構造解析を試みた。

【方法・結果】銀杏 (*Ginkgo biloba*) 種子（2.8 kg）をアセトン脱脂し，脱脂粉末（1.3 kg）を 0.2 M NaCl を含んだ 20 mM Tris-HCl 緩衝液（pH8.0）で懸濁し粗酵素液を抽出した。粗酵素液から各種クロマトグラフィ（イオン交換，疎水クロマト，ゲルろ過，ヒドロキシアパタイト）によりα-Fuc'ase の精製を行った。活性測定は，基質としてルイス a 抗原を有する PA 化糖鎖
（$Gal_2Fuc_2GlcNAc_2Man_3Xyl_1Fuc_1GlcNAc_2$-PA）を用い，SF-HPLC により生成物を検出した。精製した銀杏種子由来α-Fuc'ase（α-Fuc'ase Gb）は，分子量 130 kDa（ゲルろ過）であり，至適温度は 60℃，至適 pH は 5.5 であった。α-Fuc'ase Gb は，*p*NP-α-Fuc 及びα1, 2-Fuc 残基には活性を示さず，α1,4-Fuc 残基を有するルイス a 抗原ユニット及びα1,3-Fuc 残基を有する Lacto-*N*-fucopentaose には活性を示した。また，α1,3-Fuc 残基を有する植物複合型 *N*-グリカンについては，$Man_3Xyl_1Fuc_1GlcNAc_2$-PA，$Man_1Xyl_1Fuc_1GlcNAc_2$-PA，$Man_1Fuc_1GlcNAc_2$-PA には活性を示さなかったが，非還元末端側の立体障害が小さい $Fuc_1GlcNAc_2$-PA 及び $Fuc_1GlcNAc_1$-PA に活性を示した。既に報告したイネα1,3/4-Fuc'ase (α1,3/4-Fuc'ase Os) [1]は，(1) 分子量 58 kDa のモノマー構造であること，(2) $Fuc_1GlcNAc_2$-PA (GlcNAcβ1-4(Fucα1-3)GlcNAc-PA)に対して酵素活性を示さなかったことから，今回得られたα1,3/4-Fuc'ase Gb は α1,3/4-Fuc'ase Os とは異なる分子種であると考えられた。
[1] 藤重 誠，前田恵，木村吉伸　第 31 回 日本糖質学会年会　講演要旨集 p187 (2012).

α-Fucosidase, plant glycosidase, plant *N*-glycan

講演番号：3E32p17
講演日時、会場：3 月 28 日 17:26～ E 校舎 32 会場

Molecular cloning and gene expression of α1,3/4-Fucosidase from *Solanum lycopersicum*

○Md. Ziaur RAHMAN, Megumi MAEDA, Yoshinobu KIMURA (Grad. Sch., Environ. Life Sci., Okayama Univ.)

It has been believed that the *N*- and *0*- linked glycans on glycoproteins play numerous important roles related to plant growth and development, although the detail molecular mechanisms of which has been poorly understood. Plant α1,3/4-Fuc'ase belong to GH29 family and is one of the important glycosidases involved in degradation of plant complex type *N*-glycans with β-1,2 xylosyl residue and α-1,3 fucosyl residue on the tri-mannosyl core, but the molecular identification and expression analysis of α-1,3/4-Fuc'ase during fruit development has not been elucidated. In tomato (Solanum lycopersicum) fruit, to date, three putative α-1,3/4-Fuc'ase genes (Solyc03g006980, Solyc08g062280 and Solyc11g069010) have been reported. At present, none of these functions in vivo has been elucidated.

The N-terminal amino acid sequence of OS (*Oryza sativa*) α1,3/4-Fuc'ase identified by our group [1] was aligned with three tomato α-1,3/4-Fuc'ase and found the identical region of 5 amino acids with Solyc03g006980, although the gene expression level was higher in Solyc11g069010. Based on this information, therefore, we have cloned the putative α-1,3/4-Fuc'ase genes, Solyc03g006980, and have expressed recombinant protein with Hisx6 tag at the C-terminal in insect cells, Sf9, to analyze bio-molecular properties. The encoded protein of this gene is a single polypeptide chain of 485 amino acids with apparent molecular mass of 55 kDa. The recombinant α-Fuc'ase showed the highest activity at pH 5.0 as being similar to OS α1,3/4-Fuc'ase. The substrate specificities showed that the recombinant α-Fuc'ase hydrolyzes α-1,3/4 fucose residue(s) from the plant complex type *N*-glycan harboring Lewis a determinant(s), whereas neither α-1,2-linked fucose nor fucose in α-1,3-linkage to the innermost GlcNAc residue were attacked. Thus, it is very reasonable that the expression of Solyc03g006980 could be involved in the turnover of complex type *N*-glycan affects in tomato fruit maturation or ripening.

[1]藤重 誠，前田恵，木村吉伸　第 31 回 日本糖質学会年会　講演要旨集 p187 (2012).

plant complex type *N*-glycans, α1,3/4-Fucosidase, insect cells

講演番号：3E32p18
講演日時、会場：3 月 28 日 17:37～ E 校舎 32 会場

酸性 PNGase ダブルノックアウト *A. thaliana* 植物体の構築

Generation of double-knockout *A. thaliana* plant lacking acidic peptide: *N*-glycanase

○秋山 剛[1]、前田 恵[1]、藤山 和仁[2]、木村 吉伸[1] ([1]岡大院・環境生命、[2]阪大・生物工学国際交流セ)
○Tsuyoshi AKIYAMA[1], Megumi MAEDA[1], Kazuhito FUJIYAMA[2], Yoshinobu KIMURA[1] ([1]Grad. Sch., Environ. Life Sci., Okayama Univ., [2]Int. Cent., Biotech., Osaka Univ.)

【背景・目的】植物組織にはマイクロモル濃度の遊離アスパラギン結合型糖鎖 (free *N*-glycans, FNGs) が存在している。FNGs には還元末端に GlcNAc を 1 残基有する GN1 タイプ（GN1-FNGs）と *N*-アセチルキトビオースを有する GN2 タイプ（GN2-FNGs）の 2 種類が存在し，それぞれ Endo-β-*N*-acetylglucosaminidase (ENGase) と Peptide: *N*-glycanase (PNGase) により生成すると考えられる。我々は，植物の分化や生長に関わる FNGs の生理機能解明研究の一環として *A. thaliana* の 2 つの ENGase 遺伝子 (At3g11040, At5g05460) を破壊することにより，完全に ENGase 活性をノックアウトした変異体を作成した。その結果，表現型に変化は認められず，GN1-FNGs は完全消失したが，GN2-FNGs ($Man_nGlcNAc_2$)が検出された [1]。そこで本研究では，FNGs の産生に関わる全ての酵素遺伝子をノックアウトした植物体構築を最終目標とし，まず植物に特徴的な酸性 PNGase (aPNGase) 推定遺伝子 (At3g14920, At5g05480) をノックアウトした *A. thaliana* 植物体について FNGs の構造解析と酵素活性測定を行うことを目的とした。

【方法及び結果】 aPNGase 遺伝子の *At3g14920* は，我々が既に同定したトマト aPNGase (aPNGase-Le) 遺伝子と強い相同性を示した[2]。2 種の aPNGase 遺伝子をそれぞれノックアウトした *A. thaliana* 変異株を用いて，ゲルろ過，アフィニティークロマトグラフィー，RP-HPLC で FNGs を精製した後，糖鎖マッピング，ESI-MS，酵素消化により構造解析を行った。また，卵黄糖ペプチドを基質として用い，遊離した FNGs を定量することで aPNGase 活性測定を行った。FNGs 構造解析の結果，野生株で検出された $GlcNAc_1Man_3Xyl_1Fuc_1GlcNAc_2$ (GN1M3FX)と $GlcNAc_2Man_3Xyl_1Fuc_1GlcNAc_2$ (GN2M3FX) が，*At3g14920* シングルノックアウト株と *At5g05480* シングルノックアウト株からも検出された。また，どちらのノックアウト株からも aPNGase 活性が検出された。このことから，植物複合型 FNGs を完全に消失させるためには両方の遺伝子の欠損が必要であると考えられた。現在 2 つの aPNGase 遺伝子を欠損したダブルノックアウト *A. thaliana* 植物体の構築を進めている。一方，これら 2 つの推定 aPNGase について局在解析を行うため，2 種の推定 aPNGase 遺伝子に GFP 遺伝子を組み込んだキメラ遺伝子を構築しタバコ BY2 培養細胞で発現させる準備中である。

[1] Kimura, Y., *et al., Biosci. Biotechnol. Biochem*. (2011), **74**, 1019-1021.
[2] Hossain, A., *et al., J. Biochem*. (2010), **147**, 157-165.

acidic peptide:*N*-glycanase (aPNGase), Free *N*-glycans (FNGs), *Arabidopsis thaliana*

講演番号：3E32p19
講演日時、会場：3 月 28 日 17:48～ E 校舎 32 会場

酸性ペプチド *N*-グリカナーゼのトマト果実における遺伝子発現解析

Genes expression analysis of acidic peptide: *N*-glycanase in tomato fruits

前田 恵[2]、○藤川 真奈[1]、木村 吉伸[2] ([1]岡山大学マッチングプログラムコース、[2]岡山大学大学院環境生命科学研究科)
MEGUMI MAEDA[2], ○MANA FUJIKAWA[1], YOSHINOBU KIMURA[2] ([1]Matching Program Course, Okayama Univ., [2]Grad. Sch., Environ. Life Sci., Okayama Univ.)

【目的】分化生長中の植物組織には, 糖タンパク質から切り離された遊離型 *N*-グリカン（free *N*-glycans, FNGs）がμM で存在しており，ホルモン様活性を有する可能性が推定されているが，生化学的・分子生物学的見地からの立証がなされていない。我々は，FNGs の生理機能解明研究の一環として，これまでにモデル植物としてトマトを用い，トマト果実中に存在する FNGs の構造解析や糖鎖代謝関連酵素の精製及び遺伝子同定を行っており，還元末端に GlcNAc を 1 残基有する GN1 タイプの FNGs が果実熟成と共に増加することを明らかにしている[1]。一方で，還元末端にキトビオースを有する GN2 タイプの FNGs（GN2-FNGs）は検出されているものの，果実熟成との関連性は未だ明らかにされていない。また，糖タンパク質の代謝機構において糖ペプチドから GN2-FNGs の遊離に関与している酸性 Peptide: *N*-glycanase (aPNGase)についても，推定遺伝子 6 つのうち 1 つが *aPNGase-Le* [2]として同定されているに過ぎない。そこで本研究では，GN2-FNGs の果実熟成における生理的意義を解明する研究の一端として，トマト aPNGase 候補遺伝子全てについてのクローニングを行うとともに，*aPNGase* 遺伝子の発現組織（葉，果実など）の同定，熟成段階の異なる果実における発現解析を試みた。
【方法・結果】遺伝子同定と発現系構築を完了した aPNGase-Le の塩基配列を基に Sol genomic network (solgenomics.net) にて相同性検索を行い，5 つのトマト *aPNGase 遺*伝子情報を得た。トマト果実および実生から RNA を抽出し，cDNA を合成後，それぞれの遺伝子に特異的なプライマーを用いて PCR を行った。TA クローニング後，DNA シークエンスにより DNA 配列決定を行った。クローニングの結果，既報の aPNGase-Le に加えて新たに 2 つの *aPNGase* 遺伝子（Solyc03g095850, Solyc06g051010）を同定することができた。これら 3 つの *aPNGase* 遺伝子については RT-PCR により果実における発現を確認できた。残り 3 つの遺伝子については，果実，実生いずれについても発現を確認することが出来ず，その他の組織（葉や根など）で発現解析を行う必要性が考えられた。現在，発現が確認できた遺伝子 3 つについて熟成段階の異なるトマト果実（Green, Pink, Red）における発現解析をリアルタイム RT-PCR により行っている。また, 今回クローニングした遺伝子産物の酵素活性を解析するために，C 末端に His タグを付加した組換えタンパク質の昆虫細胞による発現系構築を進めているので，合わせて報告する。

[1] Nakamura, K., *et al. Biosci. Biotechnol. Biochem*., **72** 2936-2945 (2008)
[2] Hossain, Md. A., e*t al. J.Biochem.,* 147, 157-165 (2010)

acidic peptide: *N*-glycanase, free *N*-glycan, tomato fruits ripening

講演番号：3D12a02
講演日時、会場：3 月 28 日 09:11～ D 校舎 12 会場

ミトコンドリア呼吸鎖複合体 I に対する脳 PET プローブ BCPP-EF の結合部位の解析

Analysis of the binding site for brain PET probe, BCPP-EF, on mitochondrial respiratory chain complex I

○風見 紗弥香[1]、西山 新吾[2]、木村 祐史[1]、伊藤 博康[1]、塚田 秀夫[2]([1]浜松ホトニクス（株）中研 筑波研究室、[2]浜松ホトニクス（株）中研 PET センター)
○Sayaka KAZAMI[1], Shingo NISHIYAMA[2], Yuji KIMURA[1], Hiroyasu ITOH[1], Hideo TSUKADA[2] ([1]HAMAMATSU PHOTONICS K.K. Tsukuba Research Lab., [2]HAMAMATSU PHOTONICS K.K. Central Research Lab. PET Center)

【背景・目的】Positron Emission Tomography（PET）イメージングは放射性標識した化合物（PET プローブ）を生体に投与し、その蓄積をモニタリングする手法であり、化合物が特異的に標的分子と結合することを利用している。我々は脳神経変性疾患の早期発見や治療効果の判定に有効な PET プローブとして[^{18}F]BCPP-EF を開発し、生体脳の PET イメージングにおいて炎症および正常領域を判別可能であることを報告した。[^{18}F]BCPP-EF はミトコンドリア複合体 I（MC-I）および微小管重合の阻害剤であるロテノンと競合することから、解糖系の亢進している炎症細胞と正常細胞で差異の見られる MC-I が標的分子の１つであることが示唆されていた。我々は昨年度の本学会にて、精製したミトコンドリア呼吸鎖複合体を用いた作用解析から BCPP-EF が MC-I の選択的阻害剤であることを報告した（2A05p07)。今年度は MC-I の定量解析を目指した PET プローブとして特異性を明らかにする目的で、BCPP-EF の MC-I 上の結合部位および微小管重合への作用について研究を行った。
【方法・結果】BCPP-EF の MC-I 上の結合部位を明らかにするために、我々はブタ心臓から調製したミトコンドリア内膜の反転膜小胞 sub-mitochondrial particles（SMP）を用いて、MC-I によるプロトン輸送の詳細な解析を行った。SMP の膜中に存在する MC-I は NADH を基質として特異的に活性化され、coenzyme Q_{10}（CoQ_{10}）への電子伝達と共役して SMP 内へプロトンを輸送する。NADH、coenzyme Q_1（CoQ_1、CoQ_{10}親水化アナログ）およびロテノン存在下において BCPP-EF による MC-I のプロトン輸送活性阻害を詳細に解析した結果、BCPP-EF は NADH および CoQ_1 に対して非拮抗阻害、ロテノンに対して拮抗阻害を示すことが明らかとなった。よって、BCPP-EF の MC-I 上の結合部位はロテノンと同様であり、CoQ_{10}への電子伝達を阻害することで MC-I のプロトン輸送を阻害するメカニズムが明らかとなった。一方、BCPP-EF による微小管重合への作用を明らかにするために、我々はヒト子宮頸がん細胞 HeLa を用いて、細胞内の間期微小管および分裂期紡錘体の形態変化を観察した。既存の微小管重合阻害剤であるコルヒチンおよびロテノンを処理した細胞では微小管の脱重合および紡錘体の消失が観察されたが、BCPP-EF を処理した細胞では微小管および紡錘体の形態変化は観察されなかった。よって、BCPP-EF はロテノンとは異なり、微小管重合を阻害しないことが示唆された。
【結論】BCPP-EF は 1)高い親和性で MC-I のロテノン結合部位に結合して MC-I を選択的に阻害、2) 細胞内微小管重合を阻害しない、3)生体への投与量は *in vitro* の MC-I 阻害濃度よりもはるかに低い、ことから、脳内 MC-I を定量解析するための PET プローブとして有用であることが示唆された。

mitochondrial complex I, microtubule, positron emission tomography

講演番号：3D12a03
講演日時、会場：3 月 28 日 09:22～ D 校舎 12 会場

糖結合性天然物 Pradimicin A のフコース結合解析

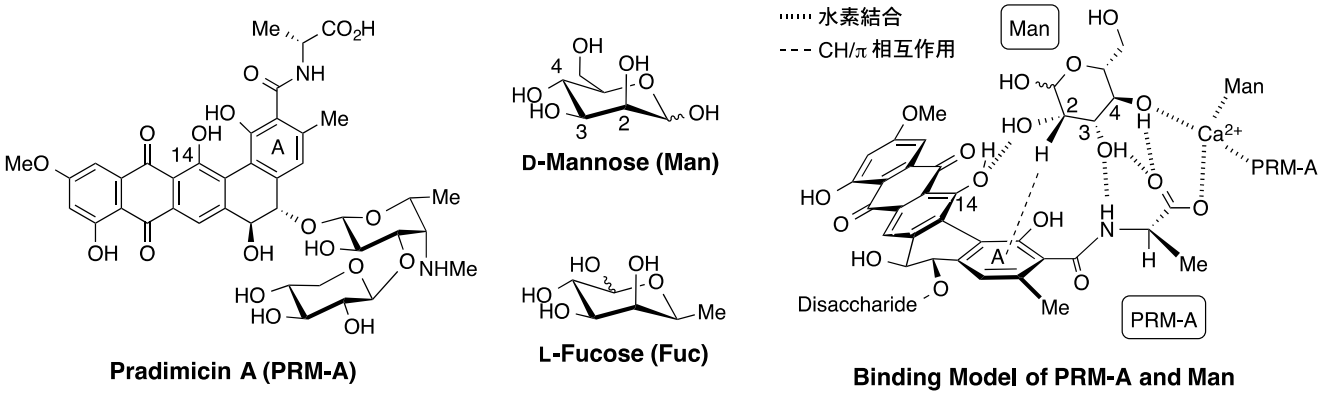
Fucose-binding analysis of pradimicin A, a sugar-binding natural product

○渡邉 泰典[1]、中川 優[1,2]、五十嵐 康弘[3]、伊藤 幸成[2]、小鹿 一[1] ([1]名大院・生命農、[2]理研、[3]富山県大・生工)

○Yasunori WATANABE[1], Yu NAKAGAWA[1,2], Yasuhiro IGARASHI[3], Yukishige ITO[2], Makoto OJIKA[1] ([1]Nagoya Univ., [2]RIKEN, [3]Toyama Prefectural Univ.)

【目的】 Pradimicin A (PRM-A) は，Ca^{2+} 存在下で D-マンノース (Man) を認識するユニークな天然低分子化合物である．我々は，PRM-A と Man との複合体の固体 NMR 解析と Man 誘導体を用いた結合試験により，PRM-A が Man の 2, 3, 4 位水酸基を認識していることを明らかにしている [1,2]．しかしながら，L-フコース (Fuc) は Man の 2, 3, 4 位の水酸基の立体配置を模倣できるにも関わらず，PRM-A とは結合しない [3]．そこで本研究では，methyl fucopyranoside (Fuc-OMe) を用いた結合試験を行い，PRM-A が Fuc と結合しない要因を明らかにすることを目的とした．

【方法および結果】 PRM-A は Ca^{2+} 存在下で凝集し，この PRM-A/Ca^{2+} 凝集体が Man を特異的に取り込む．取り込まれた Man 量は，凝集体を酸処理して分解後，^{1}H-NMR を測定することによりプロトンシグナルの積分値から PRM-A に対するモル比として定量することができる．この共沈殿試験を利用して Fuc および Fuc-OMe に対する結合試験を行ったところ，Fuc は PRM-A/Ca^{2+} 凝集体に全く取り込まれなかったに対し，Fuc-OMe は Man と比べると取り込み量は少なかったものの，顕著に PRM-A と結合することが確認された．一方，高濃度の Ca^{2+} 存在下で同様の結合試験を行なったところ，Man のみが取り込まれ，Fuc および Fuc-OMe はいずれも全く取り込まれなかった．Fuc は 1 位水酸基を介して Ca^{2+} と複合体を形成することが報告されていることから [4]，これらの結果は，Fuc が Ca^{2+} と複合体を形成することによって PRM-A と結合しなくなっていることを示唆している．



(1) Nakagawa, Y. *et al. J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 17485. (2) Nakagawa, Y. *et al. Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 10516. (3) Ueki, T. *et al. Antibiot.* **1993**, *46*, 465. (4) Cook, W. J. *et al. Biochim. Biophys. Acta* **1975**, *389*, 428.

carbohydrate recognition, fucose, pradimicin

講演番号：3D12a04
講演日時、会場：3 月 28 日 09:33～ D 校舎 12 会場

Santonin-related compound 2 inhibits non-canonical NF-κB signaling pathway induced by lymphotoxin ß

○Hue Tu QUACH[1], Ryuichi TAMURA[1], Shinsei SAYAMA[2], Wanxia TANG[3], Masayoshi ANDO[3], Takao KATAOKA[1] ([1]Dept. Appl. Biol., Kyoto Inst. Tech., [2]Dept. Nat. Sci. (Chem.), Fukushima Med. Univ., [3]Dept. Chem. Chem. Eng., Niigata Univ.)

The nuclear factor κ B (NF-κ B) family of transcription factors plays an essential role in various biological processes, including inflammation, innate immunity and cell survival. The NF-κ B transcription factors are activated by two distinct pathways: the classical (canonical) pathway and the alternative (non-canonical) pathway. The RelA/p50 dimer is predominantly involved in the canonical NF-κ B signaling pathway, while the RelB/p52 dimer is responsible for the non-canonical NF-κ B signaling pathway. Upon stimulation with cytokines, such as lymphotoxin β (LT-β), p100 is processed into p52 in the cytosol, and the RelB/p52 dimer is translocated to the nucleus. A number of sesquiterpene lactones have been reported to inhibit the canonical NF-κ B signaling pathway. We have recently synthesized a series of eudesmane-type sesquiterpene lactones possessing an α-methylene γ-lactone group and/or an α-bromo ketone group, and revealed that eudesmane-type α-methylene γ-lactones and α-bromo ketones inhibit multiple steps in the canonical NF-κ B signaling pathway induced by tumor necrosis factor α (TNF-α) or interleukin-1 α. In particular, (11*S*)-2 α-bromo-3-oxoeudesmano-12,6 α-lactone, designated as santonin-related compound 2 (SRC2), inhibits the nuclear translocation of RelA by targeting cysteine 38 in the TNF-α-induced canonical NF-κ B signaling pathway. However, the biological activity of SRC2 on the non-canonical NF-κ B signaling pathway remained unclear. In this study, we investigated the molecular mechanism by which SRC2 inhibits the non-canonical NF-κ B signaling pathway. LT-$\alpha_1\beta_2$ was able to induce NF-κ B activation in human lung adenocarcinoma A549 cells. A549 cells were pretreated with SRC2 for 1 h, and then stimulated with LT-$\alpha_1\beta_2$ for 1 to 4 h. SRC2 inhibited the LT-$\alpha_1\beta_2$-induced NF-κ B-responsive luciferase reporter activity. We also found that SRC2 blocks the LT-$\alpha_1\beta_2$-induced nuclear translocation of RelB and p52 without inhibiting the processing of p100 to p52. These results suggest that SRC2 blocks the nuclear translocation of the RelB/p52 dimer in the non-canonical NF-κ B signaling pathway induced by LT-$\alpha_1\beta_2$.

NF-κB, lymphotoxin-ß, sesquiterpene lactone

講演番号：3D12a05
講演日時、会場：3 月 28 日 09:44～ D 校舎 12 会場

Thapsigargin は細胞接着因子 ICAM-1 の糖鎖修飾に作用する
Thapsigargin affects glycosylation of intercellular adhesion molecule-1

○横井川 純平、片岡 孝夫（京都工繊大院・応生）
○Junpei YOKOIGAWA, Takao KATAOKA (Dept.Appl.Biol.,Kyoto Inst.Tech.)

【目的】Thapsigargin は小胞体膜上に存在する Ca^{2+}-ATPase の特異的阻害剤であり、細胞質への Ca^{2+} の流出と小胞体中の Ca^{2+}の枯渇を促進し、小胞体ストレス誘導剤として広く用いられている。これまでに、thapsigargin は細胞接着因子 intercellular adhesion molecule-1（ICAM-1）を含む糖タンパク質の発現量を抑制することが報告されている。我々は、ヒト肺がん腫 A549 細胞において、thapsigargin が ICAM-1 の発現量ではなく、ICAM-1 の翻訳後修飾に大きく影響することを見出した。本研究では、N 結合型糖鎖を有する ICAM-1 の発現量及び翻訳後修飾に対する thapsigargin の作用機序について検討した。
【方法】ヒト肺がん腫 A549 細胞を thapsigargin で 1 時間前処理した後、炎症性サイトカインであるインターロイキン 1 によって刺激し、ICAM-1 の発現を誘導した。細胞表面の ICAM-1 の発現量を Cell ELISA 法を用いて測定した。A549 細胞から調製し細胞ライゼートを用いて、ICAM-1 の発現量と分子量変化をウェスタンブロッティングによって解析した。N 結合型糖鎖の切断には、peptide-*N*-glycosidase F（PNGase F）と endoglycosidase H（Endo H）を用いた。さらに、A549 細胞から調製した RNA を用いて、逆転写反応と PCR を行い、XBP1 mRNA のスプライシングを解析した。
【結果】 Cell ELISA 法によって、thapsigargin が細胞表面の ICAM-1 発現を部分的に阻害することを見出した。一方、ウェスタンブロッティングによって、thapsigargin が ICAM-1 の発現量を阻害しないが、ICAM-1 の分子量を顕著に低下させることを見出した。さらに、PNGase F と Endo H で処理すると、コントロールの A549 細胞では、ほとんどの ICAM-1 が Endo H 耐性を示したが、thapsigargin で処理した A549 細胞では、Endo H 耐性及び EndoH 感受性の ICAM-1 が検出された。一方、thapsigargin は、ICAM-1 の糖鎖修飾に作用する濃度で、XBP1 mRNA のスプライシングを誘導した。そこで、小胞体ストレスを誘導する tunicamycin、2-deoxy-D-glucose、dithiothreitol、及びカルシウムイオノフォアである ionomycin を用いて ICAM-1 の糖鎖修飾に対する影響を検討した。その結果、これらの化合物による ICAM-1 の分子量の変化は thapsigargin による ICAM-1 の分子量の変化と異なることが明らかになった。以上の結果から、thapsigargin は小胞体内の Ca^{2+}を枯渇させることによって、ICAM-1 の糖鎖修飾や細胞内輸送に作用することが示唆された。

thapsigargin, ICAM-1, glycosylation

講演番号：3D12a06
講演日時、会場：3 月 28 日 10:05～ D 校舎 12 会場

中国産食用茸ツブイボタケ（*Thelephora vialis*）含有 *p*-terphenyl 化合物の脱 SUMO 化酵素 SENP1 に対する阻害活性

Inhibitory Effect of *p*-terphenyl compounds, Isolated from *Thelephora vialis*, against SUMO-specific Protease 1 (SENP1) Activity

○菅谷 紘一、並木 大輔、吉岡 泰淳、牧内 麻緒、金田 紗耶香、煙山 紀子、小野瀬 淳一、阿部 尚樹（東農大・応生・食品安全健康）
○ Kouichi SUGAYA, Daisuke NAMIKI, Yasukiyo YOSHIOKA, Mao MAKIUCHI, Sayaka KANETA, Noriko KEMURIYAMA, Jun-ichi ONOSE, Naoki ABE (Dep. of Nutri. sci., and Food Saf., Faculty of Applied Bio Science, Tokyo Univ. of Agri)

【目的】
我々はこれまでに中国産食用茸ツブイボタケ(*Thelephora vialis*) 含有 *p*-terphenyl 化合物 vialinin A がヒト好塩基球系 KU-812 細胞に対して TNF-αの放出抑制活性を有することを明らかにしてきた。Vialinin A は RBL-2H3 細胞において TNF-αの産生と放出を 2 段階で阻害することが示唆されており、分子プローブを用いた標的分子の探索により見出した vialinin A 標的分子 USP5 の酵素活性阻害が産生阻害に関与することが強く示唆されている。しかし放出阻害の作用機序はまだ明らかとなっていない。近年、分泌小胞のエキソサイトーシスに関与する分子が SUMO 化及び脱 SUMO 化により制御されることが報告されていることから、本研究では、TNF−α放出制御も SUMO 化及び脱 SUMO 化を行う酵素の 1 種である SENP1 に対する vialinin A の酵素阻害活性を検討することとした。
【方法・結果】
SENP1 阻害活性は、蛍光基質 SUMO1-AMC を用いて SENP1 酵素阻害活性を測定し、IC_{50} 及び、阻害活性(Ki)を求めることにより評価した。市販されているヒト SENP1 触媒ドメイン(cSENP1)に対する vialinin A の効果を検討したところ、IC_{50}（1.89 μM）及び、Ki（1.30 μM）ともに低濃度で阻害活性を示すことが認められた。SENP1 は細胞内では完全長の状態で存在することから、完全長の SENP1 に対する効果を検討するため、大腸菌を用いてヒト組み換え体完全長 SENP1(full-length SENP1)を作製した。Full SENP1 に対する vialinin A の IC_{50} は、cSENP1 と同様に強力な阻害活性を示した。
【結論】
TNF-αの放出は SUMO 化・脱 SUMO 化を介するエキソサイトーシスに関連していることが予想されることから、cSENP1 と大腸菌で産生させた完全長の脱 SUMO 化酵素 SENP1 に対する vialinin A の阻害効果を検討したところ、cSENP1 と同程度の阻害活性を示した。現在、vialinin A を含む *p*-terphenyl 化合物による Ki についての評価を行い、*p*-terphenyl 化合物による SENP1 の阻害特性の検討を行っている。

p-terphenyl, SUMO, SENP1

講演番号：3D12a07
講演日時、会場：3 月 28 日 10:16～ D 校舎 12 会場

3,6-Epidioxy-1,10-bisaboladiene による酸化的ストレス誘導性ネクローシス

3,6-Epidioxy-1,10-bisaboladiene induces necrotic cell death by oxidative stress

○高野 侑恵[1]、上杉 祥太[2]、室井 誠[3]、土屋 英子[4]、長田 裕之[3]、木村 賢一[1,2] ([1]岩手大院・農、[2]岩手大院・連合農、[3]理研 CSRS・ケミカルバイオロジー、[4]広島大院・先端物質)
○Yukie TAKANO[1], Shota UESUGI[2], Makoto MUROI[3], Eiko TSUCHIYA[4], Hiroyuki OSADA[3], Ken-ichi KIMURA[1,2] ([1]Grad. Sch. of Agri., Iwate Univ., [2]Uni. Grad. Sch. of Agri. Sci., Iwate Univ., [3]RIKEN CSRS, Chemical Biology, [4]Grad. Sch. Adv. Sci. Matt., Hiroshima Univ.)

【目的】抗マラリア薬の artemisinin 類は分子内に endoperoxide 構造を有しており、抗がん活性およびアポトーシス誘導作用が報告されている。我々は、遺伝子変異酵母（*cdc2-1 rad9*Δ）株の生育回復活性を指標としたスクリーニング系[1)]を用いて、同じく endoperoxide 構造を有する 3,6-epidioxy-1,10-bisaboladiene（EDBD）を山菜のシドケから見出した[2)]。このスクリーニング系は抗がん物質の取得が期待されるものであり、実際に、EDBD はヒト急性前骨髄性白血病細胞 HL60 に対して細胞毒性を示し、アポトーシスの特徴である caspase の活性化を引き起こすということを報告してきた[3)]。一方で、顕微鏡観察では EDBD 処理した HL60 の細胞死形態はネクローシス様のものが多く認められ、その細胞毒性は酸化的ストレス誘導性ネクローシスの特異的阻害剤 IM-54 によって抑制された。そこで、本研究では EDBD によるネクローシス様細胞死について検討することを目的とした。
【方法・結果】EDBD が実際にネクローシスを引き起こしているかを調べるために、ネクローシス誘導時に見られる細胞膜の破綻の指標となる propidium iodide（PI）染色を用いて検討を行った。その結果、PI positive な細胞が EDBD の濃度依存的に増加しており、EDBD が HL60 細胞に対してネクローシスを引き起こしていることが示唆された。また、HeLa 細胞でのプロテオーム解析では、酸化ストレスによって発現誘導されることが知られる小胞体やミトコンドリアの分子シャペロン（ERp29、GRP78/BiP、HSP60 など）が増加していた。酸化ストレスによるネクローシスの誘導には、脂質過酸化が関与していることが知られている。そこで、共に脂質過酸化阻害作用を有する脂溶性抗酸化剤 vitamin E、およびフェロトーシス阻害剤 ferrostatin-1 の EDBD による HL60 細胞の細胞毒性に与える影響を調べたところ、顕微鏡観察で確認されるネクローシス様の形態を示す細胞が減少し、MTT assay における細胞生存率も回復した。さらに、過酸化脂質の特異的な蛍光プローブである Liperfluo を用いて、EDBD による脂質過酸化誘導作用を調べたところ、10 μM EDBD によって control 細胞よりも強い蛍光を示す細胞が増加していた。一方で、同じ endoperoxide 構造を有する dihydroartemisinin では、同様のネクローシス誘導は起こらなかった。以上のことより、EDBD は HL60 細胞に対して酸化ストレスならびに脂質過酸化を引き起こすことでネクローシスを誘導していると考えられる。

1) E. Tsuchiya, *et al*., *Biosci. Biotechnol. Biochem*., **74**, 411-414 (2010)
2) K. Nishikawa, *et al*., *Biosci. Biotechnol. Biochem*., **72**, 2463-2466 (2008)
3) K. Kimura, *et al*., *Bioorg. Med. Chem*., **20**, 3887-3897 (2012)

endoperoxide, necrotic cell death, lipid peroxidation

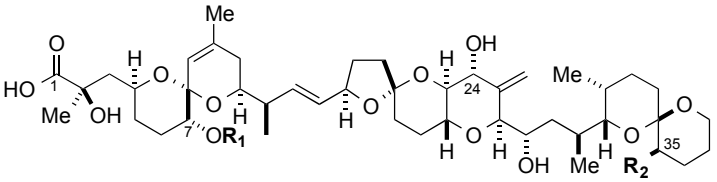
講演番号：3D12a08
講演日時、会場：3 月 28 日 10:27～ D 校舎 12 会場

ホタテガイ中で進行する下痢性貝毒オカダ酸の構造変換および変換酵素の単離を目指すケミカルバイオロジー

Chemical biology for isolation of enzyme that catalyze acylation of diarrhetic shellfish toxin, okadaic acid, in the scallop *Patinopecten yessoensis*

○古用 幸愛、小野田 竜也、長 由扶子、山下 まり、此木 敬一（東北大農）
○Sachie FURUMOCHI, Tatsuya ONODA, Yuko CHO, Mari YOTSU-YAMASHITA, Keiichi KONOKI (Tohoku Univ.)

【背景】クロイソカイメンより単離されたオカダ酸（Okadaic acid, OA）は下痢性貝毒の主要原因毒であり、強力な発がんプロモーション活性を示す。有毒渦鞭毛藻によって生産された OA 並びにその類縁体であるディノフィシストキシン１（Dinophysistoxin 1, DTX1）は二枚貝の中腸腺に蓄積され、その一部は７位ヒドロキシ基がアシル化された誘導体（DTX3）へと変換される。OA はタンパク質脱リン酸化酵素 PP1 および PP2A に対する特異的阻害剤であるが、DTX3 は PP1、PP2A に対する結合性を示さないため、本変換反応の生理的意義に興味が持たれる。我々はこの変換酵素の単離を目的とし、活性測定法の開発を目指したので、その結果を報告する。



【方法・結果】ホタテガイの中腸腺より得られるミクロソーム画分を OA、ATP、Palmitoyl CoA とインキュベートし（*In vitro* 変換反応）、Multiple Reaction Monitoring (MRM) Negative Ion Mode で LC-MS/MS 測定を行ったところ、7-*O*-Palmitoyl OA (DTX3) の生成が確認された。この手法を用いた変換酵素の精製を目指し、活性画分の分画を試みた結果、本変換酵素が膜タンパク質であることがわかった。膜タンパク質の精製に不可欠となる界面活性剤は LC-MS/MS 分析の感度低下を起こすため、LC-MS/MS に替わる新たな活性測定法の確立が求められた。変換生成物（DTX3）を蛍光性誘導体として検出することで本活性の追跡が可能であると考えられるため、末端に共役ジエンやアルキンを有する脂肪酸の CoA エステルを化学合成し、*In vitro* 変換反応に用いた。両 CoA エステルは該当する飽和脂肪酸の CoA エステルと同程度の収率で DTX3 を与えることがわかった。続いて、各 DTX3 を蛍光性ジエノフィル（DMEQ-TEMD）または蛍光性アジド（Azide-fluor 488）と処理し、蛍光性誘導体へ変換した。現在、この新規な酵素活性測定法の有用性を確かめている。

【参考文献】

Konoki, K., Onoda, T., Watanabe, R., Cho, Y., Kaga, S., Suzuki, T., Yotsu-Yamashita, M., *Mar. Drugs* **2013**, *11*, 300-315.

diarrhetic shellfish toxin, okadaic acid, chemical biology

講演番号：3D12a09
講演日時、会場：3 月 28 日 10:38～ D 校舎 12 会場

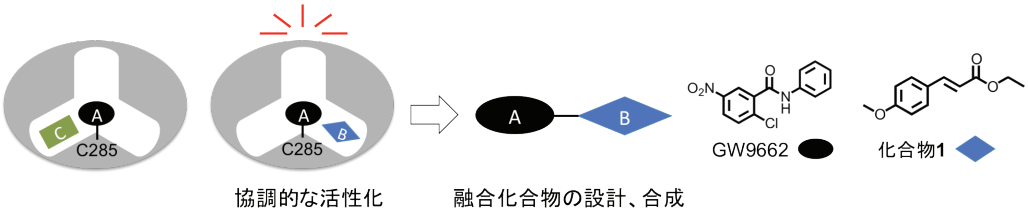
リガンド結合ポケットの特性に基づく新規共有結合性 PPARγアゴニストの創製

Development of novel covalent PPARγ agonists by natural product-based fragment linking approach

○宮前 友策[1]、大寺 杏奈[1]、吉田 光多郎[1]、秋田 徹[2]、前嶋 一宏[2]、垣塚 彰[1]、入江 一浩[3]、増田 誠司[1]、神戸 大朋[1]、永尾 雅哉[1] ([1]京大院生命、[2]日本新薬、[3]京大院農)
○Yusaku Miyamae[1], Anna Ohtera[1], Kotaro Yoshida[1], Tohru Akita[2], Kazuhiro Maejima[2], Akira Kakizuka[1], Kazuhiro Irie[3], Seiji Masuda[1], Taiho Kambe[1], Masaya Nagao[1] ([1]Kyoto Univ. Biol., [2]Nippon Shinyaku, [3]Kyoto Univ. Agric.)

糖や脂質代謝に重要な役割を果たす核内受容体 PPARγは、リガンド依存的な転写因子である。そのリガンド結合ポケット (LBP) は大きく、複数のリガンドが同時に結合し、協調的に活性化を示すというユニークな特性を有する。我々はこの特性を利用し、協調して活性化を示す２つの化合物の組合せを見出し、両者の構造を融合させたリガンドを設計、合成するというストラテジーを考案した（下図)。合成標的は、副作用低減の可能性や Cys285 残基を標的とする活性化機構のユニークさから、近年、注目を集めている共有結合性アゴニストに着目し、共有結合性官能基には、不可逆的アンタゴニストである GW9662 を用いることとした。本研究は、GW9662 と協調して PPARγを活性化するパートナーリガンドの同定、ならびに両者を融合させたハイブリッドリガンドの合成を目的とした。

スクリーニングは、GAL4-UAS システムを用いたルシフェラーゼレポーターアッセイにおいて、GW9662 と共処理時にのみ活性が増加することを指標とした。本アッセイ系を用いて植物抽出物ライブラリーより探索を行った結果、食用植物であるバンウコンの根茎抽出物が GW9662 との協調的活性化を示すことを見出し、パートナーリガンドとして、２種のケイヒ酸誘導体 **1** 及び **2** を単離、同定した (日本農芸化学会 2014 年度大会 2A05a03)。GW9662 及び化合物 **1** による協調的活性化は、Cys285 残基の Ala あるいは Ser 置換体により顕著に減少した。また、GW9662 の塩素原子を消失した非共有結合性 GW9662 類縁体では活性が見られなかったことから、両化合物による協調的活性化は Cys285 残基への共有結合により生じていることが強く示唆された。次にドッキングスタディにより GW9662 存在下での化合物 **1** の推定結合部位の解析を行ったところ、チアゾリジン等の従来のリガンドが結合する AF-2 ポケットではなく、Ω-ポケットに結合することが強く示唆された。この推定結合様式に基づき、GW9662 及び化合物 **1** の芳香環同士を連結させたハイブリッド型リガンドを設計、合成した。合成したハイブリッドリガンドは、EC50 値が 3.1 nM と高い活性を示し、Cys285 残基の変異により活性が消失した。興味深いことに、本化合物を分化後の 3T3-L1 脂肪細胞に処理した結果、未処理や、チアゾリジン処理に比べ、顕著に脂肪蓄積が抑制された。このことはチアゾリジンで懸念されていた体重増加などの副作用を低減できる可能性を示唆しており、現在、糖尿病モデルマウスにおいて効果が顕れるか検証している。



PPARγ agonist, fragment-based approach, covalent agonist

講演番号：3D12a10
講演日時、会場：3 月 28 日 10:49～ D 校舎 12 会場

糖鎖を介した新規翻訳後修飾プロセスの探索 ： ヒト細胞中の β -アロシダーゼ活性を有する酵素の同定

Screening of novel post translational modification through a glycan processing: Identification of the enzyme with β-allosidase activity in human cells

○三浦 一輝[1]、田中 綾子[2]、袴田 航[1,2]、平野 貴子[2]、西尾 俊幸[1,2] ([1]日大院生資科、[2]日大生資科・生命化)

○kazuki MIURA[1], ayako TANAKA[2], wataru HAKAMATA[1,2], takako HIRANO[2], toshiyuki NISHIO[1,2] ([1]Graduate School of Bioresource Sciences, Nihon Univ., [2]Chem. and Life Sci., College of Bioresource Sciences. Nihon Univ.)

【目的】タンパク質の翻訳後修飾は真核生物で普遍的に行われ、様々なタンパク質の翻訳後修飾が存在することが知られている。その中でも、糖鎖を介したタンパク質の翻訳後修飾はタンパク質の品質管理などに重要な役割を果たしている。また近年、これらの糖鎖修飾が様々な疾病と密接な関わりがあることが数多く報告されている。しかし、糖鎖修飾に関与する酵素については充分に解明されているとは言えない。そこで、これまでに我々は新規な細胞内糖鎖修飾酵素を見出すため蛍光基質を設計・合成し(図 1)、ヒト培養細胞において新規糖鎖修飾酵素の探索を行なった、その結果、これまでの糖鎖修飾過程では報告されていない新規な β-アロシダーゼ活性をゴルジ体に確認した [1)]。そこで、光アフィニティーラベル法を用いて本酵素を同定し、新たなタンパク質糖鎖修飾プロセスの解明を行うことを本研究の目的とした。

【方法と結果】ゴルジ体に局在する β–アロシダーゼ活性を持つ酵素の同定は、光アフィニティーラベル法を用いたプルダウンアッセイにより行うこととした。光アフィニティープローブの分子設計は、前述基質と類似性が高く酵素により加水分解されない構造とし合成を行なった(図 2)。本プローブと前述基質の標的酵素が同一であるか確認するために、本プローブによる標的酵素の阻害を測定した。阻害活性は蛍光基質とともに本プローブをヒト培養細胞へ投与し、蛍光強度の減少により確認した。

次に、本酵素を単離するために本プローブを HeLa 細胞へ投与し、UV により本プローブと標的タンパク質をクロスリンクさせた後、セルライセートを作製し、クリック反応により光ラベル化タンパク質にのみビオチンを導入した。得られたビオチン化タンパク質をアフィニティークロマトグラフィーにより精製した。得られたサンプルのストレプトアビジン-HRP によるウエスタンブロッティングおよび銀染色を行い、4 つの分子量の異なるビオチン標識化タンパク質を得た。現在は質量分析によってタンパク質の同定を試みている。また、ヒト細胞内に存在する β-グリコシダーゼのうちゴルジ体に局在するものは β-ガラクトシダーゼ (60 kDa) のみであり、本実験で得られたビオチン標識化タンパク質のうち 1 つが分子量約 60 kDa だったことから、ゴルジ体の β-アロシダーゼ活性は、β-ガラクトシダーゼの基質特異性の幅広さに基づくものであると推定した。今後はゴルジ体に局在する β-ガラクトシダーゼ活性および β-アロシダーゼ活性の機能について検討を行う予定である。

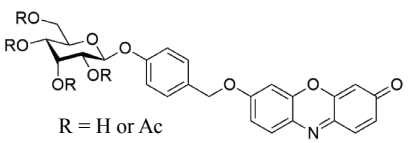


図 1 赤色蛍光基質の構造

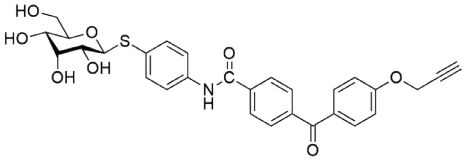


図 2 光アフィニティープローブの構造

1) Hakamata W., Kazuki M. et al., *Bioorg. Med. Chem.*, 2014, *in press*

glycan processing, photolabeling, allose

講演番号：3D12a11
講演日時、会場：3 月 28 日 11:10～ D 校舎 12 会場

precocene II による ROS 産生を介したトリコテセン生産の阻害機構

Molecular mechanism of precocene II for inhibiting trichothecene production *via* ROS generation

○古川 智宏、鈴木 道生、作田 庄平（東大院農生科）
○Tomohiro FURUKAWA, Michio SUZUKI, Shohei SAKUDA (The Univ. of Tokyo)

【目的】カビの生産する有毒二次代謝産物であるマイコトキシンによる農作物の汚染は、世界中で甚大な健康および経済被害をもたらしている。中でも、*Fusarium graminearum* の生産するトリコテセンの一種、デオキシニバレノール(DON)による穀類の汚染は、その汚染量の面からとりわけ深刻な問題である。耐性菌の蔓延を引き起こす懸念の少ない選択的生産阻害剤の利用が汚染防除に有用であると考えられ、当研究室は DON 生産阻害剤として precocene II を見出した。precocene II は DON 生産菌の生育を阻害せず、DON 生産を IC_{50} 1.2 μM の低濃度で阻害する。これまでの研究で、precocene II の結合タンパク質がミトコンドリア外膜に存在するチャネルタンパク質である voltage-dependent anion channel (VDAC)であることを見出し、VDAC が細胞内のスーパーオキシド量の調節に関与するとの報告から、precocene II により活性酸素種(ROS)が増加することが示唆されている(古川ら、2014 年度大会)。precocene II の作用機序の解明は、より有用な DON 汚染防除法の開発に貢献できると考えられる。そこで本研究では、precocene II が *F. graminearum* に及ぼす作用をより詳細に解析するとともに、ROS と DON 生産の関係を調べることとした。

【方法および結果】*F. graminearum* の培養は DON のアセチル化体である 3-ADON の生産液体培地で行った。ミトコンドリアおよび細胞質基質のスーパーオキシドをそれぞれ特異的に検出する 2 種類の蛍光試薬を用いた観察から、スーパーオキシド発生試薬であるパラコートは菌体の両区画のスーパーオキシドを増加させる一方、precocene II は主にミトコンドリア内のスーパーオキシドを増加させることがわかった。また、precocene II によりタンパク質のカルボニル化および脂質の過酸化が促進された。さらに、パラコートおよびメナジオンが 3-ADON の生産を抑制する一方、ROS の除去に関与する抗酸化剤であるα-トコフェロール、アスコルビン酸、グルタチオンは 3-ADON の生産を増加させ、precocene II の効果を打ち消すことがわかった。以上から、precocene II により増加した ROS がミトコンドリアの状態異常をもたらすことで 3-ADON 生産が阻害されることが示唆され、抗酸化剤は ROS の作用を減じることで 3-ADON 生産を増加させると考えられた。

謝辞
本研究は農林水産省委託プロジェクト研究「カビ毒の動態解明と産生低減技術の開発(カビ毒動態)」として行われているものである。

trichothecene, precocene II, ROS

講演番号：3D12a12
講演日時、会場：3 月 28 日 11:21～ D 校舎 12 会場

β-tubulin におけるアミノ酸置換が L-2.5-dihydrophenylalanine の抗真菌活性に及ぼす影響
Effect of amino acid substitutions in beta-tubulin on antifungal activity of L-2.5-dihydrophenylalanine
○塩見 涼[1]、中尾 有里[1]、荻田 亮[1,2]、藤田 憲一[1]、田中 俊雄[1] ([1]阪市大院・理、[2]阪市大・健康・研セ)
○Ryo Shiomi[1], Yuri Nakao[1], Akira Ogita[1,2], Ken-ichi Fujita[1], Toshio Tanaka[1] ([1]Grad. Sch. Sci., Osaka City Univ., [2]Res. Center. Urban Health and Sports. Osaka City Univ.)

L-2.5-Dihydrophenylalanine（DHPA）は、本研究室で分離された放線菌 *Streptmyces* sp.548-07 株が生産するフェニルアラニン類縁体である。DHPA は日和見感染性真菌 *Aspergillus* 属菌に対して菌糸の分岐異常といった形態異常や微小管の消失を伴う抗真菌作用を示す。一方、本物質が出芽酵母 *Saccaromyces cerevisiae* に対して偽菌糸を誘導するという現象が新たに見いだされた。既知の微小管阻害剤はα-Tubulin、β-Tubulin の重合、脱重合過程を阻害するのに対して、DHPA は微小管を消失させることから、本物質は新たな作用点をもつ微小管阻害剤になりうると期待されるが、その一次作用点は不明である。*Aspergillus nidullans* のβ-tublin 変異株 benA33 は高温条件下で微小管が過度に安定し、その増殖が止まる。しかし、benA33 に DHPA などのフェニルアラニン類縁体を作用させると、生育が回復する。以上より、DHPA の一次作用点は、やはりβ-tublin タンパク質であるかもしれないと再考した。

本研究では、出芽酵母のβ-tubulin 遺伝子変異株に DHPA を作用させることによって、DHPA の標的がβ-tubulin 分子であるかどうかを検証することを目的としている。使用した株は、出芽酵母の代表的な親株である BY4741 の ABC トランスポーター13 遺伝子破壊株 dTC063 と、dTC063 のβ-tubulin 遺伝子に５つのアミノ酸置換が起こるように変異を導入することにより、ヒト微小管阻害剤に感受性となった dTC076-1 である。これら２つの株に、作用標的がわかっている微小管阻害剤や抗真菌薬と DHPA を作用させ、その感受性を比較した。その結果、dTC063 は真菌特異的な Thiabendazole にのみ感受性を示し、逆に、dTC076-1 はヒト微小管阻害剤 Paclitaxel,ColchicineThi に対してのみ感受性であることがわかった。DHPA は Thiabendazole と同じく真菌の本来のβ-tubulin 遺伝子をもつ dTC063 には生育阻害作用を示し、β-tubulin 遺伝子変異株である dTC076-1 の生育には影響を与えなかった。以上より、DHPA の作用標的は少なくとも dTC076-1 のβ-Tubulin におけるアミノ酸置換部位にあることが示唆された。

beta-tubulin, microtubule inhibitor, phenylalanine analogue

講演番号：3D12a13
講演日時、会場：3 月 28 日 11:32～ D 校舎 12 会場

セリ科植物から得られた GSK-3β阻害物質 falcarindiol の肝細胞における糖新生抑制作用

GSK-3β inhibitor falcarindiol isolated from Apiaceae suppresses gluconeogenesis in hepatoma cells.

○吉田 潤[1]、伊藤 芳明[2]、木村 賢一[2]([1]岩手医大・教養教育セ・化学、[2]岩手大・農)
○Jun YOSHIDA[1], Yoshiaki ITO[2], Ken-ichi KIMURA[2] ([1]Center Lib. Arts&Sci., Iwate Med. Univ., [2]Fac. of Agri., Iwate Univ.)

【目的】2 型糖尿病は慢性高血糖を特徴とする疾患群であり、世界的に患者数が急増していることからその治療・予防の研究開発は社会的要請が大きい。近年、新たな作用機序に基づく 2 型糖尿病予防・治療剤の有効成分として、グリコーゲンシンターゼキナーゼ-3β(GSK-3β)を阻害する物質が注目されている。我々はこれまでに、Ca^{2+}感受性の遺伝子変異酵母 YNS17 株を用いた薬剤スクリーニング系により植物天然資源から GSK-3β阻害物質を探索し、セリ科植物とウコギ科植物に主に含まれるポリアセチレン化合物の falcarindiol を活性物質として同定した。Falcarindiol は、GSK-3β活性を *in vitro* で基質拮抗的に阻害し、ラット肝がん由来細胞株 H4IIE において糖新生律速酵素 G6Pase の遺伝子発現を抑制した[1)]。これらの結果をもとに、本研究では falcarindiol の肝細胞の糖新生抑制効果を既存の GSK-3β阻害剤と比較し、その作用機序の特性を明らかにすることを目的とした。
【方法】細胞試験の falcarindiol 濃度は、検体処理後 24 時間培養し、MTT アッセイにより細胞生存率を対照群と比較し検討した。糖新生の抑制効果は、合成グルココルチコイドでグルコース産生を惹起した H4IIE 細胞にて測定した。H4IIE 細胞を 2×10^5 cells/well で 12-well プレートに播き、2 日間培養後に dexamethasone(Dex) 0.5 μM と Bt_2cAMP 100 μM を含む無血清 DMEM 培地に交換した。そこに、falcarindiol または各種 GSK-3β阻害剤を添加し 24 時間培養した。その後、ピルビン酸ナトリウム 2 mM と乳酸ナトリウム 20 mM を添加したグルコース・フェノールレッド不含培地に交換して 4 時間培養後、培地へのグルコース放出量を Amplex Red を用いたグルコースオキシダーゼ/ペルオキシダーゼ法で測定した。
【結果】Dex/Bt_2cAMP 処理した H4IIE 細胞の培地中へのグルコース放出量は、インスリン 10 nM で 90%程度抑制された。同条件下で falcarindiol の培地中へのグルコース放出量の抑制率は、溶媒対照群と比較して falcarindiol 10 μM で 22%、15 μM で 43%を示し、濃度依存的な有意差が認められた。Falcarindiol と阻害形式の異なる各種 GSK-3β阻害剤のグルコース放出量の抑制率を測定した結果、Mg^{2+}拮抗型の LiCl は 10 mM で 47%、ATP 拮抗型の BIO は 10 μM で 35%を示した。これらの結果から、falcarindiol はグルココルチコイド/cAMP で惹起される肝細胞のグルコース合成を抑制し、その活性は、酵素レベルで強力な GSK-3β阻害剤である BIO(IC_{50} = 5 nM)と同等の 10 μM で作用することが示唆された。

1) Yoshida, J., *et al.*, J. Agrc. Food Chem., 61(31), 7515-7521 (2013)

falcarindiol, GSK-3β, gluconeogenesis

講演番号：3D12a14
講演日時、会場：3 月 28 日 11:43～ D 校舎 12 会場

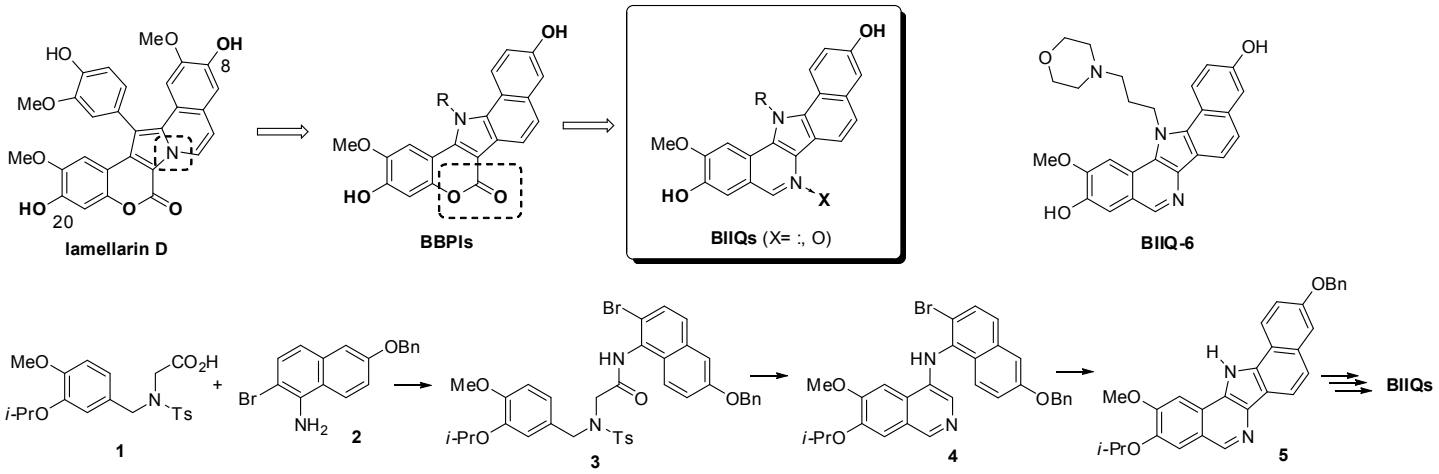
ラメラリンの構造変換による新規抗がん活性化合物 BIIQ の創製

Novel topoisomerase I inhibiting anticancer agents BIIQs based on marine alkaloids lamellarins

○石橋 郁人[1]、堺 貴愛[1]、岩尾 正倫[2] ([1]長崎大院・水産、[2]長崎大院・工)
○Fumito ISHIBASHI[1], Kie SAKAI[1], Masatomo IWAO[2] ([1]Graduate school of Fisheries Science and Environmental Studies, Nagasaki Univ., [2]Graduate School of Engineering, Nagasaki Univ.)

【目的】演者等は、強力な抗がん活性を有する海洋天然物ラメラリンのトポイソメラーゼ I 阻害作用機構に基づき、ベンゾベンゾピラノインドール-6-オン型の抗がん活性分子 BBPI を創製した。今回、BBPI のラクトン環部分を、より安定なピリジン環へと変換した 11*H*-ベンゾ[6、7]インドロイソキノリン型のラメラリンアナログ BIIQ 類を設計・合成し、トポイソメラーゼ I 阻害活性、ならびに培養がん細胞株に対する増殖阻害活性を調べた。

【方法・結果】BIIQ 類の合成は以下のように行った。*N*-ベンジルグリシン誘導体 **1** とナフチルアミン **2** から得られるアミド **3** を Bischler-Napieralski 型の縮合反応に付し、4-(ナフチルアミノ)イソキノリン **4** とした。次いでこのものの分子内 Heck 反応により BIIQ 骨格を構築し **5** とした。化合物 **5** のピロール窒素原子上に種々の置換基を導入することにより、一連の BIIQ 類を合成した。合成した BIIQ 類のトポイソメラーゼ I 阻害活性を調べた結果、BIIQ-1ox (X=O、 R=Me)、 BIIQ-2ox (X=O、 R=-$CH_2CH_2CH_2Cl$)、 BIIQ-3ox (X=O、 R = allyl)の *N*-オキシド体に強い阻害活性が見られたが、HeLa 細胞株に対しては、顕著な増殖阻害活性を示さなかった。一方、非オキシド体（X= : ）に関しては、ピロール窒素原子上の置換基が異なる 6 種の誘導体[R = Me、 2-(dimethylamino)ethyl、 allyl、 3-cholropropyl、 3-imidazoylpropyl、 3-morphorinopropyl、 3-[(4-piperidino)piperidinopropyl] をスクリーニングした結果、3-morphorinopropyl 体 BIIQ-6 にサブナノモーラーレベルの強い増殖阻害活性を見出した。



pyrrole alkaloid, topoisomerase I inhibition, anticancer agent

講演番号：3D12p01
講演日時、会場：3 月 28 日 14:00～ D 校舎 12 会場

アルコール添加による新規リベロマイシン誘導体の創製と生合成機構の考察

Creation of new reveromycin derivatives by alcohol-added fermentation

○野川 俊彦[1]、高橋 俊二[1,2]、高木 海[1]、関山 恭代[2]、岡野 亜紀子[1]、川谷 誠[2]、清水 猛[1]、長田 裕之[1,2] ([1]理研 CSRS、[2]理研・抗生物質)
○Toshihiko NOGAWA[1], Shunji TAKAHASHI[1,2], Hiroshi TAKAGI[1], Yasuyo SEKIYAMA[2], Akiko OKANO[1], Makoto KAWATANI[2], Takeshi SHIMIZU[1], Hiroyuki OSADA[1,2] ([1]RIKEN CSRS, [2]RIKEN Antibiotics lab)

【目的】リベロマイシン A は、6,6-スピロアセタール骨格を有する特徴的なポリケチド化合物であり、細胞増殖抑制作用を有する化合物として放線菌 *Streptomyces reveromyceticus* SN-593 より単離された。その活性からバイオプローブまたは医薬品のシード化合物として重要な化合物であり、その生合成機構の解明はより強力な活性を有する誘導体創製に向けて重要である。我々は、ポリケチド炭素骨格の生合成を検討する過程で、リベロマイシン生産菌の培養中に少量のアルコールを添加することで新規リベロマイシン類縁体が蓄積されることを見出した。今回、新規リベロマイシン類縁体の創製と単離・構造決定およびそれらの生物活性について報告する。
【方法と結果】放線菌 *S. reveromyceticus* SN-593 を 70 mL のリベロマイシン生産培地を用いて K1 フラスコ中で、28°C、150 rpm で培養を行った。72 時間後、培養液に 0.7 mL のメタノールまたはエタノールを加えさらに 48 時間培養を行った。コントロールとして同様の培養をアルコール添加なしで行った。各培養液を等量の酢酸エチルにより分配・抽出することでリベロマイシン類を含む抽出液を得た。抽出液を濃縮・乾固後、得られた抽出物をメタノールに溶解し DAD-LC/MS により分析を行った。分析は移動相にはアセトニトリル/0.05%ギ酸水溶液を用いて逆相カラムにより分離を行った。マススペクトルはネガティブモードにより記録した。その結果、メタノールまたはエタノールを添加した培養液ではリベロマイシン A のピークに加えて、より脂溶性の高い領域に新たにコントロールでは検出されないピークがそれぞれ検出された。これらのピークは、その UV 吸収スペクトルおよびマススペクトルより新規リベロマイシン類縁体であることが示唆された。このことからこの方法を大量培養に応用し、メタノール添加では 5.0 L、エタノール添加では 1.4 L の培養液より各種クロマトグラフィーにより、それぞれより新規リベロマイシン類縁体 **1** および **2** を単離した。これらの構造を NMR やマススペクトルなどの分光学的手法および化学的手法により検討し、それぞれ新規リベロマイシン類縁体、reveromycin T 1-methyl ester（**1**）および 1-ethyl ester（**2**）と決定した。化合物 **1** および **2** のがん細胞に対する細胞毒性を評価した。その結果、化合物 **1** および **2** は、リベロマイシン A と比較し HL-60 細胞に対して、２～１０倍程度強い細胞毒性を示した。リベロマイシン A は、リベロマイシン T のスピロアセタール骨格上にサクシニル基が導入され、最終的に生合成される。しかし、今回単離した化合物ではサクシニル化が進行せず、エステル体が蓄積された。このことを P450revI-reveromycin T 共結晶解析の結果より考察した。

Structure elucidation, alcohol added fermentation, microbial metabolite

講演番号：3D12p02
講演日時、会場：3 月 28 日 14:11～ D 校舎 12 会場

Isolation of new cyclic depsipeptides from a microbial metabolites fraction library by NPPlot screening

○Jun-pil JANG[1,2], Toshihiko Nogawa[1], Yayoi Hongo[3], Takeshi Shimizu[1], Akiko Okano[1], Yushi Futamura[1], Shunji Takahashi[1,3], Jae-Hyuk Jang[2], Jong Seong Ahn[2], Hiroyuki Osada[1,2] ([1]RIKEN CSRS, [2]KRIBB Korea, [3]RIKEN GRC)

[Purpose]

Secondary metabolites from microorganisms are still major sources as a drug or drug seed, and also bioprobe. To obtain such valuable metabolites efficiently, we have constructed a microbial metabolites fraction library based on basic chromatographic techniques, such as MPLC and HPLC, with spectral database named NPPlot (Natural Products Plot) using LC/MS data of the library. NPPlot is a distribution map of metabolites, in which each metabolite is plotted in 2D area by retention time and *m/z* value for X- and Y-axes. In this time, we found two new cyclic depsipeptides from the library by NPPlot screening. We report the discovery, isolation, and structures of the new depsipeptides.

[Experiment]

A 30 L of culture broth of *Streptomyces* sp. RK85-270 was filtered and partitioned with the same volume of ethyl acetate twice. The ethyl acetate soluble layer was evaporated *in vacuo* to obtain 37.2 g of a crude extract. A part of the extract (28.7 g) was separated by a silica gel MPLC with $CHCl_3$/MeOH by stepwise gradient to afford 8 fractions. Each MPLC fraction was separated by C18-HPLC to construct a fraction library. Each fraction was subjected to photodiode-array detector attached LC/MS analysis to obtain UV and mass spectra of each compound within the fraction. Those data including UV and mass spectra were used to generate the NPPlot.

[Results]

On the screening for structurally unique metabolites by the NPPlot search, four dots showing unusual alignment were found in a fraction library generated from *Streptomyces* sp. RK85-270. Among four dots, two compounds were isolated and their structures were elucidated based on spectroscopic methods including extensive NMR techniques and MS/MS analysis. They belong to a cyclic octadepsipeptide, which forms the ester between the hydroxyl group of threonine and the carboxyl group of proline, containing two leucines, two prolines, valine, phenylalanine, threonine, and *N*-methyl-tyrosine. Threonine residue was *n*-propionylated or acetylated at N-terminal. The absolute stereochemistry was determined by Marfey's method and X-ray crystal analysis. Their activities were tested and they showed antimalarial activity without any antiproliferative activity.

Microbial metabolite, Peptide, Fraction library

講演番号：3D12p03
講演日時、会場：3 月 28 日 14:22～ D 校舎 12 会場

マメ科植物クララ *Sophora flavescens* の LC/MS を用いたメタボロミクスによる産地比較
Comparison of *Sophora flavescens* grown in different countries using LC/MS-based metabolomics
○長田 麻由佳[1,2]、野川 俊彦[1]、鈴木 龍一郎[2]、高橋 俊二[1]、白瀧 義明[2]、長田 裕之[1]([1]理研 CSRS、[2]城西大薬)
○Mayuka OSADA[1,2], Toshihiko NOGAWA[1], Ryuichiro SUZUKI[2], Shunji TAKAHASHI[1], Yoshiaki SHIRATAKI[2], Hiroyuki OSADA[1] ([1]RIKEN CSRS, [2]Josai Univ.)

【目的】生薬“苦参（kujin）：SOPHORAE RADIX”は、*Sophora flavescens* Aiton（Leguminosae）（クララ）の根を乾燥させたものであり、解熱、苦味健胃薬などとして用いられている。クララは、日本、中国、朝鮮半島になどに分布し、その成分としてマトリンアルカロイドや種々のフラボノイドが知られている。しかし、中国産や日本産などの産地間で化学成分の比較は行われていない。また、生薬の品質管理は含有する１～２種の指標成分を確認するだけであり、多様な成分が組み合わさり薬効を示す生薬の品質管理として十分とは言えない。そこで我々はメタボローム解析を用いた評価方法を検討している。その一環として NMR を用いたメタボローム解析による成分の比較を行った。その結果、中国産と日本産で明らかな差があることがわかった。今回、LC/MS を用いて同様のメタボローム解析を行い中国産と日本産クララの化学成分の比較を行うとともに、NMR による方法との比較も行った。
【方法】クララは、中国（北京３カ所、上海３カ所、杭州４カ所）および日本（鹿児島、滋賀、徳島、神奈川、山梨）で採集したものと市販（ウチダ和漢薬）の苦参（kujin）を用いた。乾燥した *S. flavescens* の根をメタノールにより３時間環流し抽出液を得た。減圧下メタノールを留去し、得られた抽出物を水とジエチルエーテルで分配した。ジエチルエーテル層を減圧乾固し検討用サンプルとした。これを 1 mg/mL の濃度になるようにメタノールに溶解し、LC/MS 用サンプルとした。LC/MS 分析は、Waters 2690 Alliance／ABSciex Qtrap システムを用い、イオン化には ESI 法を用いた。LC 分離は、カラムに Waters XTerra C18 2.1 mm id x 150 mm（5 μm）、移動相にアセトニトリル／0.05% ギ酸水溶液を用いて行った。また、フォトダイオードアレイ検出器を用いて、同時に含有成分の UV 吸収スペクトルの測定も行った。メタボローム解析は、MS データをもとに ABSciex MarkerView v1.2.1 を用いて行った。
【結果】MS 測定の結果をもとに主成分解析を行った。その結果、PCA スコアプロットにおいて山梨産クララを除き、中国産と日本産が PC1 軸に沿って異なる集団を形成することが示された。山梨産クララは中国産と同じ集団に分類された。さらに、ローディングプロットより日本産クララに特徴的に検出されたシグナルを検索した。その結果、分子量 456 および 472 を有する化合物を見出した。この際の LC 分析の結果から得られたそれらの UV 吸収スペクトルより、これら２つの化合物はフラバノン骨格を有するフラボノイドであることがわかり、それぞれを kurarinol および kushenol H であると推定した。この結果は NMR によるメタボローム解析のものと一致し、LC/MS でも NMR 同様にメタボローム解析により産地比較を行うことができることがわかった。

Sophora flavescens, metabolomics, LC/MS

講演番号：3D12p04
講演日時、会場：3 月 28 日 14:33～ D 校舎 12 会場

ChemProteoBase のがん代謝作用薬解析に向けた応用

Application of ChemProteoBase toward cancer metabolism analysis

○室井 誠[1,2]、田中 美帆[2]、川谷 誠[1]、長田 裕之[1,2] ([1]理研・抗生物質、[2]理研 CSRS・ ケミカルバイオロジー)
○Makoto Muroi[1,2], Miho Tanaka[2], Makoto Kawatani[1], Hiroyuki Osada[1,2] ([1]RIKEN, Antibiotics Lab., [2]RIKEN CSRS, Chemical Biology)

【目的】Warburg 効果として知られているように、がん細胞は解糖系を積極的に利用し、ATP の産生と細胞増殖に必要な生体高分子合成のバランスをとることによって、がん細胞の急速な増殖につなげている。近年、がん細胞は代謝系をリプログラミングすることによって、解糖系だけでなく、環境に応じてグルタミノリシスなど別の代謝系を巧みに利用してエネルギーを得ると考えられるようになってきた。しかし、がんの代謝制御機序についてはいまだ不明な点が多く、がんの代謝に作用する化合物は、がん代謝の制御機構を明らかにすることに役立つ他、新規抗がん剤の創出につながることが期待される。一方、我々は、２次元電気泳動に基づくプロテオーム解析法を用いた薬剤作用解析システム ChemProteoBase を構築してきた。ChemProteoBase は薬剤処理 HeLa 細胞のプロテオーム解析を行い再現性の高い 296 スポットの定量値をデータベース化した既知薬剤の定量値と比較するシステムである。解析に用いる 296 スポットを同定したところ、解糖系など代謝系に関与するタンパク質のスポットが含まれており、これらの増減が一度に解析できることが明らかになってきた。がん代謝作用薬について、これらのタンパク質の変動解析をおこなった。
【方法・結果】296 スポットのうち 263 スポットを PMF 法、または、LC-MS/MS を用いて同定した。同定情報を用いて、Uniprot などの公開されたタンパク質データベースから局在、機能に関する情報についてキーワードを用いて抽出し、特定の機能や代謝などのパスウェイとそのスポットの発現量を関連づけて表示するシステムを作成した。本システムを用いて、２-デオキシ-D-グルコースやツニカマイシンなどの糖代謝に作用する薬剤を作用させたところ、糖代謝関連タンパク質スポットがコントロールに比べ上昇傾向にあることが見いだされた。また、鉄のキレーターは Hif-1 を介して解糖系のタンパク質の発現上昇を引き起こすことが知られているが、鉄キレーターである Dp44mT を処理した所、解糖系の酵素タンパク質である phosphoglycerate kinase 1 や aldolase A, fructose-bisphosphate のスポットでおよそ 1.5 倍の顕著な増加が認められた。また、他の解糖系のタンパク質のスポットでも、増加傾向が認められた。トランスクリプトーム解析では異なる応答を示す遺伝子もみられたが、糖代謝関連遺伝子の発現は増加傾向が認められた。本手法を発展させることにより、がん代謝に及ぼす薬剤の作用情報が迅速に得られることが期待される。

proteome analysis, ChemProteoBase, metabolome

講演番号：3D12p05
講演日時、会場：3 月 28 日 14:44～ D 校舎 12 会場

化合物アレイによるソニックヘッジホッグ(Shh)結合化合物の探索とそれらと Shh との相互作用の解析

Screening for sonic hedgehog (Shh)-binding compounds and analysis of their interaction to Shh

○近藤 恭光[1,2]、河村 達郎[2]、本田 香織[1]、関根 朋美[1]、長田 裕之[1,2] ([1]理研 CSRS・ケミカルバイオロジー、[2]理研・抗生物質)
○Yasumitsu KONDOH[1,2], Tatsuro KAWAMURA[2], Kaori HONDA[1], Tomomi SEKINE[1], Hiroyuki OSADA[1,2] ([1]RIKEN CSRS, Chemical Biology, [2]RIKEN, Antibiotics Lab.)

【目的】分泌タンパク質であるソニックヘッジホッグ(Shh)は、正常な胚発生に必須なタンパク質であるが、基底細胞腫、骨芽細胞腫、膵臓癌などの癌細胞において Shh シグナル伝達経路の異常な活性化が報告されている。Shh は、45kDa の Shh から活性型の 20 kDa の N 末端断片(ShhN)への自己切断、C 末端へのコレステロール修飾、N 末端へのパルミテート修飾が起こり、細胞外に分泌される。腫瘍細胞から分泌された ShhN が、腫瘍細胞の周囲に存在する間質細胞の Shh シグナル伝達経路を活性化させ腫瘍の成長を誘導するため、Shh シグナル伝達経路は抗がん剤の標的として非常に注目されている。我々は、構造多様性を有している天然物、天然物誘導体を固定化した化合物アレイを用いて、Shh に結合しシグナル伝達経路を阻害する化合物の探索し、それら Shh 結合化合物の生理活性及び Shh との相互作用について解析を行う。

【方法と結果】ShhN タンパク質を用いた化合物アレイスクリーニングにより、ShhN に結合する化合物の探索を行った。ShhN タンパク質として、His タグ融合タンパク質またはタグを持たないタンパク質を用い、それぞれの検出は、抗 His 抗体または複数の抗 ShhN 抗体により行った。その結果、約 3 万化合物の中から 322 種のヒット化合物を見いだした。これらの中から、2 つ以上の抗体で検出された 48 化合物が再現性も見られていると考え、次に SPR イメージングにより ShhN との相互作用解析を行った。48 化合物のスポットを SPR チップに固定化し、マウス ShhN タンパク質との相互作用についてカイネティクス解析を行った。その結果、9 化合物が ShhN と解離定数 6-60 nM の強い結合を有していることが明らかとなった。

次に、これらの 9 化合物に関して Shh 阻害活性の評価を行った。マウス未分化間葉細胞 C3H10T1/2 に ShhN を処理すると、骨芽細胞への分化が誘導されることが知られている。骨芽細胞への分化の程度は、マーカータンパク質であるアルカリホスファターゼの活性を測定することで評価できる。そこで、これらの 9 化合物が、ShhN が誘導する C3H10T1/2 細胞の分化を抑制するのかを確かめることにより、ShhN 阻害活性の評価を試みた。C3H10T1/2 細胞に化合物と ShhN を 96 時間処理した後、蛍光基質を用いて細胞抽出液のアルカリホスファターゼ活性を測定した結果、5 化合物に阻害活性が認められた。

chemical array, Sonic hedgehog, SPR imaging

講演番号：3D12p06
講演日時、会場：3 月 28 日 15:05～ D 校舎 12 会場

Alkyl paraben の植物病原菌に対する作用

Effect of alkyl parabens on plant pathogenic fungi.

○谷澤 悟、佐々木 康幸、矢嶋 俊介、伊藤 晋作 (東農大院・バイオ)
○Satoru YAZAWA, Yasuyuki SASAKI, Shunsuke YAJIMA, Shinsaku ITO (Tokyo Univ. of Agri.)

【背景】

Alkyl paraben 類（4-hydroxy benzoate）は古くから抗菌剤として利用されてきた化合物の一群であり、現在でも化粧品や飲料に使われている。しかしながら、それらの作用機序は依然として明らかになっていない。我々はこれまでに、alkyl parabens と類似した構造を有する alkyl gallates（3,4,5-trihydroxy benzoate）について研究を行い、これらの化合物の植物病原菌に対する抗真菌活性、及びその作用機序に関して検討を行い、gallate 類が植物病原菌の呼吸鎖を阻害することで抗真菌活性を発現する可能性を明らかにしてきた。Alkyl parabens と alkyl gallates の構造類似性から、alkyl parabens もまた、同様の作用機序を有することが予想されたため、同様に植物病原菌に対する抗真菌活性、及び呼吸鎖に対する作用を検討した。加えて、植物病原菌の植物体への感染における alkyl parabens の効果の検討も行ったため、併せて報告する。

【方法】

抗菌活性の測定は、*Fusarium solani*, *Colletotrichum acutatum*, *Colletotrichum dematium*, *Alternaria brassicicola* を用いて最小生育阻害濃度を測定することにより行った。酸素消費量の測定は alkyl parabens を処理した植物病原菌の酸素消費量を酸素電極によって測定した。ComplexⅡ阻害活性試験は植物病原菌から精製したミトコンドリア画分を用いて、alkyl paraben による酵素反応の阻害を測定した。また、植物体への感染抑制試験は、植物中の植物病原菌（*A. brassisicola*）の DNA を定量することで行った。

【結果】

alkyl gallates での知見と同様に alkyl parabens もアルキル側鎖の長さに依存した抗真菌活性を示した。加えて、alkyl parabens による酸素消費の阻害活性も抗真菌活性と同様にアルキル側鎖の長さに依存していることから、alkyl parabens も alkyl gallates と同様に呼吸鎖を阻害することで抗真菌活性を示すことが示唆された。また、ミトコンドリア画分を用いた試験の結果、alkyl parabens は呼吸鎖の中でも complexII の活性を特に阻害していることが明らかとなった。さらに植物病原菌の感染における alkyl parabens の効果を検討した結果、抗真菌活性の高い alkyl parabens を処理することで、植物体への植物病原菌の感染抑制が観察された。

paraben, succinate dehydrogenase, plant pathogenic fungi

講演番号：3D12p07
講演日時、会場：3 月 28 日 15:16～ D 校舎 12 会場

アフラトキシン生産阻害物質 cyclo(L-Ala-L-Pro)の作用機序の解明

Studies on the mode of action of cyclo(L-Ala-L-Pro) for inhibiting aflatoxin production.

○飯村 九林、古川 智宏、山本 利義、作田 庄平（東大院農応生化）
○Kurin IIMURA, Tomohiro FURUKAWA, Toshiyoshi YAMAMOTO, Syouhei SAKUDA (The Univ. of Tokyo)

【目的】 マイコトキシンとはカビの生産する有毒二次代謝産物の総称であり、カビが感染した農作物中に生産される。*Aspergillus parasiticus* や *Aspergillus flavus* によって生産されるアフラトキシンは、強い発癌性を持つマイコトキシンであり、アフラトキシンによる農作物汚染は毒性、汚染量の両面から深刻な問題となっている。アフラトキシン汚染の防除法として、菌体の生育を阻害することなく、アフラトキシン生産を特異的に抑制する物質の利用が、耐性菌の早期出現を防ぐことができることから有効であると考えられる。そこで当研究室では、アフラトキシン生産阻害物質として cyclo(L-Ala-L-Pro)を同定した。cyclo(L-Ala-L-Pro)はジケトピペラジン構造を持つ環状化合物であり、菌体の生育を阻害することなくアフラトキシン生産を阻害する。このように、アフラトキシンの生産のみを特異的に阻害する活性物質の作用機序を解明することは、アフラトキシン生産の分子機構の基礎的知見として重要である。また、このような知見は、有用な薬剤の開発にも貢献できると考えられる。そこで本研究では、アフラトキシン生産の分子機構の解明を最終目標に、cyclo(L-Ala-L-Pro)の標的分子の同定を試み、以下の実験を行った。
【方法および結果】 まず、cyclo(L-Ala-L-Pro)の類縁体を合成し、それらのアフラトキシン生産阻害活性を調べた。その結果、アラニンのメチル基の鎖長を長くすると、活性が低下することが明らかとなった。そこでジアジリン基を用いた cyclo(L-Ala-L-Pro)の標的タンパク質の同定を試みた。まず、ジアジリン基を持つアガロースビーズに UV を照射し、cyclo（L-Ala-L-Pro）結合アガロースビーズを作製した。次に、アフラトキシン生産培地で培養した *A. flavus* の菌体を破砕し、抽出したタンパク質を cyclo(L-Ala-L-Pro)結合アガロースビーズと反応させ、cyclo(L-Ala-L-Pro)に特異的に結合するタンパク質を検出した。その結果、35 kDa 付近にバンドが確認された。現在、目的タンパク質を同定するために、LC/MS/MS による解析を行っている。

謝辞
本研究は農林水産省委託プロジェクト研究「カビ毒の動態解明と産生低減技術の開発(カビ毒動態)」として行われているものである。

Aflatoxin, Diketopiperazine, target identification

講演番号：3D12p08
講演日時、会場：3 月 28 日 15:27～ D 校舎 12 会場

相乗的抗真菌作用を示すアネトールはフルコナゾール耐性 *Candida albicans* における Rhodamine 6G の排出を抑制する

Anethole exhibiting synergistic antifungal activity inhibits efflux of rhodamine 6G in fluconazole-resistant *Candida albicans*

○前田 瑞紀[1]、石倉 昂幸[1]、荻田 亮[2]、田中 俊雄[1]、藤田 憲一[1]([1]阪市大院・理、[2]阪市大・健康研セ)
○Mizuki MAEDA[1], Takayuki ISHIKURA[1], Akira OGITA[2], Toshio TANAKA[1], Ken-ichi FUJITA[1]
([1]Grad. Sch. Sci., Osaka City Univ., [2]Res. Cntr. for Urban Health & Sports, Osaka City Univ.)

trans-Anethole（アネトール）はセリ科植物のアニス（*Pimpinella anisum* L.）の種子から抽出される精油の主成分である。本物質は独特の甘い芳香を放ち、香料等の食品添加物として使用されている。本物質は微弱ながら抗菌活性を有しており、様々な微生物に対してその生育を抑制する。また、物理化学的性質や作用機構の異なった薬剤を併用させることによって、相乗的な抗真菌作用を示すことが報告されている。

先行研究において、アネトールは出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* に対して、多剤耐性薬物排出ポンプ ABC トランスポーターの一つである PDR5 遺伝子の発現を抑制し、ドデカノールに対する薬剤耐性を抑制することを明らかにしている。日和見感染性真菌 *Candida albicans* は、出芽酵母の PDR5 とよく似た CDR1 や CDR2 などの薬剤排出ポンプを持っている。そのため、アネトールは *C. albicans* に対しても、出芽酵母と同様に、薬剤排出ポンプの抑制によって相乗的抗真菌作用を発揮すると想定された。

【目的】本研究では、アゾール系抗真菌薬フルコナゾールに耐性となった *C. albicans* に対するアネトールの有効性を調べて、さらに耐性株が薬剤耐性を獲得した要因についても明らかにすることを目的としている。

【方法と結果】薬剤排出の指標として多剤耐性薬剤排出ポンプによって細胞外に排出される蛍光染色試薬Rhodamine 6G（R6G）を用いた。まず、*C. albicans*の飢餓細胞にR6Gを前処理して、あらかじめ細胞にR6Gを取り込ませておいた後、薬剤処理を行い、グルコースを添加した栄養条件および添加していない飢餓条件についてR6Gの排出量を測定した。その結果、フルコナゾール耐性株の最大排出量は、感受性株よりも約２倍高いことがわかり、排出量の差は薬剤耐性獲得の要因の一つとして考えられる。また、栄養条件下において、ABCトランスポーターによるR6Gの顕著な排出が見られ、アネトール処理によりその排出量は大きく抑制された。排出量は抗真菌薬フルコナゾールを併用させた場合においても抑制されていた。従って、アネトールはATP依存性であるABCトランスポーターによる薬剤排出を抑制していることがわかった。また、飢餓条件下においても、R6Gの排出は弱いながらも観察され、アネトール処理によるR6G排出抑制効果も確認できた。以上の結果より、アネトールはABCトランスポーターに加えて、ATP非依存性MFSトランスポーターも抑制している可能性がある。

Anethole, drug resistance, *Candida albicans*

講演番号：3D12p09
講演日時、会場：3 月 28 日 15:38～ D 校舎 12 会場

アンホテリシン B の真菌液胞膜障害作用におけるオートファジーの関与

A possible involvement of autophagy in fungal vacuole disruption by amphotericin B

吉岡 美知留[1]、○松岡 研[1]、山田 圭一[2]、荻田 亮[1,3]、藤田 憲一[1]、田中 俊雄[1] ([1]阪市大院・理、[2]群馬大院・工、[3]阪市大・健康研セ)
Michiru YOSHIOKA[1], ○Ken MATSUOKA[1], Keiichi YAMADA[2], Akira OGITA[1,3], Ken-ichi FUJITA[1], Toshio TANAKA[1] ([1]Grad. Sch. Sci., Osaka City Univ., [2]Grad. Sch. Eng., Gunma Univ., [3]Res. Cntr. for Urban Health & Sports, Osaka City Univ.)

【目的】深在性真菌症の治療薬として使用されるアンホテリシンB (AmB) の殺真菌機序として新たに「液胞膜障害作用」が指摘されている。[1)] AmB の液胞膜障害作用は、蒸留水中など貧栄養、低浸透圧下で著しく増幅される。この事実は、AmB の液胞膜障害作用が上記条件下で促進されるオートファジーと関連している可能性を示唆している。本研究においては、オートファジー関連遺伝子の欠損変異株に対する AmB の致死作用および液胞膜障害作用に加えて、これら変異株における AmB の細胞内動態を親株との間で比較した。また、AmB の液胞膜障害作用を増幅する薬剤因子についても、その効果とオートファジーとの関係について検討した。

【方法】主として *S. cerevisiae* BY4741 株および本株に由来する Δ*atg* 株ならびに Δ*vma* 株を用いた。液胞の観察においては、Δ*atg18* 株、*Δvma1* 株、*Δvma2* 株、および *Δvma3* 株を用いた。蒸留水に懸濁し、AmB の有無の条件でインキュベートした細胞の生菌数をコロニーカウント法で測定した。液胞膜の観察を蛍光試薬 FM4-64 にて処理した細胞を用いて行うとともに、AmB の細胞内動態の観察を蛍光標識 AmB-誘導体 (AmB-Ds) [2)] を用いて行った。

【結果】供試したオートファジー関連遺伝子の欠損株は、すべて AmB の致死作用に耐性であることが判った。Δ*atg18* 株、*Δvma1* 株、*Δvma2* 株、および *Δvma3* 株に AmB-Ds を作用させたところ、Δ*atg18* 株では細胞質中に拡散し、*Δvma1* 株、*Δvma2* 株、および *Δvma3* 株では液胞内部へと取り込まれていることを示す像が得られた。これらの結果より、Δ*atg18* 株では AmB を液胞に輸送する機構が機能しないことから、AmB 耐性が生じているとみなされた。一方、*Δvma* 株では AmB を取り込んだ小胞が液胞内で崩壊しないため、AmB 耐性が生じているとみなされた。*S. cerevisiae* を用いるスクリーニングの結果、AmB の液胞膜障害作用を増幅する成分として、新たにワサビ由来の allyl-isothiocyanate (AITC) およびタマネギ由来の zwiebelane A (ZA) を見いだした。AmB + AITC 処理細胞では、液胞の小胞化が促進されたが、AmB + ZA 処理細胞では AmB による液胞膜の破壊が促進された。AITC や ZA の効果をオートファジーとの関連において検討中である。

1. Ogita, A. *et al*., 2012. Enhancing effects on vacuole-targeting fungicidal activity of amphotericin B. Frontiers in Microbiology, 3, 1-6.
2. Kang, C-K., *et al*.,. 2013. Visualization analysis of the vacuole-targeting fungicidal activity of amphotericin B against parent strain and ergosterol-less mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiology, 159, 939-947.

amphotericin B, fungicidal activity, autophagy

講演番号：3D12p10
講演日時、会場：3 月 28 日 15:49～ D 校舎 12 会場

ヤナギタデ由来成分の真菌液胞膜破壊作用
Fungal vacuole disruption by a compound from *Persicaria hydropiper*
○近藤 拓也[1]、荻田 亮[1,2]、藤田 憲一[1]、田中 俊雄[1] ([1]阪市大院・理、[2]阪市大・健康研セ)
○Takuya KONDO[1], Akira OGITA[1,2], Ken-ichi FUJITA[1], Toshio TANAKA[1] ([1]Grad. Sch. Sci., Osaka City Univ., [2]Res. Cntr. for Urban Health & Sports, Osaka City Univ.)

【目的】殺真菌機序の 1 つとみなされる液胞膜障害作用は、ポリオールマクロライド抗生物質の一つである niphimycin に報告されて以降、amphotericin B (AmB)、さらには細菌の細胞膜障害剤として知られる polymyxin B に認められている。[1)] 液胞膜障害作用を発揮する天然由来成分を新たに探索した結果、ヤナギタデ (*Persicaria hydropiper*) の破砕液中に目的とする活性が含まれていることが判った。ヤナギタデの辛み成分として知られる polygodial が真菌モデル細胞である *S. cerevisiae* に対して細胞膜障害作用を発揮することが知られている。[2)] 本研究においては、polygodial の殺真菌作用が細胞膜障害作用と液胞膜障害作用のいずれに依存するのかを明らかにしようとした。また、polygodial の液胞膜障害作用を数種の真菌に対して検証するとともに、その発現機序におけるオートファジーの関与についても検討した。
【方法】 *S. cerevisiae* および *Aspergillus niger* の培養は 2.5%麦芽末培地、30℃ の条件で行った。*Candida albicans* の培養は、RPMI 培地、37℃ の条件で行った。また、生菌数の測定はコロニーカウント法によって行い、細胞内 K^+ の細胞外への漏出を細胞膜障害の指標として測定した。液胞膜の観察は蛍光試薬 FM4-64 にて処理した細胞を用いて行った。
【結果】polygodial は濃度依存的かつ経時的に *S. cerevisiae* の生菌数を減少させた。インキュベーションの初期においては細胞外への K^+ の漏出と細胞死がほぼ並行して認められたが、それにひき続く著しい細胞死はむしろ液胞膜の破壊を伴って観察された。Ca^{2+} の共存下では、細胞膜リン脂質のイオン誘起型相分離によって polygodial の細胞膜障害作用は抑制される。一方、Ca^{2+} の共存下でも、培養後期に見られる液胞膜の破壊と著しい細胞死は抑制されないことが判った。この事実は、polygodial の殺真菌作用が細胞膜障害よりも液胞膜障害により強く依存していることを示している。polygodial は二形成の病原性酵母である *C. albicans* および食品汚染など深刻な問題の原因となっている糸状菌 *A. niger* に対しても液胞膜破壊を伴う細胞死を惹起することが明らかになった。polygodial の液胞膜障害作用とオートファジーとの関係について目下検討中である。

1. Ogita, A. *et al*., 2012. Enhancing effects on vacuole-targeting fungicidal activity of amphotericin B. Frontiers in Microbiology, 3, 1-6.
2. Taniguchi, M. *et al*.,1988. Mode of action of polygodial, an antifungal sesquiterpene dialdehyde. Agric. Biol. Chem., 52, 1409-1414.

vacuole, polygodial, fungicidal activity

講演番号：3D12p11
講演日時、会場：3 月 28 日 16:10～ D 校舎 12 会場

マウス精子の超活性化を誘導するフラバン二量体の作用機構の解析

Analysis of hyperactivation-inducible effect of flavan dimer in mouse sperm

○荒舘 忠[1]、谷井 一郎[1]、小宮 顕[2] ([1]富山大医生物、[2]富山大医腎泌尿器)
○Tadashi ARADATE[1], Ichiro TANII[1], Akira KOMIYA[2] ([1]Univ. of Toyama, Medical Bio, [2]Univ. of Toyama, Urology)

【目的】放精された哺乳類の精子はすぐに受精出来る状態にはなく、卵周囲のバリア（卵丘細胞層や透明帯）を突破するためには大きな振幅を特徴とする運動性の変化（Hyperactivation：超活性化）が必須である。我々は、精子活性化剤の開発を目指して、その誘導物質を天然物から探索しており、カワラケツメイの莢から分離した 3 種類のフラバン二量体、7,4'-dihydroxyflavan-(4β→8)-catechin（**1**）、7,4'-dihydroxyflavan-(4β→8)-afzelechin（**2**）、7,3',4'-trihydroxyflavan-(4β→8)-catechin（**3**）がマウス精子の超活性化を誘導することを見出した。また、誘導効果が最も高い化合物 **2** で処理したマウス精子による体外受精において、受精率が向上することを確認した。このことから、化合物 **2** によって誘導された精子の超活性化は生理的な意義をもつものと考えられる。そこで、化合物 **2** がどのような作用によって超活性化を誘導するのかを調べるために、関与が指摘されているシグナル伝達分子の特異的な阻害剤を用いてその影響を調べた。

【方法】精子は、ICR マウス（雄、15～19 週齢）の精巣上体尾部より採取した。精子運動速度および超活性化運動の誘導効果は、精子運動能解析装置 SMAS を用いて評価した。採取した精子は、TYH 培地で 37℃、5%CO_2 下で 90 分間培養し、Capacitation（受精能獲得）状態にしてから、各処理に用いた。阻害剤として、H-89（PKA 阻害剤）、SU6656（Src family kinase 阻害剤）などを 2.5～20μM の濃度で処理した。阻害剤の影響は、阻害剤を含む TYH 培地で 10 分間のプレインキュベーションを行った精子を、阻害剤＋100μM 化合物 **2** を含む TYH 培地に加えて 30 分間培養した後、運動能を SMAS で評価した。

【結果】SU6656 処理は、20μM の濃度でも化合物 **2** による超活性化の誘導を抑制しなかった。一方、H-89 処理は、5～20μM の濃度で、超活性化の有意な抑制が観察された。これらのことから、化合物 **2** によるマウス精子の超活性化には、Src は関与せず、PKA の活性化とそれ以降のシグナル伝達経路が重要であることが示唆された。現在、さらなる解析を行っているところである。

flavan dimer, hyperactivation, mouse sperm

講演番号：3D12p12
講演日時、会場：3 月 28 日 16:21～ D 校舎 12 会場

ヒト真皮線維芽細胞の IL-1α刺激によるエラスターゼ発現上昇における luteolin の抑制効果

Luteolin attenuates the IL-1α-stimulated up-regulation of skin fibroblast elastase in human dermal fibroblasts

○坂井 良啓[1]、スダカル ゴヴィンダム[2]、金 孝靜[2]、禹 済泰[1]、車 炳允[2]([1]中部大応生、[2]生物機能開発研究所)
○Yoshihiro SAKAI[1], Govindam Sudhakar[2], Hyo-Jung KIM[2], Je-Tae WOO[1], Byung-Yoon CHA[2] ([1]Graduate school of Bioscience and Biotech.,Chubu Univ., [2]Research Institute for Biological Function,Chubu Univ.)

【目的】
皮膚老化の特徴であるシワ形成の主な原因は紫外線(UV)である。特に UVB 暴露により表皮細胞からサイトカイン（主に IL-1α）が分泌されて、それらが真皮線維芽細胞に作用してエラスターゼ酵素活性を亢進させる。その結果エラスチンが分解されて真皮の 3 次元構造を変性されることにより、皮膚の弾力性の低下がシワの引き金になっていることは既に知られている。本研究では、IL-1α刺激による真皮線維芽細胞のエラスターゼ活性および発現を抑制する天然化合物を探索し、その作用機構を明らかにすることを目的とした。

【方法】
ヒト真皮線維芽細胞を 96 穴プレートに 1.0×10^4cell/well で播種した。24 時間培養後、血清不含培地に交換し、starvation を行った。24 時間培養後、濃度別にサンプルを添加し 3 時間プレインキュベーションした後、IL-1α を添加した。72 時間培養後、エラスターゼ酵素活性を測定した。ここで抑制効果が見られた化合物をウエスタンブロッティング法にてエラスターゼ発現および細胞内情報伝達経路における作用機構を確認した。また細胞生存率は MTT アッセイによって確認した。

【結果と考察】
天然物由来化合物ライブラリー200 種類を用いてスクリーニングを行った結果、luteolin が IL-1α刺激によるエラスターゼ活性化を有意に抑制することを見出した。また luteolin はエラスターゼを直接阻害せず、エラスターゼ発現を抑制したことにより酵素阻害剤としてではなくエラスターゼ発現の抑制によってエラスターゼ活性を抑制したと考えられる。また luteolin と同じフラボン類である apigenin はエラスターゼ活性化を抑制しなかったことからエラスターゼ活性化を制御するフラボン類の相関性を調べている。
IL-1α は p38MAPK および NFκB 経路を活性化させることが報告されている。それらのシグナル伝達経路における luteolin の影響を検討した結果、luteolin は p38 のリン酸化を抑制した。以上の結果から luteolin は IL-1α の刺激による細胞内シグナル伝達経路を制御することによってエラスターゼの発現上昇を抑制すると考えられる。

Photo-aging, Interleukin-1α, Skin fibroblast elastase

講演番号：3D12p13
講演日時、会場：3 月 28 日 16:32～ D 校舎 12 会場

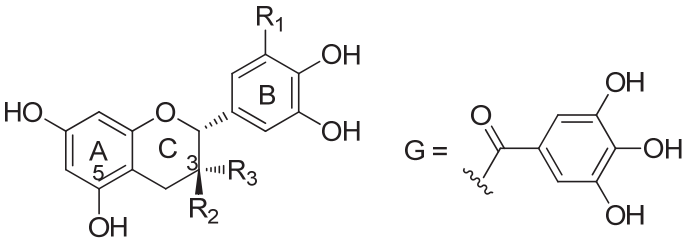
HeLa S3 細胞増殖抑制活性に対する(−)-Epicatechin-3,5-O-digallate の 2,3-cis 構造の重要性

2,3-cis Structure of (-)-epicatechin-3,5-O-digallate is essential for the inhibition of HeLa S3 cell proliferation

○森 一起[1]、綾野 義博[1]、濱田 義知[1]、法島 太一[2]、田中 隆太[2]、赤坂 吉績[2]、中島 範行[3]、齊藤 安貴子[1,2] ([1]大阪電気通信大学院・先端、[2]大阪電気通信大学・環境、[3]富山県立大学・生物工)
○Kazuki MORI[1], Yoshihiro AYANO[1], Yoshitomo HAMADA[1], Taichi HOJIMA[2], Ryuuta TANAKA[2], Yoshinori AKASAKA[2], Noriyuki NAKAJIMA[3], Akiko SAITOU[1,2] ([1]Graduate School of Engineering, Osaka Electro-communication University, [2]Faculty of Engineering, Osaka Electro-communication University, [3]Faculty of Engineering, Toyama Prefectural University)

【目的】

植物中には、フラバン-3-オール構造を持つ化合物が大量に含まれており、我々は日々大量に摂取している。緑茶カテキンとして知られる(–)-エピガロカテキン-3-*O*-ガレート（EGCG, **1**）は、きわめて強い抗酸化活性をはじめ、ガン細胞増殖抑制活性など様々な生物活性が報告されている多機能性化合物である。この機能性は、B 環上の 3 つの水酸基、及び、3 位のガロイル基(G)によると考えられる。本研究では、我々が見出した 5 位を選択的な修飾法を用いて、(+)-カテキン(**2**)、および、(–)-エピカテキン(**3**)の 5 位にガロイル基を導入し、その構造-活性相関研究を行ったので報告する。

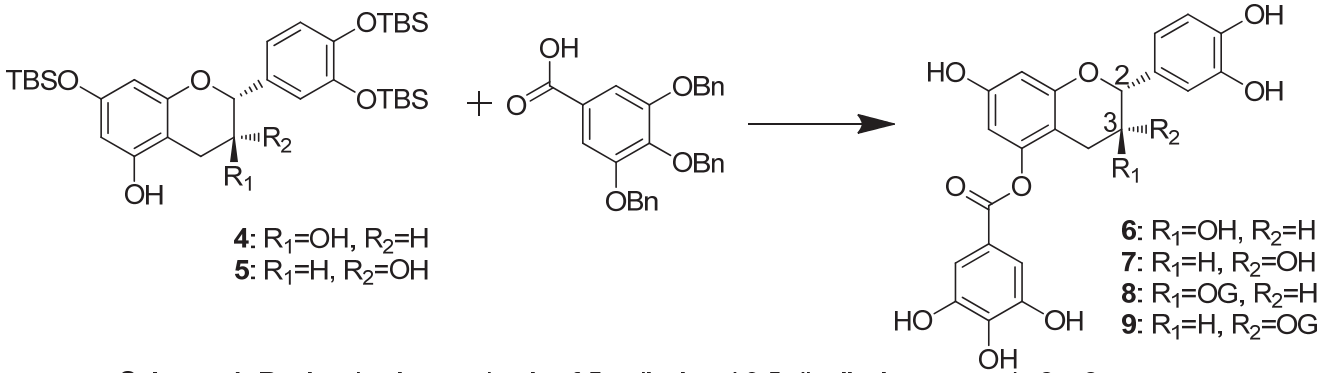


1: R_1 = OH, R_2 = H, R_3 = OG
2: R_1 = R_3 = H, R_2 = OH
3: R_1 = R_2 = H, R_3=OH

Figure 1. Structure of flavan-3-ols

【方法と結果】

2、**3** から誘導し 5 位水酸基の TBS(*t*-butyldimethylsilyl)基を選択的に脱保護して得た **4**、**5** から、ガロイル基を導入した **6**～**9** を合成した。これらの化合物について DPPH ラジカル消去活性を測定したところ、フェノール性水酸基が多い **8**、**9** が強い活性を示した。一方で、HeLa S3 細胞を用いた細胞増殖抑制活性では、2,3-*cis* 構造（エピカテキン構造）を持つ **9** のみがきわめて強い活性を示した。細胞増殖抑制活性には、3 位の立体が重要であることが明らかになった。



4: R_1=OH, R_2=H
5: R_1=H, R_2=OH

6: R_1=OH, R_2=H
7: R_1=H, R_2=OH
8: R_1=OG, R_2=H
9: R_1=H, R_2=OG

Scheme 1. Regioselective synthesis of 5-galloyl and 3,5-digalloyl compounds **6** ~ **9**

inhibitory activity against cancer cell proliferation, structure-activity relationships regioselective synthesis

講演番号：3D12p14
講演日時、会場：3 月 28 日 16:43～ D 校舎 12 会場

フラバン-3-オール誘導体の酵素、及び、植物細胞による糖化反応の検討
Glycosylation studies of flavan-3-ol derivatives using glycosyl transferase and plant cells

柴崎 亨[1]、○野呂 健太[1]、真鍋 滉一朗[1]、森 一起[2]、田中 隆太[1]、富田 貴之[1]、米田 慎吾[1]、辻井 隆行[1]、川崎 崇[3]、今村 信孝[3]、齊藤 安貴子[1,2] ([1]大阪電通大工・環境、[2]大阪電通大院工・先端、[3]立命館大・薬)
Toru SHIBASAKI[1], ○Kenta NORO[1], Koichiro MANABE[1], Kazuki MORI[2], Ryuta TANAKA[1], Takayuki TOMITA[1], Shingo KOMEDA[1], Takayuki TUZII[1], Takashi KAWASAKI[3], Nobutaka IMAMURA[3], Akiko SAITO[1,2] ([1]OECU, [2]GSE/OECU, [3]RITSU)

【目的】
フラバン-3-オール類は様々な植物に含まれる機能性物質であり、様々な誘導体として存在し、その機能を発揮していると考えられている。我々はフラバン-3-オール類の高機能性に注目し、位置選択的な修飾法の開発やフラバン-3-オールの重合体として知られるプロアントシアニジンの合成研究を進めてきた。また、我々が普段から口にする果物や野菜中には糖化されたフラバン-3-オール誘導体が大量に存在するが、アグリコンですら単離が難しいため、天然からそれぞれの糖化化合物を純粋に単離することが難しく、その構造-活性相関はほとんど明らかになっていない。そこで我々は、これまで合成してきた様々な flavan-3-ol 誘導体、プロアントシアニジン類を出発物質として、糖化を試みた。

【方法と結果】
市販の糖化酵素、シロイヌナズナからクローニングした糖転移酵素、ブドウ培養細胞を用いて、重合体であるプロアントシアニジンを含むフラバン-3-オール誘導体について糖化反応を試みた。様々な化合物について検討した結果、Figure 1 に示した 1～4 の化合物のうち、数種の酵素において、(+)-カテキン-3, 5-ジガレート（4）のみが反応し糖化化合物が生成した。一方で、同条件において、きわめて構造が近い化合物 1～3 やオリゴマー構造を持つ化合物では全く糖化化合物が検出できなかった。一般的にポリフェノール化合物は、タンパク質との非特異的な吸着が多く、そのために様々な酵素活性を阻害すると考えられている。そこで、1～4 の化合物を固定化したアフィニティービーズを作成し、BSA を用いてタンパク質への吸着を調べた。その結果、3 の吸着が大きかったが、1、2、4 のタンパク質吸着は少ない事が確認された。3 位の立体のみが異なる 2 と 4 において数種類の異なる酵素において 4 のみが反応する事から、糖化反応に用いるための基質には適した構造がある事が示唆された。

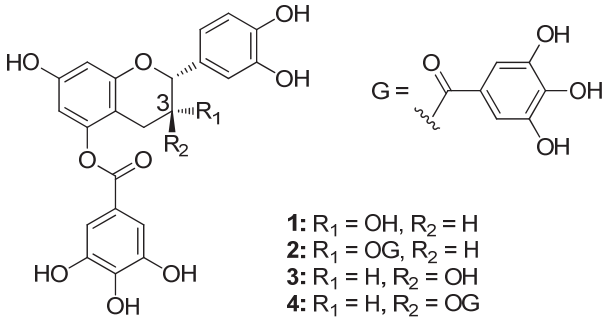


Figure 1. Structures of flavan-3-ol analogues

Flavan-3-ol, biocatalytic glycosylation, proanthocyanidin

講演番号：3D12p15
講演日時、会場：3 月 28 日 16:54～ D 校舎 12 会場

脂肪鎖を導入したフラバン-3-オール誘導体の合成とガン細胞増殖抑制活性

Synthesis of acylated flavan-3-ol derivatives and their inhibitory activity against cancer cell proliferation

○綾野 義博[1]、森 一起[1]、平井 瑞輝[2]、中島 範行[3]、齊藤 安貴子[1,2] ([1]大阪電通大院工・先端、[2]大阪電通大工・環境、[3]富山県立大工・生物工)

○Yoshihiro AYANO[1], Kazuki MORI[1], Mizuki HIRAI[2], Noriyuki NAKAJIMA[3], Akiko SAITO[1,2] ([1]GSE-OECU, [2]OUCU, [3]TPU)

【目的】

フラバン-3-オール類は、いわゆる「カテキン類」と呼ばれる化合物群であり、様々な修飾化合物やオリゴマーとして食品中に含まれている。我々は、フラバン-3-オール誘導体の構造-活性相関に興味を持ち、様々な誘導体の合成研究と活性測定を行っている。我々は、これまでに(+)-カテキンや(−)-エピカテキンに対して3位や5位へ脂肪鎖を導入した誘導体1～4の合成と生物活性試験を行い、脂肪鎖導入によりヒト培養細胞増殖抑制活性が増強されること、及び、5位よりも3位に脂肪鎖を導入した場合その活性が強くなる事を見出し昨年度の本大会で報告した。本大会では、1～4を用いたさらなる活性試験の結果、及び、(+)-カテキンと(−)-エピカテキンで構成されるプロシアニジンB1 (5)への脂肪鎖導入について報告する。

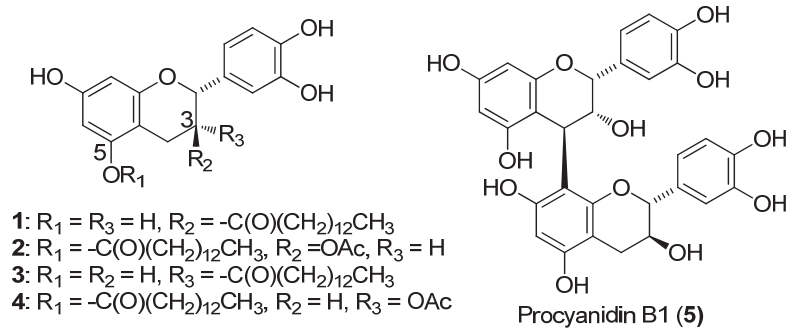
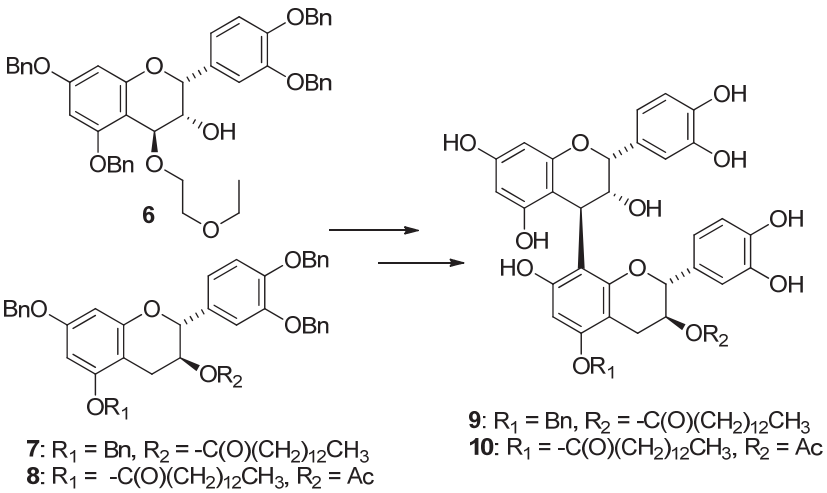


Figure 1. Structure of acylated flavan-3-ols (**1~4**) and procyanidin B1 (**5**)

【方法と結果】

単量体1～4を用いたヒト培養細胞の細胞毒性試験において、5 位に脂肪鎖を導入した化合物よりも、3 位に脂肪鎖を導入した化合物の方が活性を発揮する速度が速い事が確認された。また、同様な活性の増強が 2 量体でも観察できるか否かを確認するため、オリゴマーの合成を行った。3 位、あるいは、5 位を選択的に脂肪鎖で修飾した求核体 7、8 を用いて 6 との縮合反応を行い、オリゴマー9, 10 を合成した。現在、これらの生物活性試験を進めている。



Scheme 1. Synthesis of acylated procyanidin B1

proanthocyanidin, inhibitory activity against cancer cell proliferation, tructure-activity relationships

講演番号：3D12p16
講演日時、会場：3 月 28 日 17:15～ D 校舎 12 会場

ネオニコチノイドの選択毒性に寄与するニコチン性アセチルコリン受容体の新奇構造因子

A new structure factor of the nicotinic acetylcholine receptor contributing to the selective inseciticidal action of neonicotinoids

○伊原 誠[1]、岡島 俊英[2]、山下 敦子[3]、尾田 拓麻[1]、浅野 拓也[1]、松井 美佳奈[1]、David B. Sattelle[4]、松田 一彦[1]（[1]近畿大農、[2]大阪大産研、[3]岡山大薬、[4]UCL）

○Makoto Ihara[1], Toshihide Okajima[2], Atsuko Yamashita[3], Takuma Oda[1], Takuya Asano[1], Mikana Matsui[1], David B. Sattelle[4], Kazuhiko Matsuda[1] ([1]Kinki Univ., [2]Osaka Univ., [3]Okayama Univ., [4]UCL)

【目的】イミダクロプリドに代表されるネオニコチノイドは，昆虫のニコチン性アセチルコリン受容体(nAChR)を分子標的とする殺虫剤である.一方で nAChR はリガンド開口イオンチャネルの Cys-loop スーパーファミリーに属するイオンチャネルで，脊椎動物・無脊椎動物の区別なく，アセチルコリンによる神経伝達を行う非常に重要な受容体である．昆虫の nAChR との高い選択的相互作用が，ネオニコチノイドの殺虫剤としての安全性に寄与している事が示されているが，昆虫 nAChR 選択的なネオニコチノイドの相互作用が，どのような分子機構によって生じているのかは依然未解明な点が多い．そこで，本研究ではモデルタンパク質としてヨーロッパモノアラガイ由来のアセチルコリン結合タンパク質(AChBP)を用いて, ネオニコチノイドの昆虫の nAChR 選択的な相互作用が生じる分子機構について新たな知見を見いだしたので報告する．

【方法】AChBP は *Pichia pastoris* を用いて発現させ，イオン交換およびゲルろ過で精製し，ネオニコチノイド対する相互作用を ITC 法により評価した後，蒸気拡散法を用いてネオニコチノイドとの共結晶を作成し，X 線結晶構造解析を行った．同時に，昆虫の nAChR LoopD 領域で保存される塩基性アミノ酸を導入した AChBP 変異体(Q55R)を作成し同様に解析した．また，nAChR に対するネオニコチノイドの作用はアフリカツメガエル卵母細胞発現系と二電極膜電位固定法を用いて測定した．

【結果と考察】ネオニコチノイドと関連化合物の AChBP 複合体結晶構造モデルは分解能 2.09-2.68 Å で構造解析・精密化を行った．Q55R 変異導入によって，全てのネオニコチノイドがシアノ基やニトロ基を変異導入したアルギニン残基と相互作用する様になり，ITC 分析においても熱力学的パラメーターが大きく変化した．興味深いことに，いくつかの化合物は Q(R)55 のみならず K34 とも相互作用した. K34 は Q55 が存在するβ2 ストランドと逆平行βシート構造形成するβ1 ストランド上に存在している．この K34 に相当する塩基性アミノ酸は昆虫種で広く保存されている事から，当該アミノ酸残基が nAChR 上でネオニコチノイドとの相互作用に寄与しているかを調べるため，AChBP と高い相同性のアゴニスト結合領域をもつα7 nAChR に相同の変異を導入し, ネオニコチノイドの活性を評価した．その結果，ネオニコチノイドの活性は顕著に増大したが，ニコチンやイミダクロプリドの脱ニトロ体の応答は低下した．以上の結果より AChBP とネオニコチノイド複合体の X 線結晶構造解析により見いだした nAChR β1 ストランド上に存在し，K34 に相当する塩基性アミノ酸残基はネオニコチノイドの選択毒性に大きく寄与すると考えられた．【参考文献】Ihara et al., Mol Pharmacol 86:736–746(2014).

nicotinic acetylcholine receptor (nAChR), neonicotinoid, acetylcholine binding protein (AChBP)

講演番号：3D12p17
講演日時、会場：3 月 28 日 17:26～ D 校舎 12 会場

殺虫性インドールアルカロイドオカラミンの活性発現機構と選択性

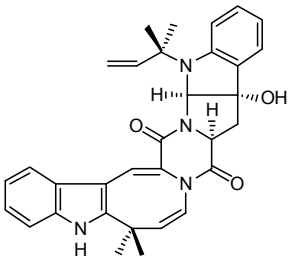
Mode of action and selectivity of insecticidal indole alkaloids okaramines

○古谷 章悟[1]、中谷 有里[1]、伊原 誠[1]、甲斐 建次[2]、林 英雄[2]、松田 一彦[1] ([1]近畿大院・農・応生化、[2]阪府大・生環科)
○Shougo FURUTANI[1], Yuri NAKATANI[1], Makoto IHARA[1], Kenji KAI[2], Hideo HAYASHI[2], Kazuhiko MATSUDA[1] ([1]Kinki Univ., [2]Osaka Prefecture Univ.)

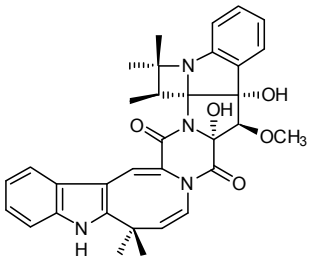
【目的】オカラミン類はカイコガ幼虫に対する殺虫活性を指標に *Penicillium simplicissimum* を培養したオカラ培地から発見されたインドールアルカロイドであり、アゾシン環とアゼチジン環をもつオカラミン A と B がとりわけ高い殺虫活性を示す[1]。我々は、パッチクランプ法を駆使してカイコガ幼虫の神経細胞に対するイオン電流誘起活性を測定するとともに、それによって絞り込まれた標的候補に対する活性化作用を測定することによって、無脊椎動物に特有の抑制性グルタミン酸受容体（GluCl）がオカラミン類の標的であることを明らかにした[2]。今回、GluCl 以外のリガンド作動性塩素チャネルに対するオカラミン類の活性の有無について調査するとともに、*glucl* 遺伝子の選択的スプライシングにより生じる GluCl のバリアントに対するオカラミン類の活性化作用を比較したので報告する。

【結果と考察】リガンド作動性塩素チャネルのうち、カイコガ幼虫の RDL γ-アミノ酪酸受容体(GABACl)、ヒトの α1β2γ2 GABACl およびヒトの α1β グリシン受容体に対するオカラミン類の影響を調べた結果、それらの受容体に対しては活性化作用および抑制作用のいずれの作用についても顕著な作用は認められなかったことから、オカラミンの GluCl 選択性は高いと考えられた。

カイコガ幼虫の神経系では GluCl のバリアントうち exon 3b バリアントが最も高いレベルで発現し、exon 3c がこれに続くレベルで発現している[3]。そこで GluCl の exon 3b および 3c バリアントをアフリカツメガエル卵母細胞で発現させ、受容体の活性化により生じる塩素イオン電流を二電極膜電位固定法により測定した。アフリカツメガエル卵母細胞に発現させた exon 3b バリアントに対する 5 種のオカラミン類の活性と、カイコガ幼虫に対して測定した殺虫活性とを比較したところ、2 種の活性の間に高い相関が認められた。また exon 3b バリアントと exon 3c バリアントに対するそれぞれのオカラミン類の活性を比較したところ大きな違いが認められなかったことから、exon 3 によりコードされる GluCl の領域はオカラミンとの相互作用には直接関与しないと推察された。



Okaramine A



Okaramine B

1. H. Hayashi *et al*., *Agricultural and Biological Chemistry* **53**, 461–469 (1989).
2. S. Furutani *et al*., *Scientific Reports* **4**, 6190 (2014).
3. S. Furutani *et al*., *Molecular Pharmacology* **86**, 686-695 (2014).

Okaramine, Penicillium simplicissimum, GluCl

講演番号：3D12p18
講演日時、会場：3 月 28 日 17:37～ D 校舎 12 会場

オカボノアカアブラムシのイネ根への寄生による褐変

A browning in roots of rice plant during attacking by *Rhopalosiphum rufiabdominalis*

○手林 慎一[1]、上田 真二[1]、森 梓紗[1]、及川 彰[2,3]、佐々木 亮介[3]、斉藤 和季[3,4]、上手 麻希[5]、間世田 英明[5]、石原 亨[6] ([1]高知大農、[2]山形大農、[3]理研 PSC、[4]千葉大院薬、[5]徳島大 STS 研究部、[6]鳥取大農)

○shinichi Tebayashi[1], Shinji Ueda[1], Azusa Miri[1], Akira oikawa[2,3], Ryosuke Sasaki[3], Kazuki Saito[3,4], Maki Uwate[5], Hideaki Maseda[5], Astushi Ishihara[6] ([1]Kochi Univ., [2]Yamagata Univ., [3]RIKEN PSC, [4]Chiba Univ, [5]Univ. Tokushima, [6]Tottori Univ.)

【目的】

イネの病害虫に対する抵抗性についての研究は数多く行われているが、その多くは茎葉部を対象とした研究であり、根部を対象とした研究はほとんど行われていない。本研究では広範囲の農作物の根に寄生するオアカボノアカアブラムシ（*Rhopalosiphum rufiabdominalis*）がイネ根に寄生した際のイネ根における応答機構について検討した。その結果、イネ根の褐変はアブラムシの寄生によって生じ、褐変程度の高い部分にはアブラムシは寄生しないことから、褐変はアブラムシに対するイネの防御反応の一部であることを解明してきた。現在は、この褐変のメカニズムの詳細を研究している。

【方法】

（供試植物と供試昆虫）*R. rufiabdominalis*は高知大学農学部構内で採集し、イネ幼苗（品種：日本晴）にて累代飼育し得いる個体群を用いた。

（分析方法）メタボローム解析はCE-TOFMS(Agilent)で行った。すなわち、植物試料のメタノール抽出物は水とヘキサンで液-液分配し、得られた水層15nLを分析した。一方、遺伝子発現分析はqRT-PCRシステム(Life Technologies)を用いて行った。即ち、採取されたイネ幼根から、RNeasy Plant Mini Kit(キアゲン)を用いてTotalRNA を抽出し、逆転写酵素キットを用いてcDNAライブラリを作成した。これとプライマーもとに遺伝子発現量を定量した。

【結果】

播種 4 日後のイネの芽出しにオカボノアカアブラムシを接種し、イネ根の褐変とアブムシの寄生状況を観察した。またこの時のイネ根を採取し、メタボローム解析・遺伝子発現解析・酵素活性測定に供した。その結果、寄生部ではセロトニンが増加・蓄積（9.3 倍）し、このセロトニンを基質とする peroxidase 活性が上昇するとともに褐変が進行することから、セロトニンが褐変の前駆体であると考えられた。このときの関連遺伝子の発現を解析すると、コリスミ酸からアントラニル酸をへてセロトニンを生合成する遺伝子の発現がすべて寄生 3-5 日後に上昇し、一方で、セロトニンを基質として消費する peroxidase の活性は寄生 7-10 日後に上昇していた。即ち、寄生 3-7 日後の期間は生合成されたセロトニンが十分に消費されず蓄積することが判明した。この発現のタイムラグにより生じたセロトニンはアブラムシ幼虫の生育を阻害することから、イネの根ではアブラムシの寄生に対して２段階の防御機構を展開することが明らかになった。

aphid, rice, browning

講演番号：3D12p19
講演日時、会場：3 月 28 日 17:48～ D 校舎 12 会場

ホタルルシフェリンアナログの発光反応解析

Luminus kinetics analysis of firefly luciferin analogs

○木山 正啓、平野 誉、牧 昌次郎（電通大情報理工）
○ MASAHIRO KIYAMA, TAKASHI HIRANO, SHOJIRO MAKI (University of Electro-Communications)

１．はじめに

ホタル生物発光は、基質であるホタルルシフェリンが酵素であるホタルルシフェラーゼの触媒作用により発光反応を示す発光系である。当研究室ではこのホタルルシフェリンに注目し、その骨格を構造変化させることにより多色に発光するルシフェリンアナログの開発に成功した１。しかし、いずれのルシフェリンアナログの発光強度も天然の D-ルシフェリンに比べて低い。そこでルシフェリンアナログの発光強度低下要因を探るべく、発光反応速度と酵素反応速度、発光量子収率の関係および発光量子収率に関連する蛍光量子収率の測定を行った。

２．発光反応速度と発光量子収率、酵素反応速度の関係

発光反応速度（発光強度）は、酵素反応速度と発光量子収率の積で求まる。ルシフェリンアナログは D-ルシフェリンに比べ、酵素反応速度と発光量子収率のどちらかあるいは両方が低いため発光強度が低いことが予想される。

今回、D-ルシフェリンとルシフェリンアナログの１つであるアカルミネ®の発光量子収率および発光反応速度を測定し、酵素反応速度を求めた。この結果、D-ルシフェリンはアカルミネより発光量子収率が約 7 倍、一方酵素反応速度は約 2 倍であった。従って、発光量子収率の低下が発光反応速度の低下に大きく影響していることが示唆された。

３．発光量子収率と蛍光量子収率の関係

続いて、蛍光量子収率を測定し、発光量子収率に与える影響を調べた。蛍光量子収率は、発光反応効率および一重項励起生成効率と共に、発光量子収率の１要素である。

今回は、D-ルシフェリンおよびアカルミネ®のメチルエステル体を用いて、蛍光量子収率を比較した。事前研究により、蛍光体であるオキシルシフェリンとメチルエステル体の蛍光量子収率は同等であることが判明している。

測定の結果、D-ルシフェリンはアカルミネ®より約 10 倍、蛍光量子収率が高い結果となった。従って、蛍光量子収率の低下が、発光量子収率の低下に強く影響していることが推測された。

Bioluminescence, Firefly, Luciferin

講演番号：3D12p20
講演日時、会場：3 月 28 日 17:59～ D 校舎 12 会場

In vivo イメージングに適した新規ルシフェリンアナログの創製

Innovation of New Luciferin Analog for *in vivo* Imaging

○齊藤 亮平、木山 正啓、北田 昇雄、岩野 智、平野 誉、丹羽 治樹、牧 昌次郎（電気通信大学大学院）
○Ryohei SAITO, Masahiro KIYAMA, Nobuo KITADA, Satoshi IWANO, Takashi HIRANO, Haruki NIWA, Shojiro MAKI (Univ. of E.- Comm.)

当研究室では以前より有機合成の技術を用いて、*in vivo* 光イメージングで使える標識材料の開発を行ってきた。我々は、ホタル生物発光であるホタルルシフェリン-ルシフェラーゼ反応を応用し、標識材料の開発に取り組んでいる。この発光反応のうち、酵素ホタルルシフェラーゼは改変せずに、基質であるホタルルシフェリンの構造を改変したルシフェリンアナログを独自の構造活性相関技術を基に多数開発してきた。これらルシフェリンアナログは可視領域(青から赤)を網羅する発光色を示す。

この構造活性相関技術を基にして、近赤外(NIR)に発光を示すルシフェリンアナログの開発にも成功している。NIR 光は生体透過性が高く、生体内(特に生体内深部)観察に適している。そこで、NIR 発光を有するアナログをアカルミネ®(発光波長 670 ～680 nm)として、和光純薬工業より市販化した。アカルミネ®を用いて動物実験を行った結果、ホタルルシフェリンに比べて強い発光強度を示すなど、良好な結果を得ている。しかしながら、アカルミネ®は水溶性が低く、実験を行う上で不都合が指摘された。そこで、水溶性が高く、且つ NIR 発光を示すアナログを創製することにした。

前述の構造活性相関技術を基にして、新規アナログをデザインし、合成に成功した。この新規アカルミネアナログは試験管レベルの実験にて、アカルミネ®と同程度の 670 nm で発光し、発光強度はアカルミネ®と同程度であった。水溶性は、約 3.0 mg/mL pH 7.4 PBS buffer と、アカルミネ®に比べ約 15 倍向上した。

本会では、新規近赤外発光アナログの詳細を報告する。この新規近赤外発光アナログは共同研究先にて動物実験を行ったので、この結果の詳細についても報告する。産官学を問わず、共同研究を視野に入れた討論を期待している。

in vivo imaging, Luciferin - Luciferase, NIR Luciferin analog

講演番号：3E11a02
講演日時、会場：3 月 28 日 09:11～ E 校舎 11 会場

3 級水酸基のサクシニル化反応に見出される RevL のフマル化修飾

Fumarate modification of RevL involved in succinylation of tertiary alcohol

○前島 希[1,2]、高橋 俊二[1,3]、宮澤 岳[1,2]、鈴木 健裕[4]、堂前 直[2,4]、円谷 陽一[2]、長田 裕之[1,2,3] ([1]理研・抗生物質、[2]埼玉大院・理工学、[3]理研 CSRS・ケミカルバイオロジー、[4]理研 GRC)
○Nozomi MAESHIMA[1,2], Shunji TAKAHASHI[1,3], Takeshi MIYAZAWA[1,2], Takehiro SUZUKI[4], Naoshi DOHMAE[2,4], Yoichi TSUMURAYA[2], Hiroyuki OSADA[1,2,3] ([1]RIKEN, Antibiotics Lab., [2]Saitama Univ., [3]RIKEN CSRS, Chemical Biology, [4]RIKEN Global Research Cluster)

【目的】

Reveromycin A (RM-A) は放線菌 *Streptomyces reveromyceticus* が生産するポリケチド化合物である。中間代謝物 RM-T1 からの RM-A の生成は、3 級水酸基のエステル化であり、合成化学的アプローチでは 1.5 GPa (15,000 気圧) という超高圧条件が必要な反応だが、RM-A 生産菌はこの反応を通常の培養条件で行うことが可能である。最終生合成段階のサクシニル化には、*revK*、*revL* 及び *revM* 遺伝子が必要である事が判明している。また、精製した RevK、RevL 及び RevM を用いた複合酵素反応を検討したところ、RM-T1 から RM-A への変換に成功している。RevL は AMP-binding enzyme、RevM は酸化還元酵素と推定されることから fumaroyl-AMP および succinyl-AMP 生成が予想されるが、中間体の検出には成功していない。そこで、本研究では有機合成が非常に困難な 3 級水酸基のサクシニル化反応に関わる酵素反応中間産物の同定を目的とした。

【方法および結果】

大腸菌を用いて、His-tag 融合タンパクとして RevL の異種発現を行った。菌体を培養・破砕後、Ni-NTA カラムを用いて精製を行い、トロンビン処理により His-tag 除去酵素を得た。MESG を用いる比色法では活性を検出出来たが、fumaroyl-AMP が検出されない理由として、RevL タンパク質自体のフマル化を予想した。そこで、フマル酸、ATP を基質として RevL 反応を行った後、PD-10 カラムを用いて低分子化合物を除去し、MALDI-TOF-MS 解析を行った。その結果、RevL の分子量増加が確認できた。次に、上記の酵素反応後に RevL をトリプシン消化し、MALDI-TOF-MS 解析を行った結果、コントロールからは検出できない 98 Da 増加したペプチド断片を検出出来た。MS/MS 解析によりペプチド断片の配列を解析したところ、Cys 残基の修飾が示唆された。さらに、MonoQ カラムにより精製したフマル化 RevL を用いて、RevM、RevK、NADH、RM-T1 と反応させた結果、RM-A への変換を確認した。

succinylation of tertiary alcohol, Reveromycin A, biosynthesis

講演番号：3E11a03
講演日時、会場：3 月 28 日 09:22～ E 校舎 11 会場

リベロマイシン生合成に関わる RevL の結晶構造解析

Crystal structure of RevL involved in reveromycin biosynthesis

○奥村 英夫[1]、前島 希[2,3]、高橋 俊二[2,4]、熊坂 崇[1]、長田 裕之[2,3,4] ([1]JASRI/SPring-8、[2]理研・抗生物質、[3]埼玉大院・理工学、[4]理研 CSRS・ケミカルバイオロジー)
○Hideo OKUMURA[1], Nozomi MAESHIMA[2,3], Shunji TAKAHASHI[2,4], Takashi KUMASAKA[1], Hiroyuki OSADA[2,3,4] ([1]JASRI/SPring-8, [2]Antibiotics Laboratory, RIKEN, [3]Saitama Univ., [4]RIKEN CSRS, Chemical Biology)

【目的】中間代謝物 RM-T1 から Reveromycin A (RM-A)を生成する反応は、有機合成では非常に困難な 3 級水酸基のサクシニル化反応であるが、RM-A 生産菌は RevK、RevL、RevM の 3 つの酵素を用いて容易に反応を行うことが出来る。本研究では、その中心的な役割を担う RevL に着目し、反応機構を構造から明らかにすることを目的としている。

【方法および結果】

RevL の構造は結晶解析法で決定した。まずメチオニン要求大腸菌 B834(DE3) に pET28b-His8-*revL* を導入し、SeMet 標識した RevL の異種発現を行った。LB 培地で前培養後、SeMet を含む M9 培地中で 37℃、6 時間 IPTG 誘導を行った。大腸菌を回収し、超音波処理により破砕・抽出後、遠心分離上清を Ni-NTA カラムに添着し精製を行った。トロンビンにより His-tag を除去した後、MonoQ カラム精製を行い、主ピークを回収した。得られた精製酵素を用いて結晶化スクリーニングを行ったところ、PEG を沈殿剤とした条件で RevL 結晶を得た。引き続き、放射光施設 SPring-8 BL41XU にて回折測定を行い、1.6 Å 分解能の回折データを収集した。本結晶は空間群 $P2_1$、格子定数 a = 83.2 Å, b = 102.6 Å, c = 97.3 Å, β = 110.1° を有していた。さらにセレンの異常分散効果を用いた SAD 法にて位相決定に成功、構造構築と精密化を行った。

全体構造としては、結晶中でホモ二量体構造をとっており、ヌクレオチド結合タンパク質によく見られる、αヘリックスとβシートが交互に現れる Rossmann fold 構造を有していた。また、本反応にあたり酵素の Cys 側鎖にフマル化修飾がなされることが生化学実験から示唆されているが、候補と考えられる複数の Cys 側鎖の近傍には、それぞれ反応場となりうるようなαヘリックスとβシートで形成されるポケットが見出された。

Natural product biosynthesis, succinylation of tertiary alcohol, X-ray crystallography

講演番号：3E11a04
講演日時、会場：3 月 28 日 09:33～ E 校舎 11 会場

Engineering of primary metabolism in *Streptomyces reveromyceticus*

○Suresh PANTHEE[1], Shunji TAKAHASHI[1], Shirai TOMOKAZU[2], Akihito KONDO[2], Hiroyuki OSADA[1] ([1]RIKEN CSRS, Chemical Biology, [2]RIKEN CSRS, Cell Factory Research Team)

Objective: Availability of primary metabolites and their abundance is a key factor for determining the productivity of these secondary metabolites. The major objective of this research is the engineering of primary metabolism in *Streptomyces reveromyceticus* by using genome scale modelling for the mass production of secondary metabolites.

Methods and Results: Reveromycin (RM) biosynthesis in *S. reveromyceticus* requires malonyl-CoA, methylmalonyl-CoA, butylmalonyl-CoA, and fumaric acid. Polyketide synthase reaction and post polyketide modification also requires ATP, NADH, $FADH_2$, and NADPH. In order to understand primary metabolism, we first compared the primary metabolism in *S. reveromyceticus* based on the KEGG pathway database of *Streptomyces coelicolor* A3(2). With inclusion of annotated gene information in the network, a genome scale model was constructed to maximize the production of RMs.

Based on the model, we tested the release of organic acids are to the culture medium; if the supply of NADPH from pentose phosphate pathway (PPP) was enough for RM-A production; and the metabolite flow between glycolysis pathway and PPP are optimum. We also performed metabolomics analysis to quantify the relative amounts of each component in glycolysis pathway, PPP and TCA cycle. The analyses identified crucial steps involved in the efficient production of primary metabolites leading to the production of RM-A.

Streptomyces, genome scale model, primary metabolism

講演番号：3E11a05
講演日時、会場：3 月 28 日 09:44～ E 校舎 11 会場

テロメスタチン生合成遺伝子クラスターの異種発現
Heterologous Expression of Telomestatin Biosynthetic Gene Cluster
○天貝 啓太[1,2]、柴崎 典子[2]、高木 海[2]、工藤 史貴[3]、江口 正[3]、長田 裕之[2]、池田 治生[4]、新家 一男[5]、高橋 俊二[2]([1]次世代天然物化学技術研究組合、[2]理研 CSRS・ケミカルバイオロジー、[3]東工大院理工、[4]北里大・生命研、[5]産業技術総合研究所)
○ Keita AMAGAI[1,2], Noriko SHIBAZAKI[2], Hiroshi TAKAGI[2], Fumitaka KUDO[3], Tadashi EGUCHI[3], Hiroyuki OSADA[2], Haruo IKEDA[4], Kazuo SHIN-YA[5], Shunji TAKAHASHI[2] ([1]Technology Research Association for Next generation natural products chemistry, [2]RIKEN CSRS, Chemical Biology, [3]Tokyo Institute of Technology, [4]Kitasato Univ., [5]AIST)

【目的】テロメスタチンは放線菌 *Streptomyces anulatus* 3533-SV4 から単離された、強力なテロメラーゼ阻害活性を有する化合物である。その生理活性の高さから抗がん剤としての開発が期待されていたが、生産量が非常に少なく、また全合成も非常に困難であることから、応用研究を行うためのテロメスタチンの確保が困難であった。我々はこの問題を解決する策として、テロメスタチン生合成遺伝子クラスターを生産菌ゲノム DNA から探索・同定し、転写活性化する遺伝子操作を施すことにより、二次代謝産物高生産株で異種発現・高生産させることを試みた。
【手法・結果】テロメスタチンはリボソームにより合成された比較的小さなペプチドが種々の修飾反応を受けて完成する、RiPPs (Ribosomally synthesized and Post-translationally modified Peptide natural products)と呼ばれる天然物と同様の機構で生合成されると考えられた。そこでテロメスタチン生産菌ゲノム DNA 配列情報から、化合物の構造を形作る特徴的なアミノ酸配列を含む小さなタンパク(プレカーサーペプチド)をコードする遺伝子と共に、分子内環化酵素、アゾリン骨格をアゾール骨格へと変換する酵素、プレカーサーペプチドからコアペプチドを切り出し、環化させるペプチダーゼをコードする遺伝子を探索した。その結果、先に示した酵素遺伝子群を内包しており、転写方向が単一の遺伝子クラスターを見出した。よってこの領域をテロメスタチンの生合成遺伝子群と推定し、λ-RED 相同組換法による遺伝子クラスターの最小化、ならびに転写を活性化させるプロモーターを上流に配置し、二次代謝産物高生産株 *Streptomyces avermitilis* SUKA へ導入、培養を行い、代謝産物の解析を行った。その結果、テロメスタチンと同一の *m/z* 値を有するピークを検出することができ、これがテロメスタチンであることを確認した。またコアペプチド部分をインフレームで削除したところ、テロメスタチンの生産は消失した。さらに生産培地を検討したところ、テロメスタチンの生産力価を増大させることにも成功した。

telomestatin, heterologous expression

講演番号：3E11a06
講演日時、会場：3 月 28 日 10:05～ E 校舎 11 会場

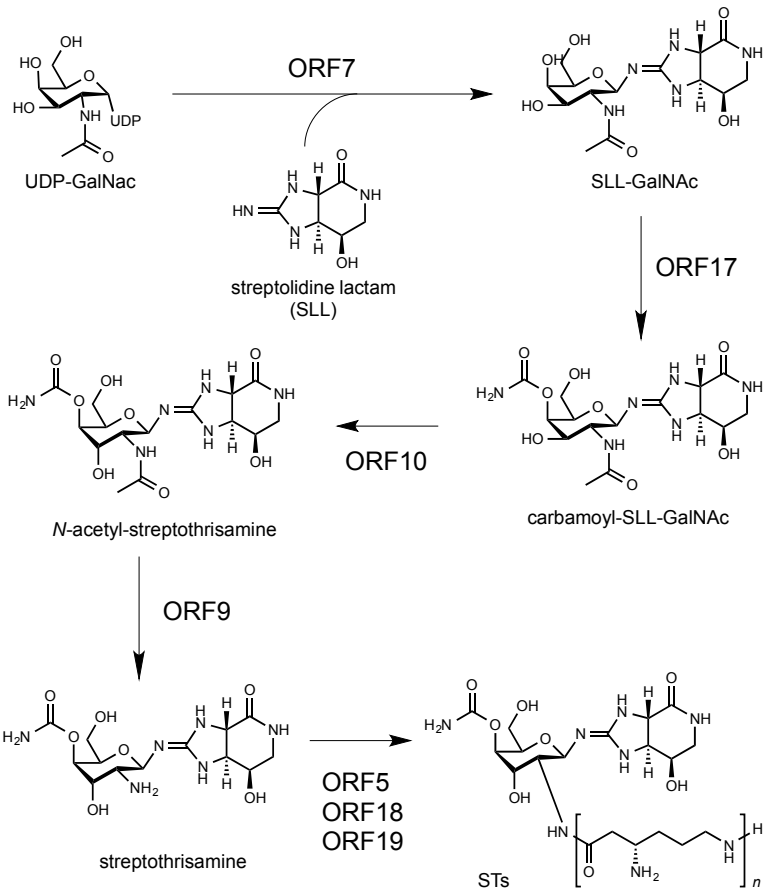
抗生物質 streptothrisin の carbamoyl-D-gulosamine 構造に関する生合成研究

Studies on the biosynthesis of the carbamoyl-D-glosamine moiety in streptothricin.

○丸山 千登勢[1]、加藤 さやか[1]、泉川 美穂[2]、小松 護[3]、池田 治生[3]、新家 一男[4]、濱野 吉十[1] ([1]福井県大・生物資源、[2]JBIC、[3]北里・北里生命研、[4]産総研)

○Chitose MARUYAMA[1], Sayaka KATO[1], Miho IZUMIKAWA[2], Mamoru KOMATSU[3], Haruo IKEDA[3], Kazuo SHIN-YA[4], Yoshimitsu HAMANO[1] ([1]Fukui Pref. Univ., [2]JBIC, [3]Kitasato Univ., [4]AIST)

【目的】放線菌 *Streptomyces rochei* NBRC12908 が生産する抗生物質 streptothricin（ST）の生合成中間体である streptothrisamine はその構造に streptolidine lactam（SLL）と carbamoyl-D-gulosamine を有し、非リボソームペプチド合成酵素である ORF18 の遺伝子破壊株に生産蓄積される。ST 類縁化合物に共通する基本骨格である streptothrisamine は、天然には存在しない糖の 1 つである D-gulosamine を天然で唯一構造に含むことから、その生合成には大変興味が持たれた。そこで本研究では streptothrisamine 生合成機構を明らかにし、糖の異性化を触媒する酵素遺伝子の同定と機能解析を行った。**【方法・結果】**これまでの生合成遺伝子群の破壊実験と組換え酵素を用いた実験から、carbamoyl-D-gulosamine 構造が、*N*-acetyl galactosamine（UDP-GalNAc）を出発原料として、ORF7（glycosyltransferase）による SLL の付加、ORF17（carbamoyl transferase）によるカルバモイル化、ORF9（deacetylase）による脱アセチル化を受けて生合成されることを明らかにした。しかし、糖の異性化を触媒する酵素遺伝子については未同定であり、その異性化反応がどの生合成ステップで起こるのかについては未解明であった。そこで ST 生合成遺伝子群より見出した *orf10* 遺伝子（oxidoreductase）に着目し、破壊実験を行ったところ、その培養上清に carbamoyl-SLL-GalNAc が蓄積していたことから、ORF10 が糖の異性化反応を触媒していることが判明した。現在、本酵素の組換え酵素を用いて酵素学的諸性質を解析しており、これら結果についても報告する。



rare sugar, epimarase, amino sugar

講演番号：3E11a07
講演日時、会場：3 月 28 日 10:16～ E 校舎 11 会場

生合成酵素のエンジニアリングによる streptothrisin のβ-lysine oligopeptide 鎖長制御

Regulation of the ß-lysine oligopeptide chain-length in streptothricin by engineering of the biosynthetic enzyme

丸山 千登勢[1]、川崎 春香[1]、小松 護[2]、池田 治生[2]、○濱野 吉十[1]([1]福井県大・生物資源、[2]北里・北里生命研)

Chitose MARUYAMA[1], Haruka KAWASAKI[1], Mamoru KOMATSU[2], Haruo IKEDA[2], ○Yoshimitsu HAMANO[1] ([1]Fukui Pref. Univ., [2]Kitasato Univ.)

【目的】放線菌 *Streptomyces rochei* NBRC12908 が生産する抗生物質 streptothricin（ST）は、その構造に 1 残基の β-lysine および 2～4 残基からなる β-lysine oligopeptide を有している。最近我々は、β-lysine oligopeptide の生合成が新規反応メカニズムを有する非リボソームペプチド合成酵素（NRPS）によって触媒されることを明らかにした。単独型の NRPS である ORF5（A domain）と ORF19（A domain）は、両者とも β-lysine を基質とし、ORF18（T, C domains）の T domain に結合した状態で進行する β-lysine oligopeptide の合成反応を触媒する。ORF18 の C domain は、T domain 上で伸長した β-lysine oligopeptide と生合成中間体 streptothrisamine の縮合反応を触媒し、1 残基の β-lysine あるいは 3 残基の β-lysine oligopeptide を有する ST が主成分として生産される。このように、ST の β-lysine oligopeptide のペプチド鎖長は、ORF18 の C domain がどのタイミングで縮合反応を触媒するかで決定される。実際に、C domain のペプチド合成活性に重要な $H^{287}QxxxDM^{293}$ モチーフに部位特異的変異を導入し、ペプチド合成活性の反応速度を低下させた rORF18-Q288A を rORF5 および rORF19 とともに酵素反応を行ったところ、野生型酵素と比較して、より伸長した 3～5 残基の β-lysine oligopeptide を有する ST を与えることを明らかにしている。そこで、本研究では、Q288A 以外の変異導入および M293 への変異導入を行い、それぞれの組換え酵素を用いた反応で ST の β-lysine oligopeptide 鎖長がどのように変化するか検証した。

【方法と結果】定法にしたがって rORF18-Q288H、-Q288R、-Q288V、-M293G の部位特異的変異型酵素を構築し、*in vitro* での酵素反応を行い、それぞれの反応産物を LC/MS にて分析した。その結果、野生型酵素は 1 と 3 残基、rORF18-Q288H は 3 と 4 残基、rORF18-Q288R は 4 と 5 残基、rORF18-Q288V は 3 と 4 残基、rORF18-M293G は 3 と 4 残基の β-lysine oligopeptide を有する ST を主成分として生産した。このように、ORF18 の C domain の変異導入が ST の β-lysine oligopeptide 鎖長の人為制御に有効であることを明らかにした。さらに、これら部位特異的変異を有する ST 生合成遺伝子クラスターを染色体組込み型ベクターにて *Streptomyces avermetilis* SUKA17 株へ導入したところ、ORF18-Q288V 生合成遺伝子クラスターは、*in vitro* での結果と同様に 3 と 4 残基の β-lysine oligopeptide を有する ST を主成分として生産した。現在、その他変異型遺伝子クラスター導入株が生産する ST の β-lysine oligopeptide 鎖長を解析しており、本発表ではこれら結果についても報告する。

NRPS, peptide, ß-amino acid

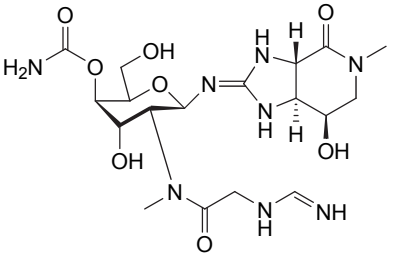
講演番号：3E11a08
講演日時、会場：3 月 28 日 10:27～ E 校舎 11 会場

抗生物質 BD-12 生合成遺伝子の機能解析

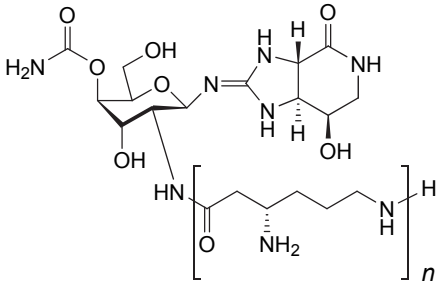
Functional analysis of the antibiotic BD-12 biosynthetic genes

○新倉 春香[1]、丸山 千登勢[1]、泉川 美穂[2]、石川 淳[3]、池田 治生[4]、新家 一男[5]、濱野 吉十[1]([1]福井県大・生物資源、[2]JBIC、[3]国立感染研、[4]北里・北里生命研、[5]産総研)
○Haruka NIIKURA[1], Chitose MARUYAMA[1], Miho IZUMIKAWA[2], Jun ISHIKAWA[3], Haruo IKEDA[4], Kazuo SHIN-YA[5], Yoshimitsu HAMANO[1] ([1]Dept. Biosci. Fukui Pref. Univ., [2]JBIC, [3]NIID, [4]Kitasato Univ., [5]AIST)

【目的】BD-12 は、ST 類抗生物質の 1 つであり、放線菌 *Streptomyces luteocolor* NBRC 13826 によって生産される。BD-12 および ST は、両者とも streptolidine lactam、carbamoyl-D-gulosamine の共通した化学構造を有しているが、BD-12 は *N*-formimidoyl-glycine、ST は 1 残基の β-lysine あるいは 2～7 残基の β-lysine oligopeptide を有している。また我々は、1 残基の β-lysine を有する ST の生合成において、β-lysine のカルボキシル基と carbamoyl-D-gulosamine のアミノ基によるアミド形成は、非リボソーム型ペプチド合成酵素（NRPS）である ORF 5（A domain）と ORF 18（T, C domains）によって触媒されることを明らかにしている。そこで本研究では、BD-12 においても、NRPS が *N*-formimidoyl-glycine と carbamoyl-D-gulosamine の縮合反応を触媒するのか、その生合成機構の解明を試みた。



BD-12



streptothricin (ST)

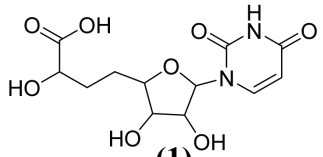
【方法と結果】*S. luteocolor* NBRC 13826 のドラフトゲノム解析から BD-12 生合成遺伝子群を同定したところ、興味深いことに、ST の生合成酵素である ORF 5（A domain）と ORF 18（T, C domains）のホモログ遺伝子が存在しないことが判明した。さらに、BD-12 生合成遺伝子群をクローニングし、異種放線菌 *Streptomyces lividans* に導入したところ、その導入株は glycine と carbamoyl-D-gulosamine が縮合した BD-12 生合成中間体を生産したことから、この縮合反応は NRPS とは別種のペプチド合成酵素によって触媒されることを見出した。そこで、BD-12 生合成遺伝子群に NRPS 以外のペプチド合成酵素が存在するか探索したところ、ORF12 がペプチドグリカン生合成の glycine peptide 合成酵素として知られる FemAB family に相同性を示すことが判明し、この縮合反応を触媒していることが強く示唆された。また、現在、BD-12 生合成遺伝子群に存在する各種酵素遺伝子についても機能解析を行っており、本発表ではその研究成果についても報告する。

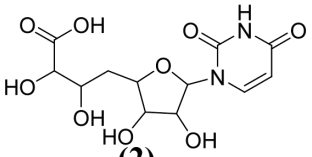
NRPS, peptide synthetase, FemAB

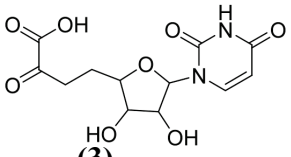
講演番号：3E11a09
講演日時、会場：3 月 28 日 10:38～ E 校舎 11 会場

炭素-炭素結合形成に関与する新奇酸化還元酵素の発見と機能解析
Identification and functional analysis of a novel oxidoreductase involved in C-C bond formation
○白石 太郎、西山 真、葛山 智久（東大・生物工学セ）
○Taro SHIRAISHI, Makoto NISHIYAMA, Tomohisa KUZUYAMA (Biotechnol. Res. Ctr., Univ. Tokyo)

【目的】A-94964 は Translocase I の阻害活性スクリーニングにより、*Streptomyces* sp. SANK60404 株の培養液から発見された新規ヌクレオシド系抗生物質である [1,2]。A-94964 の構造は不飽和脂肪酸やアミノ糖、リン酸ジエステル、ウリジンが互いに結合したユニークなものとなっており、その生合成研究が新たな酵素の発見や新規有用生理活性物質の創製につながることが期待される。昨年度の当大会において、A-94964 の生合成遺伝子クラスターの初期反応に関与する遺伝子として *orf14* 及び *orf6* を見出したことを報告した [3]。そこで Orf14 と Orf6 の機能を明らかにするために各種解析を行った。
【方法・結果】まずこれらの遺伝子の機能を明らかにするために異種発現実験を行った。異種放線菌 *Streptomyces albus* に *orf14* を導入し、その培養抽出液を LC-MS 解析に供した。その結果、ウリジン骨格にピルビン酸が付加した化合物 1**(1)**と推測されるシグナルが新たに検出された。次に、*S. albus* における *orf14* と *orf6* の共発現株を作製し、その培養抽出液を LC-MS 解析に供した。その結果、化合物 1 の 6'位の炭素が水酸化された化合物 2**(2)**と推測されるシグナルが新たに検出された。以上の結果から Orf14 が初発のウリジン骨格の形成反応を触媒し、Orf6 が 6'位のメチレン炭素の水酸化を担うことが示唆された。次に Orf14 の詳細な機能解析を行うために組換えタンパク質を調製し、*in vitro* での変換実験を試みた。大腸菌を宿主とした組換え系では可溶画分に目的のタンパク質を得ることができなかったため、放線菌を宿主に組換えタンパク質を調製した。得られた Orf14 組換え酵素を用いて、各種ウリジン誘導体とピルビン酸、NAD(P)を基質に変換反応を行ったが新たな化合物の生成は検出されなかった。そこでさらなる基質の検討を行った結果、UDP もしくは UTP をオキサロ酢酸とともに供した際に、化合物 1 の 7'位が酸化した化合物 3**(3)**を検出した。現在化合物 3 の構造決定や Orf14 の反応機構の詳細な解析を試みている。


(1)


(2)


(3)

【参考文献】
(1) R. Murakami, *et al*., J. Antibiot. 61(9): 537-544, 2008.
(2) Y. Funaki, *et al*., J. Antibiot. 61(9): 545-549, 2008.
(3) 白石太郎、西山真、葛山智久、日本農芸化学会 2014 年度大会　2A04p04

nucleoside antibiotics, oxidoreductase, Streptomyces

講演番号：3E11a10
講演日時、会場：3 月 28 日 10:49～ E 校舎 11 会場

新奇 [4+2] 環化付加反応触媒酵素が関与するポリケタイド大環状化機構の解明
Identification of an enzyme that catalyzes [4+2] cycloaddition involved in macrocyclization of polyketides

○橋本 拓哉[1]、橋本 絢子[2]、新家 一男[3]、池田 治生[4]、リウ フンウェン[5]、西山 真[1]、葛山 智久[1] ([1]東大生セ、[2]JBIC、[3]産総研、[4]北里大北里生命研、[5]テキサス大薬)
○Takuya HASHIMOTO[1], Junko HASHIMOTO[2], Kazuo SHIN-YA[3], Haruo IKEDA[4], Hung-wen Liu[5], Makoto NISHIYAMA[1], Tomohisa KUZUYAMA[1] ([1]Univ. of Tokyo, [2]JBIC, [3]AIST, [4]Kitasato Univ., [5]Texas Univ.)

【背景】一般的に大環状ポリケタイドの生合成では、I 型 PKS から放出される際に水酸基やアミノ基によるチオエステルへの分子内求核攻撃により大環状構造が形成される。一方、近年多数のスピロテトロン酸骨格を持つ大環状ポリケタイドが放線菌から取得され、これらは一般的な大環状ポリケタイドとは異なった、[4+2] 環化付加反応により閉環すると提案されている。即ち、共役ジエンとオレフィンとを末端に持つ直鎖状の中間体が PKS から切り出された後、分子内 [4+2] 環化付加反応により特徴的なスピロテトロン酸形成とともに大環状構造が形成される経路が推定されていた。しかしこれまで、この[4+2] 環化付加反応触媒酵素は同定されていない。そこで我々はスピロテトロン酸化合物である versipelostatin (VST) をモデルに [4+2] 環化付加反応を触媒する酵素の探索を行った。
【方法と結果】我々は、すべてのスピロテトロン酸化合物生合成において、互いに相同性を持つ酵素が分子内 [4+2] 環化付加反応を触媒し、スピロテトロン酸の形成を伴って閉環すると推定した。そこで、VST 生合成遺伝子クラスターと既知のスピロテトロン酸化合物の生合成遺伝子クラスターを解析し、すべてに共通して存在する遺伝子を探索した。その結果、すべての生合成遺伝子クラスターにホモログが存在する *vstJ* を見出した。*vstJ* は既知のタンパク質と相同性を示さなかったが、ホモログ間で弱い相同性を示した。*vst* 生合成遺伝子クラスター異種発現株を親株として、*vstJ* の遺伝子破壊株を作製した。培養抽出物の分析の結果、遺伝子破壊株では VST の生産は失われ、代わりに生合成中間体と考えられる化合物 **1** が蓄積した。MS および各種 NMR スペクトルから、化合物 **1** は予想通り、共役ジエンと末端オレフィンを有する直鎖状の中間体であることが判明した。**1** と VstJ の組換え酵素を用いて *in vitro* での機能解析を行った結果、VstJ は **1** を基質に Diels-Alder 様の [4+2] 環化付加反応を触媒し VST と同一の立体化学を持つ 37-デオキシ VST アグリコン (**2**) のみを与えた。予想に反し、非酵素的な環化付加反応は検出されなかった。VstJ の酵素動力学パラメータは k_{cat} が $4.4 \pm 0.3\ min^{-1}$、K_m が $39 \pm 5\ \mu M$ であり、分子内 [4+2] 環化付加反応を触媒する酵素として同定されている SpnF (k_{cat}: $14 \pm 1.6\ min^{-1}$、K_m: $120 \pm 46\ \mu M$) と同等の k_{cat}/K_m を持つことが示された[1]。以上の結果から、VST のスピロテトロン酸形成が VstJ による Diels-Alder 様の [4+2] 環化付加反応を経由することが明らかとなった。VstJ ホモログがすべてのスピロテトロン酸化合物のクラスターに分布していることから他のスピロテトロン酸化合物も同様の機構で形成すると考えられる。
(1): Kim, H. J.; Ruszczycky, M. W.; Choi, S.-h.; Liu, Y.-n.; Liu, H.-w. Nature, 2011, 473, 109.

biosynthesis, Diels-Alder, *Streptomyces*

講演番号：3E11a11
講演日時、会場：3 月 28 日 11:10～ E 校舎 11 会場

粘性細菌 *Sorangium cellulosum* のゲノム由来新規メラニン生合成酵素

Novel melanin biosynthetic enzymes from *Sorangium cellulosum* genome

○曽根 祐輔、中村 修人、金 承榮、鮒 信学 (静県大食栄)
○ YUSUKE SONE, SHUTO NAKAMURA, SEUNG-YOUNG KIM, NOBUTAKA FUNA (University of Shizuoka)

【目的】粘性細菌 *Sorangium cellulosum* のゲノムは約 13 Mbp と原核微生物において最大級であり、二次代謝産物の生合成遺伝子が多数見出されている [1)]。本研究では、*Scellulosum* のゲノムに存在する機能未知の生合成経路の発掘研究を行った。具体的には、III 型ポリケタイド合成酵素（PKS）様遺伝子 SoceCHS1（sce2133）、oxidoreductase 様遺伝子 sce2134、SnoaL 様遺伝子 sce2135 からなるオペロンの機能を解明した。

【方法および結果】RppA は放線菌 *Streptomyces griseus* 由来の III 型 PKS であり、5 分子の malonyl-CoA から 1,3,6,8-tetrahydroxynaphthalene（T4HN）の合成を触媒する [2)]。RppA ホモログである SoceCHS1 は、*Pseudomonas putida* で異種発現させると T4HN の空気酸化物 flaviolin を蓄積する [3)]。我々は、*S. coelicolor* M1146 株を用いて SoceCHS1 オペロンの異種発現を行い、組換え体が蓄積する化合物を HPLC、NMR、MS を用いて解析した。その結果、SoceCHS1 の異種発現株は flaviolin を蓄積したことから、SoceCHS1 は放線菌生体内においても RppA 様の触媒機能を発揮すると考えられる。次に、SoceCHS1 と sce2134 を共発現した結果、組換え体は Scytalone を蓄積した。また、SoceCHS1、sce2134 および sce2135 を共発現させた結果、組換え体は 1,8-dihydroxynaphthalene（1,8-DHN）を蓄積した。

SoceCHS1、sce2134、sce2135 の組換えタンパク質を大腸菌および放線菌を用い調製し *in vitro* 反応を行った。SoceCHS1 は malonyl-CoA から T4HN を与えた。SoceCHS1 と sce2134 を用いた反応では、NADPH 存在下、malonyl-CoA から Scytalone が生成した。Scytalone を基質とし SCE2135 を反応させると 1,3,8-trihydroxynaphthalene（T3HN）が生成した。以上より、SoceCHS1 が T4HN を生産し、SCE2134 が T4HN を還元し Scytalone を生産する。続いて sce2135 が Scytalone を脱水することで T3HN を生産することが判明した。また、SoceCHS1、sce2134 および sce2135 を用いた反応では、NADPH 存在下、malonyl-CoA から 1,8-DHN が生成した。以上より、sce2134 は T3HN の還元し Vermelone を与え、SCE2135 が Vermelone を還元し 1,8-DHN を与えると予想できる。

【考察】1,8-DHN は、植物病原性の糸状菌の付着器形成に必須であることが知られている。原核微生物の 1,8-DHN 生合成経路の生理学的意味に大変興味が持たれる。

1) S. Schneiker *et al. Nat Biotechnol.* **25**, 1281-89 (2007)
2) N. Funa *et al. Nature* **400**, 897-899 (1999)
3) F. Gross *et al. Arch Microbiol.* **185**, 28-38 (2006)

melanin, *Sorangium cellulosum*, RppA

講演番号：3E11a12
講演日時、会場：3 月 28 日 11:21～ E 校舎 11 会場

放線菌 *Streptomyces rochei* の抗生物質生産誘導を司るシグナル分子 SRB の生合成

Biosynthesis of SRB molecule, an inducer of antibiotic production in *Streptomyces rochei*

○波多江 希、津田 直人、木梨 陽康、荒川 賢治（広島大・先端研）
○Nozomi HADAE, Naoto TSUDA, Haruyasu KINASHI, Kenji ARAKAWA (Hiroshima Univ.)

ランカサイジン(LC)、ランカマイシン(LM)生産菌 *Streptomyces rochei* 7434AN4 株のシグナル分子である SRB は、LC・LM 生産を厳密に制御している。SRB はその特異的リセプターSrrA への結合を介して *srrY* の転写活性化を促し、その結果 LC、LM 生産を誘導する。当研究室ではこれまでに本菌のシグナル分子 SRB1 および SRB2 の化学構造（$C_{15}H_{24}O_5$ および $C_{16}H_{26}O_5$）を決定し、これらが最小濃度 40 nM で LC・LM 生産を誘導することを明らかにした。本研究では SRB 合成酵素遺伝子 *srrX* 近傍の P450 遺伝子 *srrO* の機能に着目した。

まず、*srrO* 破壊株の代謝産物解析を行ったところ、LC および LM を通常レベルで生産していた。そのシグナル分子を単離したところ、ESI-MS において 2 つのピークが検出され、分子式は $C_{15}H_{26}O_4$、$C_{16}H_{28}O_4$ であった。これらは SRB と比較して酸素原子が一つ少なく、水素原子が二つ多いことが示された。本化合物の NMR 解析を行ったところ、ブテノライド骨格のスペクトルはよく保存されており、C-6'位近傍のシグナルに差異が認められた。これらのことから本化合物は 6'-deoxo-SRB1、6'-deoxo-SRB2 であることが分かった。化学合成した 6'-deoxo-SRB1 および 6'-deoxo-SRB2 とよい一致を示した。このことは SrrO が SRB の C-6'位の酸化に関与することを示している。また SRBs だけでなく 6'-deoxo-SRBs も LC・LM 生産の誘導活性を持つことが示唆された。

次に、SrrO の 6'-deoxo-SRB1 の変換反応を行った。*S. lividans* TK64 に SrrO 発現プラスミド(pNTT01)または空ベクター(pHSA81)を導入した形質転換体に対して、化学合成により得られた 6'-deoxo-SRB1 を添加し、変換反応を行った。質量分析において SrrO 形質転換体では基質 6'-deoxo-SRB1 の分子イオンピーク($[M^+ + Na]=293$)が消失し、生成物 SRB1 の分子イオンピーク($[M^+ + Na]=307$)が検出された。一方、コントロールでは基質の分子イオンピークが検出された。本発表ではその経緯について詳述する。

biosynthesis, regulatory gene, secondary metabolite

講演番号：3E11a13
講演日時、会場：3 月 28 日 11:32～ E 校舎 11 会場

Characterization of the biosynthetic gene cluster for a spirotetronate antibiotic maklamicin of *Micromonospora* sp. GMKU326

Ratama DADUANG[1], ○Shigeru KITANI[1], Arinthip THAMCHAIPENET[2], Yasuhiro IGARASHI[3], Kazuo SHIN-YA[4], Haruo IKEDA[5], Takuya NIHIRA[1] ([1]Osaka Univ., [2]Kasetsart Univ., [3]Toyama Pref. Univ., [4]AIST, [5]Kitasato Univ.)

The spirotetronate antibiotics are a class of polyketide natural products that exhibit broad biological activities, including antibacterial and antitumor activities. They have a distinct chemical structure of a *trans*-decalin moiety conjugated with tetronate moiety spiro-linked to a cyclohexene ring. Maklamicin was isolated form an endophytic actinomycete *Micromonospora* sp. GMKU326 as a new spirotetronate antibiotic with antimicrobial activity against Gram-positive bacteria. Although almost 60 related spirotetronate antibiotics have been reported from actinomycetes, maklamicin has two unique structural features. First, maklamicin contains a stereogenic center on the substituent of the cyclohexene ring, whereas other spirotetronate antibiotics have an achiral substituent at the same position such as methyl and formyl. Second, the carbon chain connecting the decalin and the cyclohexene units in maklamicin is the shortest ever reported. In this work, we report genetic information to understand biosynthetic mechanisms underlying these two distinct characteristics of maklamicin.

The 152 kb DNA region including maklamicin (*mak*) biosynthetic gene cluster was identified by an *in silico* screening on the *Micromonospora* sp. GMKU326 contig database, using glycerate utilization operon that is necessary for the biosynthesis of the tetronate moiety, together with screening and sequencing of cosmid and BAC clones. Gene disruption analysis and sequence analysis indicated that four typical modular type I PKS genes (*makA1-makA4*) encoding 12 modules are responsible for the polyketide assembly process. A set of five genes (*makB1-makB5*) is highly conserved in the biosynthetic gene clusters of spirotetronate antibiotics, and *makC2*, a cytochrome P450 gene, is estimated to be involved in the modification step to attach the hydroxyl group. Furthermore, the deoxy-maklamicin, produced by the *makC2* disruptant, displayed stronger bioactivity against *Staphylococcus aureus* compared to that of maklamicin. These results provide us the useful information for not only understanding the biosynthetic mechanism of spirotetronate antibiotics but also generating derivatives of maklamicin with significant bioactivity.

Spirotetronate, Endophytic actinomycetes, Diels-Alder reaction

講演番号：3E11a14
講演日時、会場：3 月 28 日 11:43～ E 校舎 11 会場

放線菌由来新規ジテルペン合成酵素遺伝子の解析

Analysis of genes encoding novel diterpene synthase from actinobacteria

○山田 佑樹[1]、小松 護[1]、新家 一男[2]、池田 治生[1] ([1]北里大・北里生命研、[2]産総研)
○Yuki YAMADA[1], Mamoru KOMATSU[1], Kazuo SHIN-YA[2], Haruo IKEDA[1] ([1]Kitasato Univ., [2]AIST)

【目的】

テルペン化合物はこれまでに植物の精油成分として多くの化合物が見出されたが、原核生物では極めて稀な代謝産物として理解されてきた。当研究室ではテルペン骨格を合成するテルペン合成酵素のモチーフ配列およびそれらの配列間の距離等を統計学的に処理して検索する、いわゆる隠れマルコフモデル(HMM)をこの酵素群に適用することによって、細菌のタンパク質データベースから効率良くテルペン合成酵素の候補を抽出することを可能にした。そこで、本研究は新たに作製したモデルを用いて解析を行ない、原核生物由来の新規テルペン骨格を有する化合物を探索することを目的とする。

【方法および結果】

2012 年に 2nd-HMM を用いて公的データベースの細菌タンパク質から 140 種のテルペン合成酵素と推定されるタンパク質を見出した。さらに 2014 年の公的データベースおよび当研究室で解析されたゲノムデータから得た細菌のタンパク質(総数 8,759,463 個、5,152 菌種)を 2nd-HMM で得た 140 種のテルペン合成酵素のアミノ酸配列から新たに作製した 3rd-HMM を用いて検索した結果、262 個ものテルペン合成酵素を推定することができた。これら 262 のテルペン合成酵素のアミノ酸配列の alignment および、その結果の bootstrap 法による系統的解析から、*Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064 および *S. tsukubaensis* 9993 由来の SCLAV_p0765 および STSU_20912 が既知のテルペン化合物と異なる骨格形成に関与することが推測された。そこで、*sclav_p0765* および *stsu_20912* を *S. avermitilis* 大規模染色体 SUKA22 を宿主とした強制発現系に供し、生産される化合物を解析した。構成的強発現プロモーター(*rpsJp*)の下流に geranylgeranyl diphosphate 合成酵素遺伝子を配置し、さらにその下流に各テルペン合成酵素遺伝子を共発現するように連結した。得られた形質転換体の菌体由来ヘキサン抽出物の GC-MS 解析を行なった結果、*sclav_p0765* および stsu_20912 を発現させた形質転換体でいずれも多量のジテルペン化合物の蓄積を観察した。*sclav_p0765* では 4 種のジテルペン化合物を単離し、構造解析を行った結果、これらのうち一つは sea plume から単離された isoelisabethatriene であった。残りの新規化合物 3 種のうち一つは新規な isoelisabethatriene の類似体であったが、他の 2 つのジテルペン化合物(hydrophyrene および hydroprenol)は 6-6-6-6 員環を有する新規骨格のテルペン化合物であった。また、*stsu_20912* は 1 種のジテルペン化合物を単離し構造解析の結果、5-9-5 員環を有する新規ジテルペン化合物であることが明らかになった。

terpene, streptomyces, heterologous expression

講演番号：3E11p02
講演日時、会場：3 月 28 日 14:11～ E 校舎 11 会場

緩い基質特異性を示すペプチドリガーゼの結晶構造からの考察と応用

Crystal structure of novel peptide ligase with broad substrate specificity and its application

野池 基義[1]、松井 崇[2]、小笠原 泰志[1]、森田 洋行[2]、○大利 徹[1] ([1] 北大院工、[2] 富山大和漢研)
Motoyoshi Noike[1], Takashi Matsui[2], yasushi Ogasawara[1], Hiroyuki Morita[2], ○Tohru Dairi[1]
([1]Hokkaido Univ., [2]Toyama Univ.)

【目的】昨年度の本大会で我々は、放線菌が生産するペプチド系抗生物質、pheganomycin（PM）の生合成に関与する新規ペプチドリガーゼについて報告した。本酵素は、L-amidino phenylglycine（PheGly）の *C*-末を ATP を用いてリン酸化し、次いでリボソームで供給された NVKDR（または NVKDGPT）を求核剤に用いてペプチド結合を形成する反応を触媒した[1)]。興味深いことに本酵素は、PM と関連が無い多様なペプチド、例えば人工甘味料であるアスパルテームや昆虫由来の 18 アミノ酸からなる抗菌ペプチドも求核剤として受け入れた。そこで本酵素が示す幅広い基質特異性を理解するため結晶構造解析を行った。また、本酵素の応用面での利用も検討した。

【方法と結果】種々の基質との結晶化を試みた結果、AMP との複合体として結晶を得ることが出来た。解析の結果、配列相同性が 18%と低いが、同じく ATP-grasp superfamily に属する、glycinamide ribonucleotide synthase（PurD）と構造的に類似していることが解った。しかし、本酵素には他の ATP-grasp superfamily 酵素には見られない大きな cavity と、それに続く長い cleft が活性残基周辺に存在した。また、ドッキングシュミレーションにより *N*-末のグアニジノ基の認識に重要な役割を担うと推定されるアミノ酸残基、および求核剤として働くペプチドの認識に関わるアミノ酸残基を見いだすことができ、変異導入実験によりこれらの関与を確認した。以上の実験により、大きな cavity と長い cleft が多様な基質を受けいれるのに重要であることが分かった。
次にこれらの結果を踏まえ、以下の検討を行った。
① 結晶構造解析の結果、さらに幅広い基質が求核剤として利用できる可能性が示唆されたため、アミノ酸以外の化合物が求核剤となるか検討した結果、スペルミンやスペルミジンも基質となった。
② 本酵素は、見方を変えれば種々のペプチドのアミノ末端を L-amidino PheGly でキャッピングする酵素であり，種々のペプチドのペプチダーゼからの保護に有用であると考えられる。現在、本可能性をモデルペプチドと市販エキソペプチダーゼを用いて検討している。
③ PM は抗結核菌活性を持つことから、本酵素を用いて調製した種々の PM 誘導体の抗菌活性を *Mycobacterium smegmatis* を用いて評価した結果、L-amidino PheGly を *N*-末に持つペプチドは何れも活性を示さなかった。現在、活性に必須な官能基の同定を行っている。

[1)] Nat. Chem. Biol., 10.1038/nchembio.1697.

pheganomycin, peptide ligase, biosynthesis

講演番号：3E11p03
講演日時、会場：3 月 28 日 14:22～ E 校舎 11 会場

放線菌が持つペプチドリガーゼオーソログの機能解析-1-

Characterization of novel peptide ligase orthologs in Actinomycetes -1-

○小笠原 泰志[1]、川田 純平[1]、野池 基義[1]、降旗 一夫[2]、大利 徹[1] ([1]北大院工、[2]東大院農生科)
○Yasushi OGASAWARA[1], Junpei KAWATA[1], Motoyoshi NOIKE[1], Kazuo FURIHATA[2], Tohru DAIRI[1] ([1]Grad. Sch. Eng., Hokkaido Univ., [2]Grad. School Agric. Life Sci., Univ. Tokyo)

【目的】前演者が報告したように、我々は放線菌が生産するペプチド系抗生物質、pheganomycin の生合成に関与する新規ペプチドリガーゼを見出した。本酵素は、L-amidino phenylglycine（PheGly）のカルボキシル基を ATP の存在下でリン酸との無水物へと活性化し、次いでリボソームで供給された NVKDR（または NVKDGPT）を求核剤に用いてペプチド結合を形成する反応を触媒する。本酵素のオーソログをゲノムデータベースに探索した結果、一部の放線菌に見出せたため、それらの機能解明を試みた。

【方法と結果】本酵素のオーソログの近傍には、何れも固有な遺伝子群が存在し、クラスターをなしていた。これら遺伝子クラスターの機能を解明するため、3 つの菌株（*Streptomyces mobaraensis*、*Salinispora tropica*、*Micromonospora* sp.）を選択し、オーソログを含む推定生合成遺伝子クラスターを PCR で増幅後、各々異種宿主である *Streptomyces lividans* に導入し、生産物解析を行うことによる機能解明を試みた。形質転換株の培養液を HPLC と LC/MS で分析した結果、*S. mobaraensis* の遺伝子クラスター導入株では 6 つ、*S. tropica* の遺伝子クラスター導入株および *Micromonospora* sp.の遺伝子クラスター導入株ではそれぞれ 1 つずつの特異的ピークが検出された。最後者のピークは、LC/MS 解析により分子量 475 と推定され、また比較的生産性も高かったことから構造解析を試みた。形質転換株を大量培養し、精製後、高分解能質量分析、NMR で構造解析した。得られた化合物は通常のペプチド結合がカルボニルメチレン構造に置き換わったシュードジペプチドを部分構造として有しており、その *N*-末にアミジノアルギニンがアミド結合したシュードトリペプチド構造をしていた。導入したクラスターには、6 つの遺伝子が存在し、両端の遺伝子は、アミジノ基転移酵素（Arg のアミジノ化に関与）と、アミド結合を形成するペプチドリガーゼのオーソログであることから、これらがアルギニンのアミジノ化と、それをシュードジペプチドに結合させる反応を触媒すること、またシュードジペプチドの生合成には、両遺伝子に挟まれた 4 つの遺伝子が関与することが示唆された。

peptide ligase, pseudopeptide, biosynthesis

講演番号：3E11p04
講演日時、会場：3 月 28 日 14:33～ E 校舎 11 会場

放線菌が持つペプチドリガーゼオーソログの機能解析-2-

Characterization of novel peptide ligase orthologs in Actinomycetes -2-

○川田 純平、小笠原 泰志、野池 基義、大利 徹（北大院工）
○Junpei KAWATA, Yasushi OGASAWARA, Motoyoshi NOIKE, Tohru DAIRI (Grad. Sch. Eng., Hokkaido Univ.)

【目的】我々は放線菌が生産するフェガノマイシンの生合成に関与する新規ペプチドリガーゼの機能解析を行ってきた。本酵素は種々のペプチドのアミノ末端を L-amidino PheGly でキャッピングする酵素であるという点で応用の可能性があり、種々のペプチドのペプチダーゼからの保護への応用が期待される。前演者が報告したように、本研究の過程でペプチドリガーゼのオーソログが種々の放線菌に分布していることを見出し、オーソログを含む推定生合成遺伝子クラスターを異種宿主である *Streptomyces lividans* に導入後、生産物解析を行うことによる機能解明を試みた。その結果、*Micromonospora* sp. 由来の遺伝子クラスターの代謝産物はアミジノアルギニンとカルボニルメチレン構造を含むシュードトリペプチドであった。導入した遺伝子クラスターの両端にはアミジノ基転移酵素（Arg のアミジノ化に関与）とペプチドリガーゼがコードされていることから、*N*-末のアミジノアルギニン部は、これら 2 つの酵素により生成すると示唆され、ペプチドリガーゼの *N*-末基質（アミジノ化アミノ酸）に多様性があること、また *C*-末求核剤基質としてペプチド以外も利用可能であること示唆しており、ペプチドリガーゼの更なる応用の可能性を示すものである。そこで、*Micromonospora* sp. 由来のペプチドリガーゼについて組換え酵素を用いて詳細な検討を行った。

【方法と結果】*Micromonospora* sp.由来のペプチドリガーゼについては、シュードトリペプチド生合成の最終段階におけるペプチド結合の生成に関与すると予想される。はじめに予想される基質と大腸菌で発現させた組換え酵素を用いて *in vitro* での反応を行った。その結果、酵素反応の進行を検出することができ、実際に代謝産物の生合成において本ペプチドリガーゼの関与が示された。さらに *C*-末ペプチドを構成するアミノ酸の種類や長さを変えたもの、ペプチドの代わりに L-体のアミノ酸を求核剤基質に用いたところ、ジペプチドでは反応が進行したが、長鎖ペプチドや L-体アミノ酸、および一部のジペプチドでは反応が進行しなかった。また、*N*-末アミジノアミノ酸の基質認識についても検討を行ったので、これらの結果についても報告する。

peptide ligase, pseudopeptide, biosynthesis

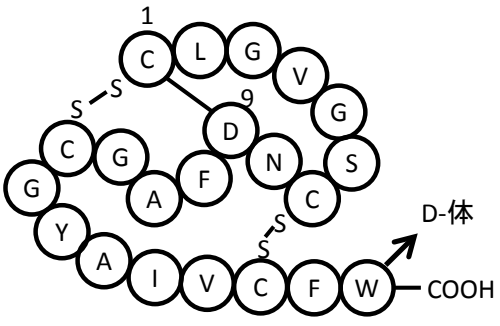
講演番号：3E11p05
講演日時、会場：3 月 28 日 14:44～ E 校舎 11 会場

C-末に D-Trp を持つラッソペプチドの生合成機構
Biosynthesis of lasso peptide MS-271
○野村 智[1]、小笠原 泰志[2]、佐藤 康治[2]、大利 徹[2]（[1]北大工、[2]北大院工）
○Satoshi NOMURA[1], Yasushi OGASAWARA[2], Yasuharu SATOH[2], Tohru DAIRI[2] ([1]Sch. Eng., Hokkaido Univ., [2]Grad. Sch. Eng., Hokkaido Univ.)

【目的】ラッソペプチドである MS-271（*Bioorg. Med. Chem*, **4**, 115, 1996、下図）は、21 アミノ酸からなり、*C*-末の Trp が D 体であるという特徴を持つ。一般的にラッソペプチドは、前駆体がリボソームで合成されることが知られていることから、D-Trp の生成機構に興味を持ち解析を行った。

【方法と結果】MS-271 生合成について、先ずその生合成遺伝子群の取得を目指してドラフトゲノム解析を行った。当初 20 アミノ酸からなり、Phe を *C*-末に持つプレカーサーペプチドに（下図参照）、アミノ酸リガーゼ類で D-Trp を付加すると予想し、MS-271 生産菌のドラフトゲノム中に 20 アミノ酸の配列を探索した。その結果、予想に反し *C*-末の Trp まで含む MS-271 の全配列を持ち 77 アミノ酸からなる前駆体 ORF を見出した。この事実は、*C*-末の Trp が翻訳後にエピメリ化されることを示唆する。通常、放線菌において二次代謝産物の生合成遺伝子はクラスターを成している。近傍の遺伝子群について解析を行った結果、*N*-末の Cys と 9 番目の Asp を架橋すると予想される asparagine synthetase 様遺伝子とジスルフィド結合に関与すると推定される遺伝子 2 つが存在したが、既知のラセマーゼやエピメラーゼと相同性を有する遺伝子は見いだせなかった。しかし、機能未知遺伝子が 1 つ存在し、本遺伝子産物が異性化に関与すると推定した。そこで、これについて組換え酵素を用いて *in vitro* で実証実験を行うことにした。

本反応では、21 アミノ酸からなるペプチドの *C*-末の Trp のみをエピメリ化すると予想され、基質と生成物の分離、同定が困難と考えられる。そこで最初に化学合成した 21 アミノ酸からなる基質ペプチドを用いてアッセイ法の検討を行い、以下の方法を確立した。すなわち ①ペプチドの加水分解、②逆相カラムを用いた HPLC で、UV 吸収を指標に Trp のみを分取、③キラルカラムを用いて D-Trp と L-Trp を分離・分析 することでエピメリ化反応を検出するものである。現在、機能未知遺伝子の組換え酵素の発現を試みており、達成でき次第、*in vitro* 実験を実施する予定である。



MS-271

epimerase, lasso peptide, biosynthesis

講演番号：3E11p06
講演日時、会場：3 月 28 日 15:05～ E 校舎 11 会場

大腸がん原因物質コリバクチンの生合成機構の解明

Generic indoctrination of *E. coli* for producing colibactin

○佐々 侑寿香、石川 格靖、小山 ふみ、福冨 愛実、野口 博司、渡辺 賢二 (静岡県大薬)
○ Yuzuka SASA, Noriyasu ISHIKAWA, Fumi KOYAMA, Manami FUKUTOMI, Hiroshi NOGUCHI, Kenji WATANABE (university of shizuoka)

【背景・目的】コリバクチンは大腸菌 IHE3034 株が哺乳類細胞に感染した後、哺乳類細胞からの何らかのシグナル物質によって誘導される化合物であると予測されている。従って、本化合物の単離は困難であり、未だ部分構造ですら明らかにされていない。一方、大腸がん発症患者の 66.7 %から本菌が検出されている。[1,2] そこで、本化合物の正体を有機化学的に明らかにし、大腸がん形成メカニズムの解明および予防のためのバイオマーカーとすることを目的として研究に着手した。
【方法・結果】既に我々は、上記のコリバクチン生産菌ゲノムを用いてコスミドライブラリーを作成し、目的の生合成遺伝子のクローニングに成功している。得られたコスミドベクターにはコリバクチン生合成に必要と考えられている *clbA~clbQ* までのすべての遺伝子が含まれていることを確認した。大腸菌菌体内で本コスミドベクターにコードされる遺伝子を一挙に発現し目的のコリバクチン産生を試みたが、遺伝子群の機能から予想される生合成産物を確認することはできなかった。そこで、一つ一つ生合成遺伝子を発現し、*in vitro* 反応によって生合成経路の再構築を試みることとした。これまでに、ペプチド合成酵素 (nonribosomal peptide synthase, NRPS) である ClbN より生合成が開始された後、NRPS とポリケタイド合成酵素 (PKS) のハイブリットである ClbB に受け渡されることが報告されていた。[3] そこで ClbN、ClbB の発現ベクターを作製し、これを用い大腸菌を形質転換した。得られた形質転換体の代謝産物を LC−MS に供した結果、ミリスチン酸、D-Asn および L-Ala の縮合体 [3,4] の生成が観測された。本化合物は ClbN と ClbB の NRPS によって生合成されるものであると予測されたため、ClbB の PKS による代謝産物を確認することはできなかった。これは ClbB の C 末端にチオエステラーゼが存在せず、生合成中間体が切り出されなかったことが原因であると考えられた。そこで推定生合成中間体を化学合成し、それを標品として ClbN と ClbB の生合成産物を解析した。その結果、ClbN は *N*-myristoyl-D-asparagine (**1**) を生産していることが明らかとなった。次に、本化合物を ClbB と反応させたところ、ClbB 代謝産物は **1** と L-Ala およびマロン酸の縮合体 (**2**) であることが特定された。続いて、**2** を基質として生合成遺伝子クラスター内に存在する各 PKS と反応させたところ、新規代謝産物中間体を見いだすことに成功した。

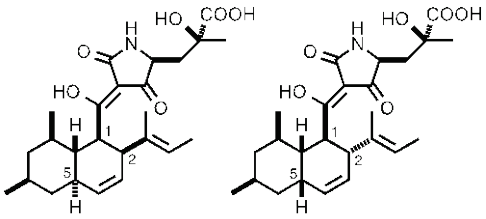
1) Nougayrède, J. P., *et al., Science,* **2006**, *313*, 848; 2) Arthur, J. C., *et al., Science,* **2012,** *338*, 120;
3) Brotherton, C. A., *et al., J. Am. Chem. Soc*., **2013**, *135*, 3359; 4) Vizcaino, M. I., *et al., J. Am. Chem. Soc*., **2014**, *136,* 9244.

colorectal cancer, *E. coli*, biosynthesis

講演番号：3E11p07
講演日時、会場：3 月 28 日 15:16～ E 校舎 11 会場

Diels-Alder 反応による Sch210972 炭素骨格構築機構の証明
Enzyme Catalyzed Stereoselective Intramolecular Diels-Alder Reaction in Biosynthesis of Decalin-Containing Natural Products

○佐藤 道大[1]、八木下 史敏[2]、三野 孝[2]、内山 奈穂子[3]、合田 幸広[3]、野口 博司[1]、Houk Kendall[4]、Tang Yi[4]、渡辺 賢二[1] ([1]静岡県大薬、[2]千葉大院工、[3]国立医薬品食品衛生研究所、[4]カリフォルニア大学ロサンゼルス校)
○Michio Sato[1], Fumitoshi Yagishita[2], Takashi Mino[2], Nahoko Uchiyama[3], Yukihiro Goda[3], Hiroshi Noguchi[1], Kendall Houk[4], Yi Tang[4], Kenji Watanabe[1] ([1]University of Shizuoka, [2]Chiba Univ., [3]NIHS, [4]UCLA)



Sch210972 (**1**)　　**2**

【目的】Sch210972 (**1**) は、糸状菌 *Chaetomium globosum* より単離されたケモカイン受容体阻害活性を有する化合物である (右図)。化合物 **1** は、その化学構造から HPN により生合成されると推測された。化合物 **1** のデカリン骨格は、直鎖のポリケタイド鎖の分子内 Diels-Alder 反応により生成すると考えられ、骨格構造にはアミノ酸としてγ-hydroxymethyl-L-glutamic acid が含まれる。我々はデカリン骨格形成機構を含む **1** の生合成機構の解明を目的とし研究に着手した。
【方法】本化合物はポリケタイド合成酵素と非リボソーム依存性合成酵素のハイブリッド酵素 (HPN) により生合成されると予想されたため、*C. globosum* のゲノム中に存在する HPN を *in silico* 解析により探索した。次に、推定された生合成遺伝子クラスターの破壊株を作製した後、破壊株培養液の解析を行った。
【結果・考察】化合物 **1** の炭素骨格を生合成すると予測された HPN をコードする *cghG* の破壊株抽出物を LC–MS で分析したところ、**1** の生産が消失したことから、本遺伝子を **1** の生合成遺伝子と同定した。また、本遺伝子近傍に存在する遺伝子群の破壊株を作製し、抽出物の解析を行ったところ、*cghA* 破壊株において **1** と同一の分子量かつ UV スペクトルを有する化合物の生産が確認された。X 線結晶構造解析および NMR スペクトル解析の結果、本化合物は **1** と比較してデカリン骨格の C2 および C5 の立体化学が異なるジアステレオマー**2** であることが明らかとなった。また、*cghA* を相補した株の培養液を解析したところ、野生株と同様 *endo* 体 **1** の生産が確認され *exo* 体 **2** の生産は消失した。相同性検索の結果 CghA は機能不明のタンパク質として分類されている。一方で、chaetoglobosin A、cytochalasin E、equisetin といった Diels-Alder 反応の関与が指摘されている天然物の遺伝子クラスター内にも CghA と相同性を示す酵素がそれぞれコードされている。今回得られた実験事実は、CghA が *endo* 選択的 Diels-Alder 反応を触媒する酵素であることを強く示唆したものと言える。

fungal natural products, Diels-Alder reaction, PKS-NRPS

講演番号：3E11p08
講演日時、会場：3 月 28 日 15:27～ E 校舎 11 会場

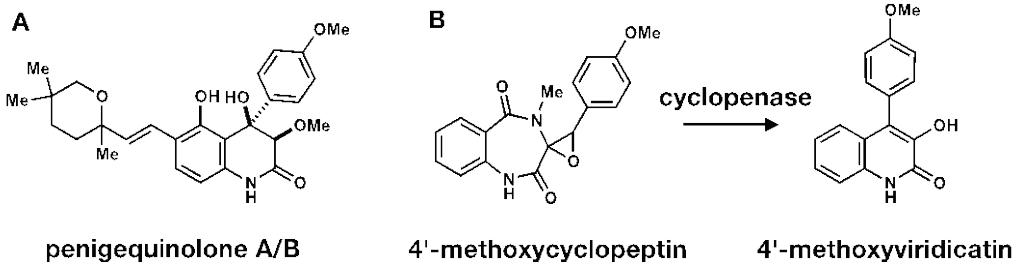
ヘモシアニン型新規キノロン合成酵素の精密機能解析

Hemocyanin-type enzyme catalyzes an oxidation to form the quinolone of penigequinolone

○石川 格靖、野口 博司、渡辺 賢二 (静岡県大薬)
○Noriyasu ISHIKAWA, Hiroshi NOGUCHI, Kenji WATANABE (University of Shizuoka)

【背景・目的】糸状菌 *Penicillium* 属より単離された penigequinolone [1] およびその類縁体 [2] は強力な駆虫活性を有しており、新規農薬リードとして期待されている化合物群である（図 A)。これら化合物群は共通して興味深い 6,6-quinolone 骨格を有している。我々は本 quinolone 骨格形成に関与する酵素の精密機能解析を目的として本研究に着手した。

【方法・結果】これまで、我々のグループによって quinolone 骨格生合成は脱水素反応とエポキシ化反応を触媒する二機能型酸化酵素 AsqJ によって不安定な 4'-methoxycylopeptin のエポキシ体が合成されたのち、自発的に quinolone へと変換される経路を報告した。[3] しかし、生理的条件を模倣するため､緩衝液中に 1 mM の還元型グルタチオンを添加したところ､本変換反応は阻害されることがわかった。従って、penigequinolone 生産菌には quinolone 合成酵素 cyclopenase が存在していると推測された（図 B)。まず、penigequinolone 生産菌である *Penicillium* sp. FKI-2140[2] より cyclopenase の単離を試みた。各種クロマトグラフィーの結果、ほぼ単一のタンパクとして cyclopenase を分離することに成功した。つぎに、本酵素を用いて補酵素・補因子の解析を行ったところ cyclopenase は NAD(P)依存性酸化酵素であると特定された。続いて、本糸状菌の全ゲノム解析を行い、既知の Asq クラスター[3] をクエリーとした相同性検索より penigequinolone 生合成遺伝子クラスターを見出した。つぎに、異種発現系を用いて組換え cylopnease を獲得し、本酵素の精密酵素機能解析を行った。その結果、cyclopenase はこれまでに報告例のない、銅依存型新規ヘモシアニン相同型酵素であった。



【参考文献】

1) Kusano, M., Koshino, H., Uzawa, J., Fujioka, S. Kawano, T., Kimura, Y., *Biosci. Bootechnol. Biochem.* **2000**, *64*, 2559.; 2) Uchida, R., Imasato, R., Yamaguchi, Y., Masuma, R., Shiomi, K., Tomoda, H., Omura, S., *J. Antibiot.* **2006**, *59*, 64.; 3) Ishikawa, N., Tanaka, H., Koyama, F., Noguchi, H., Wang, C. C., Hotta, K., Watanabe, K., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2014***, 53,* 12880.

biosynthesis, quinolone, penigequinolone

講演番号：3E11p09
講演日時、会場：3 月 28 日 15:38～ E 校舎 11 会場

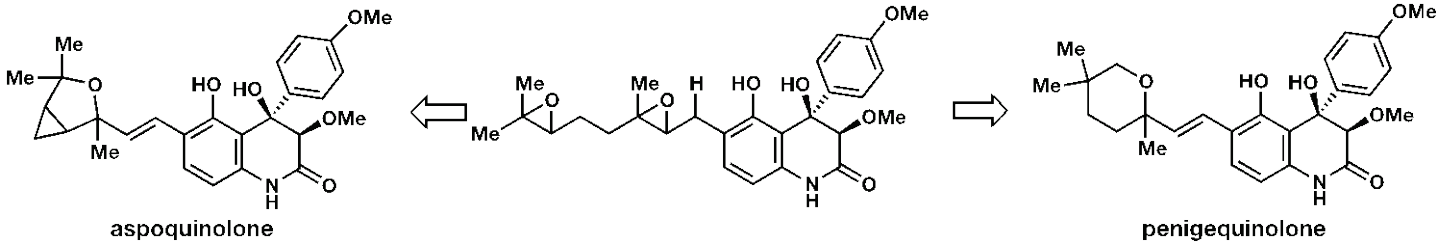
モノテルペン付加型 6,6-キノロン化合物分子多様性の解明

Understanding the generation of chemical diversity observed in aspoquinolone-type of monoterpenoid alkaloid

○平山 裕一郎、石川 格靖、野口 博司、渡辺 賢二（静岡県大薬）
○Yuichiro HIRAYAMA, Noriyasu ISHIKAWA, Hiroshi NOGUCHI, Kenji WATANABE (Univ. of Shizuoka)

【背景・目的】
糸状菌 *Aspergillus nidulans* が生産する aspoquinolone (ASQ)[1] および *Penicillium* sp. FKI-2140 株が生産する penigequinolone (PGQ)[2] は特徴的な 6,6-qunolone 骨格を有するモノテルペン化合物群である。これら化合物群はテルペン部分における環化様式の相違によって作り分けられていると推測された。すなわち、Anti-Baldwin 則に従った場合 ASQ 類を与え、Baldwin 則に従った場合 PGQ 類を与えると推測された。また、このような生体反応は酵素反応によって制御されていると考えられ、その生合成機構は非常に興味深いといえる。そこで、我々はこのような ASQ および PGQ 類におけるテルペン部分生合成機構の解明を試みた。

【結果・考察】
まずはじめに、次世代シークエンサーを用いて *Penicillium* sp. FKI-2140 株の全ゲノムを解析したのち、ASQ 生合成遺伝子 [3] との比較により PGQ 生合成遺伝子クラスターを探索した。相同性検索の結果、ASQ 生合成遺伝子クラスターと類似した生合成遺伝子クラスターを見出し、これを *pgq* 遺伝子クラスターと予測した。次に、本クラスター内のテルペン部分構造形成に関与すると推測された遺伝子を破壊し、各種変異株の代謝産物を解析した。その結果、これまで単離されてこなかった生合成中間体を獲得することに成功した。次に、各種生合成遺伝子を大腸菌および出芽酵母細胞内で異種発現させ、組換え体酵素を獲得した。単離した中間体と精製酵素を *in vitro* で反応し、精密機能解析を試みた。その結果、ASQ および PGQ 類におけるテルペン部分生合成機構を解明することに成功した。



【参考文献】
1) Scherlach, K., Hertweck, C., *Org. Biomol. Chem*., **2006**, *4,* 3517.; 2) Uchida, R., Imasato, R., Yamaguchi, Y., Masuma, R., Shiomi, K., Tomoda, H., Omura, S., *J. Antibiot.* **2006**, *59*, 646.; 3) Ishikawa, N., Tanaka, H., Koyama, F., Noguchi, H., Wang, C. C., Hotta, K., Watanabe, K., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014***, 53,* 12880.

biosynthesis, antibiotics, terpene

講演番号：3E11p10
講演日時、会場：3 月 28 日 15:49～ E 校舎 11 会場

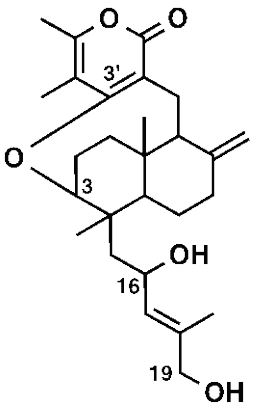
昆虫感染性糸状菌 *Metarhizium anisopliae* ARSEF 23 株由来新規メロテルペノイドの獲得とその生合成研究

Elucidation of the new chemical structure and its biosynthetic pathway of new meroterpenoid

○加藤 広樹[1]、恒松 雄太[1,2]、山本 剛[1]、野口 博司[1]、渡辺 賢二[1] ([1]静岡県大薬、[2]ライプニッツ研究所)
○Hiroki KATO[1], Yuta TSUNEMATSU[1,2], Tsuyoshi YAMAMOTO[1], Hiroshi NOGUCHI[1], Kenji WATANABE[1] ([1]University of Shizuoka, [2]Leibniz Institute)

【背景・目的】 これまで糸状菌からは、lovastatin など医薬分野に大きな影響を与えた有用化合物が多数輩出されている。現在も、秘められたままでいる新規天然物は存在すると考えられており、様々な研究グループで探索が行われている。本研究では、糸状菌 *Metarhizium anisopliae* ARSEF23 株に着目した。本糸状菌はコオロギやバッタなどの昆虫に感染し、死に至らしめることが知られているものの、代謝産物に関する報告は少ない。我々は、*M. aniosopliae* ARSEF23 株 が生産する二次代謝産物を UHPLC—HRESIMS と化合物データベースを組み合わせたケミカルスクリーニング解析を行うことで、新規天然物の獲得を目指した。

【方法・結果・考察】 *M. anisopliae* ARSEF23 株を MYG 培地で培養し、その代謝物を解析した結果、化合物データベースには見られない分子イオンピークを持つ化合物を見出した。HPLC を用いて分離・精製した後、各種 NMR を詳細に解析することで、本化合物が新規メロテルペノイドであることが明らかとなった。本化合物の化学構造は、先に報告された metarhizin 類[1]や sesquicillin 類[2]と同様、ジテルペノイドとα–pyrone を部分構造に有していたが、一方でデカリン環とα–pyrone 環が C3 位と C3’位で環化した 9 員環エーテルを形成していることが明らかとなった。次に *in silico* 解析から本化合物の生合成遺伝子クラスターを予想した。本化合物は化学構造から、テルペノイド–ポリケタイドのハイブリッド化合物であることが考えられた。そこで *M. anisopliae* ARSEF23 株ゲノムシーケンスからテルペン環化酵素および非還元型ポリケタイド合成酵素 (NR–PKS) 遺伝子を含む遺伝子クラスターを探索した。その結果、本化合物を生合成する遺伝子クラスターを 3 つに絞り込んだ。次に、α–pyrone 環の生合成に関与すると予想された PKS 遺伝子について半定量 RT–PCR により、転写活性を調べたところ、この 3 つの中から 1 つの PKS 遺伝子のみ転写活性が認められた。更に、その PKS 遺伝子を *Aspergillus nidulans* A1145 株を宿主として異種発現した。得られた形質転換体の代謝物を LC–MS で解析したところ、α–pyrone 骨格を持つ化合物を生合成することに成功し、目的の遺伝子クラスターを特定するに至った。また、特徴的な 9 員環エーテル形成に関しても、その生合成機構の解析を進めている。



【参考文献】
1) Kikuchi, H., *et al*., *Tetrahedron*, **2009**, *65*, 469; 2) Engel, B., *et al., J. antaibiot.,* **1998**, *51*, 5.

Metarhizium anisopliae, meroterpenoid, biosynthesis

講演番号：3E11p11
講演日時、会場：3 月 28 日 16:10～ E 校舎 11 会場

Aspergillus niger 遺伝子強制発現産物 pyranonigrin の生合成機構の解明
Biosynthetic studies on pyranonigrin, produced by *Aspergillus niger*
○山本 剛[1]、恒松 雄太[1,2]、野口 博司[1]、渡辺 賢二[1] ([1]静岡県大薬、[2]ライプニッツ研究所)
○ TSUYOSHI YAMAMOTO[1], YUTA TSUNEMATSU[1,2], HIROSHI NOGUCHI[1], KENJI WATANABE[1] ([1]University of Shizuoka, [2]Leibniz Institute)

【背景・目的】
糸状菌のゲノム中には数十種類に及ぶ天然物生合成遺伝子クラスターが存在し、実験室での培養条件下では、その多くが転写不活性であることが明らかになっている。我々は糸状菌 *Aspergillus niger* のゲノム中に存在する転写不活性な遺伝子クラスターを強制的に発現させることで、PKS-NRPS (polyketide synthase-nonribosomal peptide synthetase) ハイブリッド酵素によって生合成される化合物 pyranonigrin の生産を確認した[1)]。発現させた遺伝子クラスター内の各種修飾酵素の役割について詳細に検討し、pyranonigrin 生合成機構の解明を目指し研究を行った。
【方法・結果】
強制的に発現させた PKS-NRPS 遺伝子を含む生合成遺伝子クラスターには、メチル基転移酵素や FMO、P450 などの酸化還元酵素が複数含まれていた。それら遺伝子の破壊株培養液に蓄積された化合物の構造から pyranonigrin の生合成機構を推測した。PKS-NRPS ハイブリッド遺伝子を *Aspergillus nidulans* に導入し、異種発現を検討した結果、化合物の生産は認められなかった。しかし、同時にチオエステラーゼを導入した株で pyranonigrin 生合成中間体が蓄積し、PKS-NRPS ハイブリッド酵素からの基質の切り離しには、クラスター内に存在するチオエステラーゼが必須であることが明らかになった。その際、ラベル化アミノ酸を用いた実験により、NRPS で導入されるアミノ酸は L-Ser であることを確認した。また、メチル基転移酵素の破壊株培養液中には生合成中間体と推測される複数の化合物の蓄積が認められたが、単離した化合物を基質として用いた変換反応は進行しなかった。一旦生成した中間体が菌体内で本化合物の本来の生合成とは直接関係のない生体反応によって与えられた化合物であることが示唆された。
続いて各種酸化還元酵素の役割について検討した。生合成遺伝子クラスター内の各遺伝子の破壊株培養液に蓄積された生合成中間体の構造から、γ-pyrone 環の形成には FMO と P450 が関与していることが推測された。それらの酵素について酵母を宿主とした異種発現、さらに大腸菌発現系を構築することによって獲得した組換え酵素を用いて、生合成中間体の変換反応を検討した結果、予想した FMO と P450 が段階的に働き、pyrone 環骨格を形成していることが明らかになった。

1) 山本剛、恒松雄太、野口博司、渡辺賢二、日本薬学会第 134 年会、28N-am04

Aspergillus niger, pyranonigrin, Biosynthesis

講演番号：3E11p12
講演日時、会場：3 月 28 日 16:21～ E 校舎 11 会場

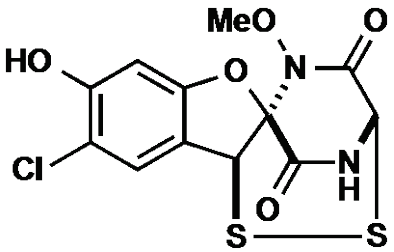
Aspergillus oryzae が生産するマイコトキシン aspirochlorine の生合成

Biosynthesis of the halogenated mycotoxin aspirochlorine in Koji mold, *Aspergillus oryzae*

○恒松 雄太[1,2]、Chankhamjon Pranatchareeya[1]、渡辺 賢二[2]、Hertweck Christian[1] ([1]ライプニッツ研究所、[2]静岡県大薬)
○ Yuta TSUNEMATSU[1,2], Pranatchareeya Chankhamjon[1], Kenji Watanabe[2], Christian Hertweck[1] ([1]Leibniz Institute, [2]Univ. Shizuoka)

[背景・目的]

麹菌 *Aspergillus oryzae* は清酒、味噌、醤油等の製造に用いられていることから、我が国の発酵産業界にとって重要な糸状菌の一種である。本糸状菌は強力なマイコトキシンである aflatoxin を生産する *Aspergillus flavus* と近縁種であるが、そのゲノム中に含まれる aflatoxin 生合成遺伝子には一部欠失が認められ、遺伝子レベルでその安全性が証明されている [1]。加えて、日本における長年の食経験からもその安全性が信じられていた。ところが近年、我々のグループはゲノム解読株 *A. oryzae* RIB40 株を様々な条件にて培養し、本株より別のマイコトキシンである aspirochlorine (**1**) が生産されていることを見出した [2]。すなわち、ここに今一度、本糸状菌の安全性を科学的に評価する必要性が生じている。本研究では、**1** の化合物生産機構を明らかにすることを志向し、まずはその生合成機構の化学的解明を目指した。



aspirochlorine (1)

[方法・結果]

遺伝子破壊実験、同位体標識実験、大腸菌にて調製した精製酵素による *in vitro* 実験等から、**1** の生合成遺伝子クラスターを特定した。本化合物は NRPS (nonribosomal peptide synthetase) によるフェニルアラニンの二量化を皮切りに、炭素−炭素結合開裂、炭素−硫黄結合生成、炭素−硫黄結合の転位、FAD 依存型ハロゲン化酵素 AclH による芳香環塩素化を含む種々の興味深い変換反応を経て生合成されることが明らかとなった。

1) Kato, N., *et al., JSM Mycotoxins* **2014**, *64*, 197-206.
2) Chankhamjon, P., *et al., Angew. Chem. Int. Ed.* in press.

Aspergillus oryzae, aspirochlorine, mycotoxin biosynthesis

講演番号：3E11p13
講演日時、会場：3 月 28 日 16:32～ E 校舎 11 会場

Bacillus clausii におけるイソプレノイド生合成経路：多機能性 *E* 型プレニル鎖伸長酵素の同定とセスクアテルペン代謝物の探索

Biosynthetic pathway of isoprenoids in *Bacillus clausii*: identification of multifunctional *E*-prenyltransferases and search for sesquarterpene metabolites

○上田 大次郎、村上 瑞気、山鹿 宏彰、佐藤 努 (新潟大学院自然)
○Daijiro Ueda, Mizuki Murakami, Hiroaki Yamaga, Tsutomu Sato (Niigata Univ.)

以前、我々は、*Bacillus* 属細菌のセスクアテルペン（C_{35}）の生合成研究から、新型のテルペン環化酵素（TS）を発見した [1)]。さらに、*B. clausii* の TS ホモログ（Bcl-TS）が非環状のセスタテルペン/トリテルペン合成酵素であることを提案した [2)]。しかし、Bcl-TS の基質である C_{25} と C_{30} のポリプレニル二リン酸（GFPP と HexPP）が *B. clausii* に存在することの証明が不十分であった。今回、*E* 型プレニル鎖伸長酵素（E-PT）ホモログ解析によってその証明を行った。さらに予期せず見いだされた C_{35} の経路についても解析したので合わせて報告する。

B. clausii の E-PT ホモログは 2 種類しか存在しない。1 つはホモオリゴマー型の E-PT1 であり、もう一つはヘテロオリゴマー型の E-PT2-S/L である。E-PT1 は今回初めて解析され、DMAPP (C_5)から FPP (C_{15})と GGPP (C_{20})を生成することが判明した。一方、E-PT2-S/L の機能解析については、pCold TF で発現した TF 融合体のものを以前報告していたが [3)]、今回、pCold I で発現させたものについて新たに解析した。その結果、DMAPP、FPP および GGPP をアリル型基質としたときに、C_{25}, C_{30} および C_{35} が生成されることが分かった。以前の結果では DMAPP とは全く反応しなかったことから、DMAPP から直接 C_{25}－C_{35} を生成する経路が今回初めて見いだされた。

E-PT の解析結果から、C_{35} の経路が存在することが示唆された。すでに、微量成分の新規セスクアテルペン炭化水素を同定していた [4)]。今回、メナキノン（MK）の生産量を分析したところ、予期せず、MK-7 (側鎖が C_{35})が主であることが判明した（MK-5:MK-6:MK-7 = 0:9:91）。この結果はテルペン炭化水素の鎖長分布と大きく異なっており（C_{25}:C_{30}:C_{35} = 57:39:4）、E-PT2-S/L の下流酵素（Bcl-TS や未同定の新規メナキノン生合成経路の酵素）の基質特異性もイソプレノイドの生成分布に影響を与えていることが推測された。

以上のように、E-PT1 と E-PT2-S/L を各々、二機能性 FPP/GGPP と三機能性 GFPP/HexPP/HepPP 合成酵素と同定し（後者は初）、Bcl-TS の基質である GFPP と HexPP の存在を証明した。さらに、E-PT の機能解析から C_{35} の経路が示唆され、セスクアテルペン代謝物とその生成分布を明らかにすることができた。本研究を通して、本菌において、一つの多機能性 E-PT のあいまいな生成物特異性がイソプレノイドの多様性を創出し、E-PT の下流酵素の基質特異性もイソプレノイドの生成分布に影響を与えていることが示唆された。 【文献】1) T. Sato *et al*. *JACS*, *133*, 9734 (2011). 2) T. Sato *et al*. *ChemBioChem.*, *14*, 822 (2013). 3) 日本農芸化学会 3A06a12 (2012). 4) 日本農芸化学会 2C22p07 (2013).

prenyltransferase, terpene synthase, menaquinone

講演番号：3E11p14
講演日時、会場：3 月 28 日 16:43～ E 校舎 11 会場

Bacillus megaterium 由来ファルネシルファルネシルアセトンの単離と非酵素的なメナキノンの開裂
Isolation of farnesylfarnesylacetone from *Bacillus megaterium* and non-enzymatic cleavage of menaquinone

○岡本 渉、佐藤 努（新潟大学院自然）
○Wataru Okamoto, Tsutomu Sato (Niigata Univ.)

最近、我々は、*B. megaterium* から二機能性テルペン環化酵素やオノセロイド合成酵素のようなユニークなテルペン生合成酵素を見いだしており [1,2]、今回 *B. megaterium* に存在するテルペノイド生合成経路のさらなる探索を行った。

B. megaterium 菌体から、未知化合物 **1** を検出できた。菌体をケン化処理（15% KOH/MeOH、70-80℃、30 分間）すると **1** が多く検出されたため、アルコール体またはカルボン酸をもつ化合物を予想した。最適温度 37℃と比較して高温の 42℃で約 6 倍の **1** を生産したため、42℃で 30 L 培養した。ケン化処理せずに **1** を 0.54 mg 単離し、構造決定したところ、予想に反し、ケトン基をもつファルネシルファルネシルアセトン（C_{33}）であった。天然物としては初めての発見であった。

メナキノンのケン化処理によってポリプレニルアセトンが生成される反応が、以前から提案されている [3]。しかし、実験的証明はないため、今回、*B. megaterium* が生産することが知られているメナキノン-7（MK-7）をケン化処理した。その結果、約 33%の収率で **1** の生産を確認することができ、実証できた。さらに、**1** の生成機構を明らかにする実験を行った。メナキノンからポリプレニルアセトンの生成反応として、UV 照射下で発生する活性酸素の一種の一重項酸素によるペルオキシドを経た開裂反応が知られている [4]。我々は、ケン化処理中に酸素分子が活性酸素に変化して類似の反応を引き起こしていると考え、嫌気条件下で反応を行ったところ、予想通り **1** の収率を約 2%にまで抑制できた。さらに、MeOH 中室温で KO_2 によって処理したところ、**1** が生産された。また、アルカリ処理のみ（15% KOH/MeOH、室温、30 分間）または加熱処理のみ（MeOH、70-80℃、30 分間）では **1** を生成しなかった。以上のことから、15% KOH/MeOH を加熱した際に酸素分子が KO_2 に変化し、活性酸素の一種のスーパーオキシドアニオンが MK-7 の開裂反応を引き起こし、**1** が生成されたと考えられた。

Bacillus 細胞において高温ストレスによって活性酸素が発生することが知られている [5]。今回、42℃の高温で培養したことから、菌体内に活性酸素が発生したと考えられる。*in vitro* 実験において、温和な条件で KO_2 によって **1** が生成されたことから、菌体内においても活性酸素によって非酵素的に MK-7 から **1** が生成されたと考えられる。

【文献】1) T. Sato *et al.*, *JACS 133*, 17540 (2011). 2) D. Ueda *et al*, *JACS 135*, 18335 (2013). 3) L. Cloes L & N. Polgar *J. Chem. Soc. (C)* 2376 (1968). 4) C.D. Snyder & H. Rapoport *JACS*, *91*, 731 (1969). 5) M. Mols & T. Abee, *Environ. Microbiol*., *13*, 1387 (2011).

polyprenylacetone, menaquinone, reactive oxygen species

講演番号：3E11p15
講演日時、会場：3 月 28 日 16:54～ E 校舎 11 会場

海洋性粘液細菌由来ポリケチド haliangicin の生合成スターターに関する研究

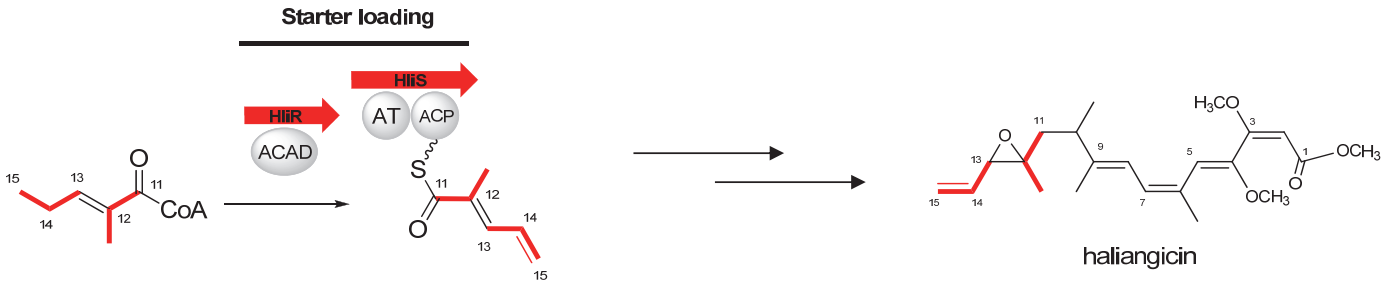
Studies on the biosynthetic starter of haliangicin, a marine myxobacterial polyketide

○孫 雨偉、宮野 聖史、鈴木 彰、柘植 尚志、小鹿 一（名大院・生命農）
○Yuwei SUN, Seishi MIYANO, Akira SUZUKI, Takashi TSUGE, Makoto OJIKA (Nagoya Univ., Grad. Sch. Bioagric. Sci.)

【目的】粘液細菌は難培養性微生物であり、これまで注目されてこなかったが、近年、培養条件が徐々に確立されるに伴って、数多くの新規性の高い抗生物質を生産できることが分かり、注目を集めつつある。Haliangicin は、最初の海洋性粘液細菌 *Haliangium ochraceum* から発見された抗真菌性ポリケチドである。生産菌は特に希少で難培養性な海洋性粘液細菌であるため、我々は haliangicin 生合成遺伝子の異種発現による効率的な生産を目的として研究を行ってきた。これまでに培養が比較的容易な粘液細菌 *Myxococcus xanthus* での異種発現に成功し（宮野ら、2009 年度大会）、得られた異種発現株を用いて安定同位体取り込み実験を行うことで haliangicin の生合成単位を明らかにした（孫ら、2013 年度大会）。今回、haliangicin のスターター生合成機構に着目し、それに関するいくつかのユニークな酵素の機能解析を試みた。

【方法・結果】Haliangicin の生合成遺伝子クラスター（*hli*, 50 kb）を解読した結果、ポリケチド鎖伸長反応に直接関わる 4 つの PKS 遺伝子や数々の修飾酵素をコードする遺伝子が見出された。その遺伝子群の中に、acyl-CoA dehydrogenase をコードする *hliR* 及び AT-ACP ドメインを持つ *hliS* が haliangicin のスターター生合成に関与すると考えている。アミノ酸配列の相同性検索により、HliS はローディングモジュールとして、スターター分子の選別及び保持を行うと推定した。一方、HliR はユニークな short chain acyl-CoA dehydrogenase であり、スターター分子の末端オレフィンの形成に関わると予測した(図)。

HliR の詳しい生合成機能を解析するため、まず haliangicin 生合成遺伝子の *M. xanthus* 異種発現株を用いて遺伝子破壊を行った。*HliR* 破壊株の二次代謝産物を分析した結果、水素化された類縁体 14,15-dihydrohaliangicin の生産が検出された。続いて、大腸菌を宿主とし His_6-tag を持つ HliR の強制発現を試みた。得られた組換え HliR を *in vitro* 酵素反応で解析したところ、FAD 存在下で基質 2-メチル-2-ペンテノイル SNAC の γ,δ 脱水素を触媒することが分かった。



haliangicin, myxobacteria, polyketide

講演番号：3E11p16
講演日時、会場：3 月 28 日 17:15～ E 校舎 11 会場

ジャスモン酸処理したイネ葉における β-tyrosine の蓄積
Accumulation of β-tyrosine in jasmonic acid-treated rice leaves

○網干 貴子[1,2]、Yan Jian[3]、寺石 政義[2]、石原 亨[4]、奥本 裕[2]、Jander Georg[3]、森 直樹[2] ([1]山形大農、[2]京大院農、[3]コーネル大、[4]鳥取大)
○Takako Aboshi[1,2], Jian Yan[3], Masayoshi Teraishi[2], Atsushi Ishihara[4], Yutaka Okumoto[2], Georg Jander[3], Naoki Mori[2] ([1]Yamagata Univ., [2]Kyoto Univ., [3]Cornell Univ., [4]Tottori Univ.)

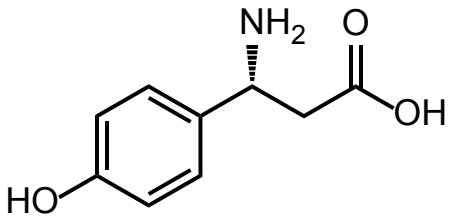
【目的】

植物は食害や病原菌感染に対してテルペンなどの揮発成分や抗菌物質の生産など化学的な応答を起こす。これまでに、植物から様々な生理活性物質が報告されてきているが、同定されている化合物は植物が持つ化学物質の全体のほんの一部と考えられる。本研究ではイネ *Oryza sativa* を用い、植物ホルモンであるジャスモン酸により誘導される成分の解析から、イネの新規誘導性代謝物の同定を試みた。

【方法・結果】

第３葉が完全に展開したイネ幼苗（品種：日本晴）に 1 mM ジャスモン酸水溶液を噴霧し、２日後に地上部を刈り取りメタノールで抽出した。抽出物をアミノ酸誘導体化試薬である 6-aminoquinoyl-*N*-hydroxysuccinimidyl carbamate（AQC）で処理し、LC/ESI-MS で分析したところ、コントロールと比較して増加している未知成分（*m/z* 352、positive ion mode）を検出した。AQC により誘導体化されたα-tyrosine と同じ *m/z* を示したことから、本化合物を構造異性体のβ-tyrosine であると推測した。そこで市販の Boc-β-tyrosine を trifluoroacetic acid により脱保護し、β-tyrosine とした後に、AQC で誘導体化して LC/MS で分析したところ、未知成分と保持時間が一致した。さらに、別のアミノ酸誘導体化試薬である ethyl chloroformate でイネ抽出物を処理し、GC/MS で分析したところ、保持時間、フラグメントパターンがともにβ-tyrosine の誘導体と一致するピークが検出された。以上の結果から、未知成分をβ-tyrosine と同定した。植物からのβ-tyrosine の同定は本研究が初めてである。

また、*O*-phtaldialdehyde と *N*-acetyl-L-cysteine による誘導体化法でβ-tyrosine の立体異性を検討したところ、3-(*R*)-β-tyrosine であることが分かった。



3-(*R*)-β-Tyrosine

jasmonic acid, rice, induction

講演番号：3E11p17
講演日時、会場：3 月 28 日 17:26～ E 校舎 11 会場

植物ホルモンによるイネ新規代謝物 β-チロシン の誘導と分布
Distribution and induction of β-tyrosine in rice by plant hormones
○前坂 佳宏[1]、網干 貴子[2]、寺石 政義[1]、奥本 裕[1]、石原 亨[3]、吉永 直子[1]、小野 肇[1]、西田 律夫[1]、森 直樹[1] ([1]京都大農、[2]山形大農、[3]鳥取大農)
○ Yoshihiro MAESAKA[1], Takako Aboshi[2], Masayoshi Teraishi[1], Yutaka Okumoto[1], Atsushi Ishihara[3], Naoko Yoshinaga[1], Hajime Ono[1], Ritsuo Nishida[1], Naoki Mori[1] ([1]Kyoto Univ, [2]Yamagata Univ, [3]Tottori Univ)

【目的】
植物は、植食性昆虫の食害や病原菌の感染などのストレスに対し、テルペンなどの揮発成分の放出や抗菌物質の生産など、化学的な応答を起こす。これらの化学的応答には、植物ホルモンがシグナル伝達物質として重要な役割を果たしている。我々の研究グループでは、ジャスモン酸処理したイネ(日本晴)で、誘導性代謝物としてβ-チロシンを報告した。本研究では、代表的な植物ホルモンのサリチル酸、オーキシン、サイトカイニン、ジベレリン、エチレンに対するβ-チロシンの誘導と植物体各部位における分布を調べた。

【方法・結果】
1 mM のジャスモン酸、サリチル酸、オーキシン、サイトカイニン、ジベレリンとエチレン前駆体で 2-クロロエチルホスホン酸(エテホン®)を、第 3 葉完全展開のイネ幼苗に対して 1 回/12 時間の間隔で 4 回処理し、2 日後に地上部を刈り取りメタノールで抽出した。抽出物をアミノ酸誘導体化試薬である 6-アミノキノリル-*N*-ヒドロキシスクシンイミジルカルバメートで処理し、LC/MS を用いてβ-チロシン量を測定した。その結果、エチレン処理でβ-チロシンが誘導される傾向にあり、反対にサリチル酸では抑制された。オーキシン、サイトカイニン、ジベレリンでは有意な増減は観察されなかった。さらに、水耕栽培イネを用いて各部位（葉、種、根）のβ-チロシンの蓄積量および根からの滲出量を比較した結果、葉に多く蓄積されていることがわかった。
また、野生イネの *Oryza rufipogon* 26 系統におけるβ-チロシンの有無と生合成遺伝子の分布を調べたところ、β-チロシンを持つ系統と持たない系統があった。

rice, β-tyrosine, plant hormon

講演番号：3E11p18
講演日時、会場：3 月 28 日 17:37～ E 校舎 11 会場

イネのジャポニカ種およびインディカ種におけるファイトアレキシン、サクラネチンの蓄積

Accumulation of the rice phytoalexin, sakuranetin in japonica and indica cultivars

○北野 生薫[1]、西口 沙也加[1]、吉本 理子[2]、中島 廣光[1]、藪田 行哲[1]、上中 弘典[1]、寺石 政義[3]、奥本 裕[3]、森 直樹[3]、石原 亨[1]([1]鳥取大院農、[2]鳥取大農、[3]京都大院農)
○Takashige KITANO[1], Sayaka NISHIGUCHI[1], Riko YOSHIMOTO[2], Hiromitsu NAKAJIMA[1], Yukinori YABUTA[1], Hironori KAMINAKA[1], Masayoshi TERAISHI[3], Yutaka OKUMOTO[3], Naoki MORI[3], Atsushi ISHIHARA[1] ([1]Graduate School of Agriculture, Tottori Univ., [2]Faculty of Agriculture, Tottori Univ., [3]Graduate School of Agriculture, Kyoto Univ.)

【目的】植物は病原菌の感染を受けると様々な防御機構を発現し身を守る。このような防御機構の一つにファイトアレキシンの蓄積が挙げられる。イネにおいてもジテルペン型とフラボノイド型あわせて 15 種類のファイトアレキシンが報告されている。一方で、イネはインディカ種とジャポニカ種の 2 つの亜種に分類される。しかし、亜種間におけるファイトアレキシン生産性の違いについてはあまり調べられていない。そこで、ジャポニカ種の日本晴とインディカ種のカサラースの葉をジャスモン酸で処理して、誘導されてくる代謝物を調べた。その結果、フラボノイド型のファイトアレキシンであるサクラネチンが日本晴では多く生成し、カサラースでは少ないことが分かった。この違いの原因を調べるために日本晴とカサラースの戻し交配自殖系統群を用いた QTL 解析を行ったところ、前駆物質のナリンゲニンからサクラネチンへのメチル化を触媒する酵素 naringenin-7-*O*-methyltransferase（NOMT）をコードする遺伝子に原因があることが示唆された。本研究では、これを確認するために日本晴とカサラースの葉にジャスモン酸を処理し、NOMT 活性や NOMT 遺伝子の転写産物の蓄積量を測定した。また、NOMT 遺伝子配列の違いについても検討した。

【方法･結果】播種後 2 週間の日本晴とカサラースの第三葉を 1 mM のジャスモン酸溶液で処理した。一定時間後に粗酵素を抽出して NOMT 活性を測定した。その結果、カサラースに比べて日本晴では NOMT 活性が高いことが分かった。次に、ジャスモン酸で処理した葉から RNA を抽出して NOMT 遺伝子の転写産物の蓄積量を Real-Time PCR で測定した。その結果、日本晴はカサラースより多量の NOMT 転写産物を蓄積していた。このことから、日本晴ではカサラースと比較して NOMT 遺伝子の発現量が大きいため、NOMT 活性が高く、さらにサクラネチンの生成量も大きくなることが明らかになった。続いて、日本晴とカサラースにおいて NOMT 遺伝子の配列を比較した。カサラースでは NOMT 遺伝子の上流 1 kbp 以内の領域に大きな欠損が 3 ヶ所で見られた。これらの違いが NOMT の発現量の違いに反映されていると考えた。また、ORF でも塩基配列に違いがあり、その結果アミノ酸の置換が生じることが分かった。このアミノ酸の置換も NOMT 活性に差が生じる原因の一つである可能性が想定される。

rice, phytoalexin, sakuranetin

講演番号：3E11p19
講演日時、会場：3 月 28 日 17:48～ E 校舎 11 会場

酵母細胞壁成分の散布によりハツカダイコン（*Raphanus sativus* L. cv. *Raphanus sativus*）に誘導されるグルコラファサチンの同定

Identification of glucoraphasatin in *Raphanus sativus* L. cv. *Raphanus sativus* induced by spraying yeast cell walls extract

○森田 智也[1]、吉永 直子[1]、高崎 智子[2]、北川 隆徳[2]、安原 貴臣[2]、新開 茂樹[3]、小野 肇[1]、西田 律夫[1]、森 直樹[1]（[1]京大院農・応用生命、[2]アサヒグループホールディングス、[3]東果大阪株式会社）
○ Tomoya MORITA[1], Naoko YOSHINAGA[1], Tomoko TAKASAKI[2], Takanori KITAGAWA[2], Takaomi YASUHARA[2], Shigeki SHINKAI[3], Hajime ONO[1], Ritsuo NISHIDA[1], Naoki MORI[1]
([1]Kyoto Univ., [2]Asahi Group Holdings,Ltd., [3]TOKA OSAKA Co.,Ltd.)

【目的】
酵母抽出液は，植物防御応答を誘導する物質として古くから研究されている．ダイズ（*Glycine max*）子葉に酵母抽出液を塗布すると，ファイトアレキシンであるグリセオリンが誘導される．また，マメ科タルウマゴヤシ（*Medicago truncatula*）の細胞培養液に酵母抽出液を添加すると，フェニルプロパノイド生合成系が活性化される. そのエリシターは, 細胞壁由来の β−glucan であると考えられている．本研究は，酵母細胞壁成分をハツカダイコン（*Raphanus sativus* L. cv. *Raphanus sativus*）葉に散布し，誘導される代謝物を同定した.

【方法・結果】
①第一葉が展開したハツカダイコンに酵母細胞壁成分を散布した．24 時間後に第一葉を 80 % メタノールで抽出し LC/MS で分析したところ，プロトン脱離イオンとして *m/z* 418 の成分の誘導を確認した．次に，80 % メタノール抽出液とジクロロメタンを混合し，ジクロロメタン相を回収した．これを加熱し，揮発成分を捕集した後，GC/MS で分析したところ，イソチオシアネートが検出された．これより，誘導された成分はグルコシノレートであると推定された.
②誘導が確認された成分を単離し，ミロシナーゼ処理を行った．揮発成分を捕集し GC/MS で分析したところ，4-methylthio-3-butenyl isothiocyanate (Fig. 1) を検出した．また，ミロシナーゼ処理液にオキシム化・TMS 化を施し，GC/MS 分析を行ったところ，glucose を検出した.
③グルコシノレートを HPLC により精製し NMR 分析を行った．Glucose はアグリコンと*β*-チオグルコシド結合をし，アグリコンはトランス型であった．以上の結果から，誘導された成分は glucoraphasatin (Fig. 2) と同定した．Glucoraphasatin の分解により生じる 4-methylthio-3-butenyl isothiocyanate には強い抗菌活性があると報告されている.

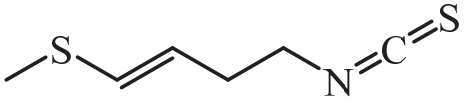


Fig. 1　4-Methylthio-3-butenyl isothiocyanate の構造

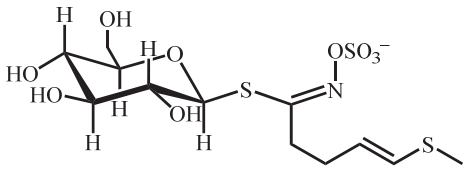


Fig. 2　Glucoraphasatin の構造

plant, secondary metabolism

講演番号：3E11p20
講演日時、会場：3 月 28 日 17:59～ E 校舎 11 会場

リンゴ果実に傷害により誘導されるトリテルペン 2α,19α-dihydroxy-3-oxo-12-ursen-28-oic acid の同定

Identification of the triterpene, 2α,19α-dihydroxy-3-oxo-12-ursen-28-oic acid, induced in apple fruit by injury

○森田 沙代[1]、吉永 直子[1]、森 直樹[1]、石栗 陽一[2] ([1]京大院農、[2]青森産技セ りんご研)
○Sayo MORITA[1], Naoko YOSHINAGA[1], Naoki MORI[1], Yoichi ISHIGURI[2] ([1]Kyoto Univ., [2]Aomori Prefectural Industrial Technology Research Center)

【目的】
リンゴ果実はモモシンクイガ幼虫の食害を受ける．樹に着果している果実に侵入した幼虫の生存率は樹から切り離した果実に侵入した幼虫の生存率と比べ低いことが報告されている [1)]．植物は二次代謝産物を合成して病害虫から身を守ることから，食害によって誘導される何らかの二次代謝産物がその要因となっていることが示唆される．その要因となる物質の探索を試みた．

【方法・結果】
健全リンゴ果実およびモモシンクイガ幼虫に食害されたリンゴ果実をメタノールで抽出し，LC/MS 分析に供した．食害果実のみに，互いに類縁体と思われる 3 つの物質のプロトン付加イオン $[M+H]^+$ として，(1) *m/z* 487, (2) *m/z* 485, (3) *m/z* 489 を確認した．このうち (1) を高速液体クロマトグラフィーを用いて精製し，NMR を用いて構造決定した．その結果，文献値との比較から (1) はトリテルペン 2α,19α-dihydroxy-3-oxo-12-ursen-28-oic acid と同定した [2)]. (1) はバラ科ダイコンソウやビワなどに存在し [2), 3)], 抗腫瘍活性 [3)]や HIV-1 プロテアーゼの阻害活性 [2)]をもつ. (1) が誘導される条件を調べると，(1) はリンゴ果実を針で刺すだけで誘導され，モモシンクイガ幼虫の食害は必要なかった．(1) がリンゴの病害虫抵抗に寄与しているかどうかは不明だが，可食部に生理活性物質が誘導されることは興味深い. 今後 (1) のリンゴ自身においての生理的な役割及び，樹についたリンゴ果実で特異的に食害誘導される物質の探索を行う．

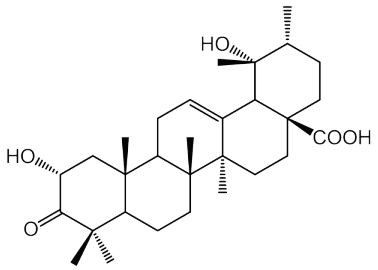


Fig.1 2α,19α-dihydroxy-3-oxo-12-ursen-28-oic acid の構造式

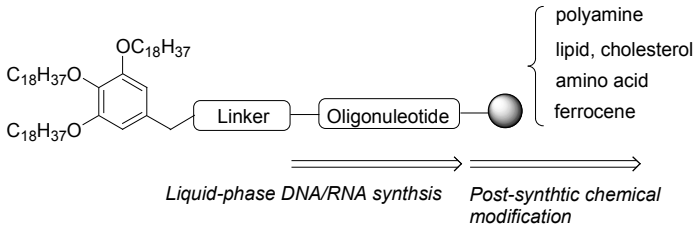
1) Ishiguri, Y., Toyoshima, S. *Appl. Entomol. Zool.,* 41, 685-690, 2006
2) Xu, H. X. et al, *J. Nat. Prod.* 59, 643-645, 1996
3) Taniguchi, S. et al, *Phytochem.* 59, 315-323, 2002

apple fruit, triterpene, injury induction

講演番号：3E21a01
講演日時、会場：3 月 28 日 09:00～ E 校舎 21 会場

可溶性支持体用いた修飾核酸の液相合成
Liquid-Phase Synthesis of Modified Nucleotides by Using Alkyl-Chain-Soluble Support
○福冨 弘貴、小路 貴生、金 承鶴、千葉 一裕（東京農工大学）
○Hiroki FUKUTOMI, Takao SHOJI, Shokaku KIM, Kazuhiro CHIBA (Tokyo Univ. of Agri. and Technol.)

【目的】人工核酸は，医薬品や診断薬など多くの分野で応用されており，新たな機能の創出や活性向上のため，積極的に研究されている．とりわけ，医薬品としては臨床研究においてその有効性が実証されるようになってきており，低コストで量産化可能な核酸製造技術が強く求められるようになってきている．核酸を製造する技術は，固相法に基づく化学合成を基盤としている．この方法は，不溶性の固相樹脂を用い，ホスホロアミダイト化された核酸モノマーを逐次伸長していく方法であり，自動合成機も開発されている．しかし各反応工程では，大量の洗浄溶媒を用いることや，高価なアミダイト試薬を過剰量用いるなど，高コストで大量の廃棄物を排出する問題がある．我々の研究室ではこれらの課題を解決するため，新たに「可溶性支持体」[1] を開発し，反応性の向上と分離操作の簡便化を実現できる，効率的な反応システムの構築に取り組んできた．当該可溶性支持体を用いることで，21 残基の RNA をグラムスケールで合成を実現できる．固相法に比べ，工程数が少なく高価なアミダイト試薬が大幅に削減されたため，コスト的に非常に優位性のある合成法であることが示された．本研究では，可溶性支持体を用いた反応システムを利用することによって，合成困難なターゲットである人工核酸の合成に取り組むこととした．
【方法】化学修飾としては，膜透過性を向上させる脂質やポリアミン，電気応答可能なフェロセンなど，従来カップリング効率の低かった種々のレポーター分子を用い，可溶性支持体に結合した核酸に導入した．
【結果】その結果，多様な機能性分子が，可溶性支持体に結合した核酸分子に対して，効率的に導入されることが明らかになった．さらに，疎水性基質，極性基質，これらに相応する各生成物などが混在した反応溶液から，ターゲット物質のみを迅速に分離することが可能になり，高い純度で生成物を得ることができるようになった．



Reference：[1]Kim, S.; Matsumoto, M.; Chiba, K. *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 8615–8620

Liquid-Phase synthesis, RNA, Soluble support

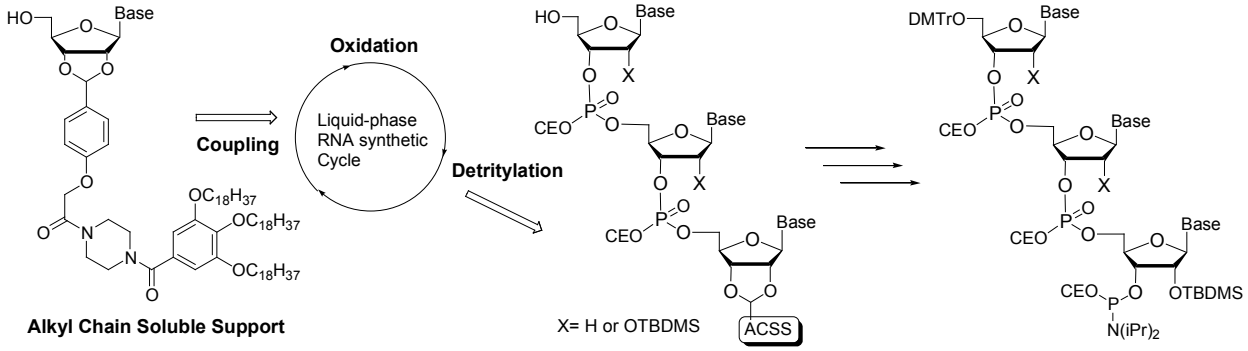
講演番号：3E21a02
講演日時、会場：3 月 28 日 09:11～ E 校舎 21 会場

可溶性液相支持体を用いた液相核酸合成の開発

Liquid-Phase Synthesis of Oligonucleotides by Using Alkyl Chain Soluble Support

○松野 佑紀、小路 貴生、金 承鶴、千葉 一裕（東農工大農）
○Yuki MATSUNO, Takao SHOJI, Shokaku KIM, Kazuhiro CHIBA (Fac. Agr. Tokyo Univ. of Agri. and Technol.)

【緒言】
近年，核酸医薬の著しい発展を前に，低コストで量産化できる核酸合成技術の開発が強く求められている．現在，核酸医薬を製造する技術は，固相法を用いた化学合成法を基盤としている．これは，不溶性の固相樹脂を支持体として核酸モノマーを伸長させる技術であり，精製等の操作の簡便さや短時間での合成が可能であることから，核酸オリゴマーを効率良く合成する手法として，自動合成機の基盤とされている．しかし，この手法は，不溶性の固相樹脂を支持体としているため，各反応工程において大量の洗浄溶媒と高価なアミダイト試薬を用いることから，大量の廃棄物を排出し高コストになるといった課題がある．我々は以前に，これらの課題を克服する可溶性支持体について報告している．[1] 本支持体は，溶媒の選択によって分散と凝集を自在に制御できるため，反応段階では基質となる核酸分子を反応液に対して均一に分散させることで高い反応性を示す一方，分離段階では凝集させ，濾過等で迅速に分離させることができる．また，工程数の低下，高価なアミダイト試薬を削減できるため，コストを抑えたより効率的な核酸合成が可能となる．
【方法および結果】
本研究では，より穏和な条件での支持体の切り出しを目指し，先述の可溶性支持体を基軸とした新規可溶性支持体を開発した．当該支持体は，核酸糖骨格の 2’，3’位に対してベンジリデンアセタール骨格を形成するため，支持体からの切り出しが DDQ を用いた穏和な中性条件下で可能となる．本法は，ホスホロアミダイト法により合成される核酸オリゴマーの各種保護基を保持できるため，フラグメントとしての応用等，可溶性支持体を用いた核酸合成法のさらなる発展が期待される．



Reference：[1]Kim, S.; Matsumoto, M.; Chiba, K. *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 8615–8620

liquid-phase synthesis, soluble support, oligonucleotides

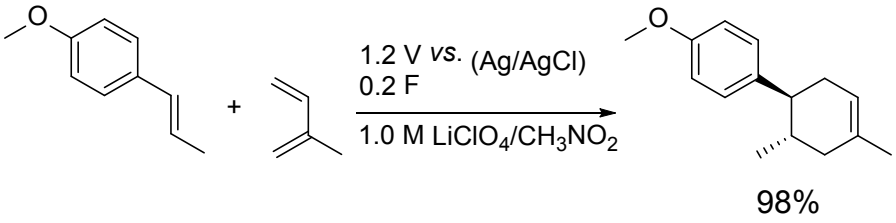
講演番号：3E21a03
講演日時、会場：3 月 28 日 09:22～ E 校舎 21 会場

陽極酸化により誘起されるラジカルカチオンディールスアルダー反応の開発
Electrochemically-Induced Radical Cation Diels-Alder Reaction
○尾崎 惇史、山口 勇将、岡田 洋平、北野 克和、千葉 一裕（東京農工大学）
○Atsushi OZAKI, Yusuke YAMAGUCHI, Yohei OKADA, Yoshikazu KITANO, Kazuhiro CHIBA
(Tokyo University of Agriculture and Technology)

ディールスアルダー反応は炭素環骨格を構築する上で最も有用な反応の一つである．その反応メカニズムについては十分に理解されており，一般的に電子豊富なジエンと電子不足なジエノフィルを基質として用いた場合に反応は容易に進行する．一方でどちらの基質も電子豊富な場合はほとんど反応が進行せず，高温・高圧などの過酷な反応条件を必要とする．

このような電子的にミスマッチな基質によるディールスアルダー反応に対して，極性転換は最も効果的なアプローチとなる．極性転換により本来，求核種として振る舞う電子豊富な基質は一電子酸化を経て非常に求電子的なラジカルカチオンに変換される．つまり電子豊富なオレフィンから発生したラジカルカチオンは系中のジエンに補足されディールスアルダー生成物を与えることが可能である.[1] ラジカルカチオンを反応活性種としたディールスアルダー反応はラジカルカチオンディールスアルダー反応と呼ばれている．電極電子移動は最もシンプルに極性転換を起こすことが可能な手法であり，ラジカルカチオンディールスアルダー反応にも応用されてきた.[2]

我々はこれまでに電解質溶液として過塩素酸リチウム/ニトロメタン溶液を用いた，陽極酸化により誘起される炭素–炭素結合形成反応について報告してきた.[3] 陽極酸化により誘起されるラジカルカチオンディールスアルダー反応についても我々は効率的に反応を進めることに成功し(Scheme 1)，本発表ではその詳細な反応メカニズムについて報告する．



Scheme 1

参考文献

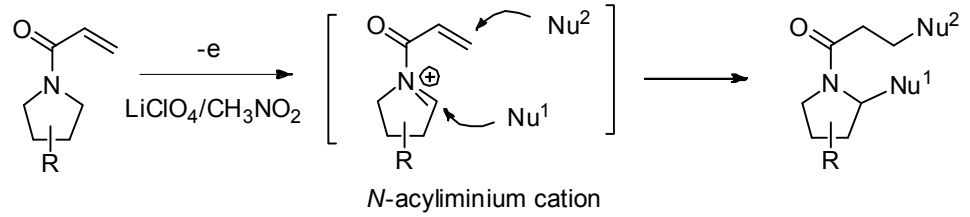
1. Bellville, D. J.; Wirth, D. D.; Bauld, N. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 718.
2. Mlcoch, J.; Steckhan, E. *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 1081.
3. (a) Okada, Y.; Shimada, K.; Kitano, Y.; Chiba, K. *Eur. J. Org. Chem.* **2014**, 1371.
   (b) Yamaguchi, Y.; Okada, Y.; Chiba, K. *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 2626.

radical cation, Diels-Alder reaction, electrochemistry

講演番号：3E21a04
講演日時、会場：3 月 28 日 09:33～ E 校舎 21 会場

陽極酸化を用いたピロリジン誘導体の効率的な変換法
Development of an efficient synthetic method to construct a pyrrolidine library using anodic oxidation
○原谷 涼奈、小路 貴生、金 承鶴、千葉 一裕（東京農工大学）
○Suzuna HARAYA, Takao SHOJI, Shokaku KIM, Kazuhiro CHIBA (Tokyo Univ. of Agri. and Technol.)

【目的】
ピロリジン環を持つ化合物は,天然物や医薬品に広く含まれており，現在においても重要な合成ターゲットとして多くの合成方法が開発されている．我々はこれまで，$LiClO_4/CH_3NO_2$ を用いた有機電解法によりピロリジンの N-α位に対して,直接官能基を導入できる合成法を開発してきた.この反応は穏和な条件下で，脱離基を導入することなく，選択的に C-H 結合を活性化できるため，非常に効率的であり，プロリン誘導体など多くの基質に適用できる．しかし，窒素上への化学修飾は，酸化電位や脱保護などの問題から，多様なライブラリーを構築する上で大きなボトルネックになっていた．もし，N－アクリロイルピロリジン誘導体において，電解活性化後，求電子性の異なる各位置に対して，求核剤を選択的に導入することができれば，ピロリジンライブラリーを迅速かつ簡便に作り出すことができる．さらに，これまで窒素上への導入が困難であった多くの官能基にまで応用することが可能になる．本研究では，N－アクリロイルピロリジン誘導体の N-α位 C-H を選択的に活性化することで，従来困難であったピロリジンライブラリーを効率的に構築できる合成システムの開発を目的とした．特に本反応をプロリン，プロリノール誘導体に応用することで，人工アミノ酸，人工核酸の合成に応用した.
まず，N-アクリロイルプロリンメチルエステルが $LiClO_4/CH_3NO_2$ 溶液における電解酸化によって，各種求核剤が選択的に目的の位置に導入されるかを検討した．その結果，アリルトリメチルシラン，トリメトキシベンゼンなどの炭素求核剤、核酸塩基の窒素求核剤が選択的に導入されることが明らかになった．これらの生成物に対してチオール基をマイケル付加させることで，目的の生成物が効率良く合成された．本反応を利用することで，これまで合成困難であった疎水性プロリン，蛍光プローブを導入した核酸アナログの合成も可能になった.

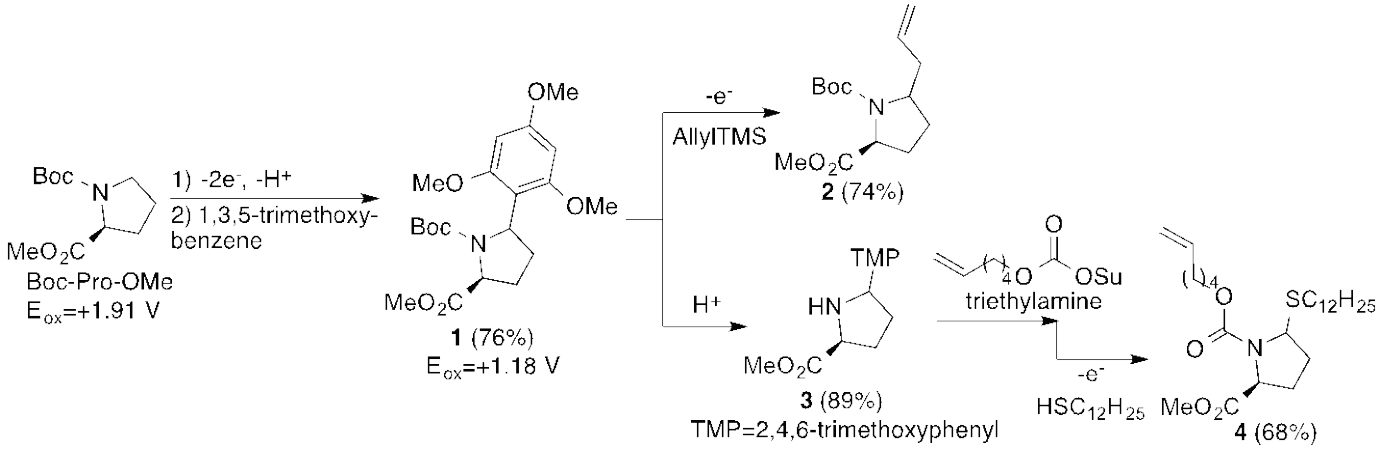


anodic oxidation, pyrrolidine, proline

講演番号：3E21a05
講演日時、会場：3 月 28 日 09:44～ E 校舎 21 会場

2,4,6-trimethoxyphenyl 基を酸化脱離基として用いた電気化学的プロリン修飾法の開発
Anodic Substitution Reaction of Proline Derivatives using the 2,4,6-Trimethoxyphenyl Leaving Group
○小路 貴生、金 承鶴、山本 圭介、河合 朋充、岡田 洋平、千葉 一裕（東京農工大学）
○Takao Shoji, Shokaku Kim, Keisuke Yamamoto, Tomomitsu Kawai, Yohei Okada, Kazuhiro Chiba (Tokyo Univ. of Agri. and Technol.)

【目的】 有機電解法を用いた N-acyl 化合物の陽極置換反応は，pyrrolidine や proline 骨格の含む化合物の誘導体合成において有用な手法の一つとなっている．一方，当該手法には，N-acyl 構造と競合して酸化される官能基を有する基質の N-α位選択的な酸化や，N-α位に-OMe や-SAr 等の脱離基を有する N-acyl 化合物の N 方向への修飾が困難という課題がある．これらの課題は，
1）N-acyl 構造が比較的高い酸化電位を持つ
2）N 原子保護基の脱保護により生成する HN-C-OR/-SR 構造の中間体が不安定
という 2 点に由来している．上記の課題を解決するため，N-acylproline の酸化電位の低下と C-C 結合よる中間体の安定化の効果が期待された 2,4,6-trimethoxyphenyl（TMP）基を酸化脱離基として用いた新たな電気化学的 proline 修飾法を開発した．
【方法と結果】 1.0 M $LiClO_4$/$MeNO_2$-50 mM AcOH 混合溶媒中 0℃条件下で Boc-Pro-OMe を陽極酸化後，1,3,5-trimethoxybenzene の添加により 5 位に trimethoxyphenyl（TMP）基を有するプロリン誘導体 **1** を高収率で得た。さらに，化合物 **1** の低電位陽極酸化によって，TMP 基が Allyl 基に置換された生成物 **2** を高収率で得ることができた。また，化合物 **1** の N 末端保護基を酸性条件下で脱保護することで合成中間体 **3** が容易に得られた。中間体 **3** を原料とし，N-acyl と競合的に酸化されやすい olefin 構造を N 末端へ導入した化合物においても，TMP 基の酸化的脱離及び陽極置換反応が効率よく進行した．
以上の結果より，TMP 基の導入が N 末端方向への構造多様化と N-α位選択的な陽極置換反応に非常に



有効であることが示唆された．

Electroorganic synthesis, Proline, C-C bond dissociation

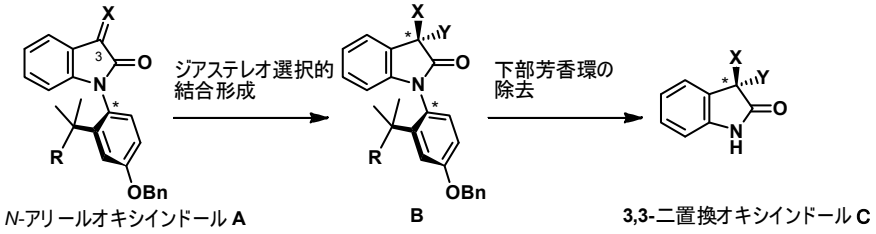
講演番号：3E21a06
講演日時、会場：3 月 28 日 10:05～ E 校舎 21 会場

分子内不斉 *N*-アリール化を利用した C-N 軸性キラリティを有するオキシインドールの合成

Stereocontrolled synthesis of oxindole with axial chirality in C-N bond utilizing asymmetric intramolecular *N*-arylation

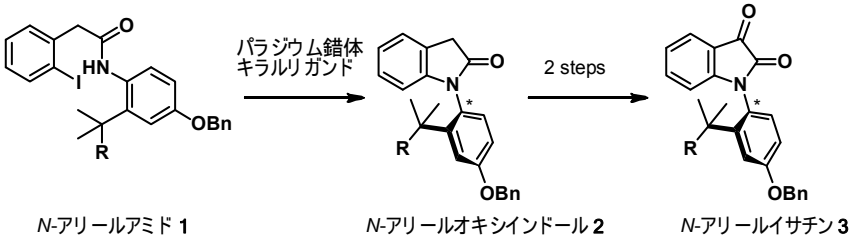
○宮川 敬太朗、西川 俊夫、中崎 敦夫 (名大院生命農)
○ Keitaro MIYAGAWA, Toshio NISHIKAWA, Atsuo NAKAZAKI (Graduated School of Bioagricultural Sciences, Nagoya Univ.)

【目的】3 位に不斉中心を有するオキシインドールアルカロイドは天然物に多く見られ、これまで多くの合成法が研究されてきた。当研究室では、軸不斉を用いた 3,3-二置換オキシインドールの合成法の開発を行ってきた (Scheme 1)[1,2]。すなわち、窒素原子上に嵩高い芳香環を持つ *N*-アリールオキシインドール **A** の 3 位へ種々の結合形成反応を行うと、C-N 軸不斉の影響で 3 位が立体制御されたオキシインドール **B** が得られるものである。また、**B** の下部アリール基は温和な条件で除去が可能である。これまでジアステレオ選択性を確認するため、用いてきた **A** はラセミ体であったが、今回キラルな *N*-アリールオキシインドールの不斉合成を検討したので報告する。



Scheme 1

【方法・結果】*N*-アリールアミド **1** に対してパラジウム錯体とキラルなリガンドを作用させて分子内不斉 *N*-アリール化を検討したところ、良好な光学純度で *N*-アリールオキシインドール **2** を得ることができた(Scheme 2)。得られた **2** は 2 工程の変換で、すべての共通中間体である *N*-アリールイサチン **3** へと変換することができた。



Scheme 2

References
1 A. Nakazaki, A. Mori, S. Kobayashi, T. Nishikawa, *Tetrahedron Lett*. **2012**, *53*, 7131-7134.
2 中崎敦夫、森綾子、小林進、西川俊夫、日本農芸化学会 2012 年度大会、講演要旨集

axial chirality, 3,3-disubstituted oxindole, *N*-aryl oxindole

講演番号：3E21a07
講演日時、会場：3 月 28 日 10:16～ E 校舎 21 会場

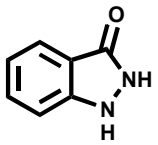
L-プロリンを触媒に用いたインダゾロン誘導体のメタルフリー合成法の開発

L-Proline -Catalyzed Synthesis of Indazolone Derivatives under Transition-Metal-Free Conditions

○辻井 美穂、園田 素啓、谷森 紳治（阪府大院生命環境）
○Miho Tsujii, Motohiro Sonoda, Shinji Tanimori (Osaka Pref. Univ.)

【目的】

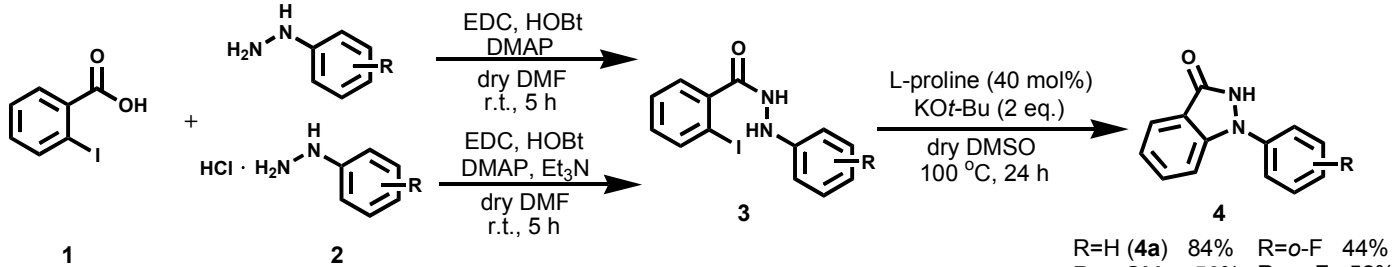
含窒素複素環化合物は、医薬品や農薬、電子材料など幅広い分野で利用されている。インダゾロンもその一つであり、様々な医薬品の開発における重要な構造モチーフとして、近年、注目を集めている。インダゾロン誘導体の合成法としては、パラジウムや銅などの遷移金属触媒を用いる反応が多く報告されているが、遷移金属はグリーンケミストリーの観点から有害であり、また、高価であるといった問題点がある。そこで本研究では、安価で入手容易、かつ環境負荷が低いアミノ酸を触媒として用いることにより、環境調和型 C–N カップリング反応を開発し、インダゾロン誘導体の新規合成法の確立を目指した。



Indazolone

【方法と結果】

まず、2-ヨード安息香酸 **1** と種々のヒドラジン誘導体、またはその塩酸塩 **2** を脱水縮合させ、酸ヒドラジド **3** を高収率で得た。そこで、合成した酸ヒドラジド体 **3a**（R=H）をモデル基質として、分子内 C–N カップリング反応の最適化について検討した。その結果、触媒量の L-プロリン（40 mol%）を用い、KO*t*-Bu（2 当量）の存在下、DMSO 中 100 ℃、24 時間反応させたところ、最も高い収率（84%）で期待したインダゾロン誘導体 **4a** が得られた。次に、これを最適条件として、フェニルヒドラジン由来の芳香環上にメトキシ基やフルオロ基を有する酸ヒドラジドを用いて、分子内 C–N カップリング反応を行ったところ、置換基の位置にかかわらず、中程度の収率で相当するインダゾロン誘導体 **4** を合成することに成功した。現在、収率の向上について検討を行うとともに、適用可能な基質の拡大を目指して、酸ヒドラジド **3** の安息香酸側に置換基を有する誘導体の合成、およびそれらの環化反応についても検討している。



R=H (**4a**) 84% R=*o*-F 44%
R=*o*-OMe 56% R=*m*-F 52%
R=*p*-OMe 72% R=*p*-F 55%

Indazolone, L-Proline, Transition-Metal-Free

講演番号：3E21a08
講演日時、会場：3 月 28 日 10:27～ E 校舎 21 会場

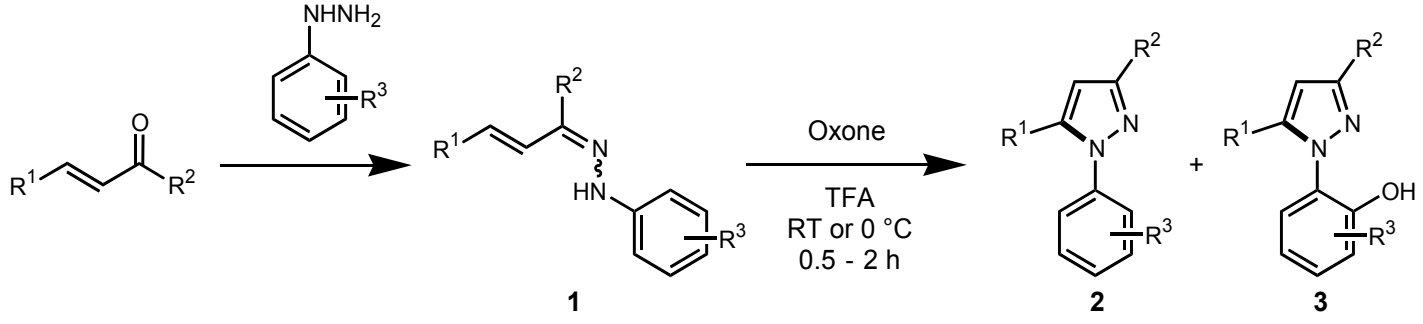
オキソンを用いた酸化的分子内 C-H アミノ化による多置換ピラゾールの効率的合成

Efficient Synthesis of Di/Tri-substituted Pyrazoles using Oxone via Oxidative Intramolecular C-H Amination

○柏 充裕、園田 素啓、谷森 紳治（阪府大院生命環境）
○Mitsuhiro KASHIWA, Motohiro SONODA, Shinji TANIMORI (Osaka Pref. Univ.)

【諸言】ピラゾールは顕著な生理活性を示すものが多く，医薬品や農薬の開発を行う上で重要な構造モチーフの一つとなる．例えば，抗炎症剤，抗菌剤，殺虫剤，さらには電子材料に至るまで広範な用途にピラゾール類が活用されている．したがって，誘導体合成のためのピラゾール類の効率的合成法の開発が強く求められている．本研究では，様々な誘導体が容易に合成可能なヒドラゾン **1** を出発物質とした酸化的環化反応によるアリールピラゾール類 **2** の簡便な合成法を開発し，ライブラリー構築を目指した．

【実験方法と結果】まず，市販のシンナムアルデヒドとフェニルヒドラジンより合成したヒドラゾン体 **1a**（R^1=Ph, R^2=R^3=H）をモデル基質に用い，環化反応を種々の条件で試みた．その結果，トリフルオロ酢酸（TFA）溶媒中，酸化剤として 1.5 当量の Oxone（$2KHSO_5$-$KHSO_4$-K_2SO_4 の混合物）を用いて 0 ℃，2 時間の反応条件により，目的としたピラゾール体 **2a** が 78%の収率で生成した．また興味深いことに，ピラゾール環の 1 位に置換しているフェニル基のオルト位が選択的にモノヒドロキシ化されたフェノール誘導体 **3a** も 12%で得られた．これを最適条件として，芳香環上に様々な置換基を有するヒドラゾン誘導体 **1** を用いて反応を行ったところ，中程度から良好な収率で対応するピラゾール体 **2** およびフェノール体 **3** が得られた．さらに R^2=Me の誘導体を用いた反応では，室温，反応時間 30 分の条件において，フェノール体 **3b** が主生成物として得られることが分かった（69%）．今後はこちらについても検討する予定である．



1 **2** **3**

2a: R^1=Ph, R^2=R^3=H, 78%; **3a**: 12%
2b: R^1=Ph, R^2=Me, R^3=H, 0%; **3b**: 69%

Pyrazole, Oxidative cyclization, C-H Amination

講演番号：3E21a09
講演日時、会場：3 月 28 日 10:38～ E 校舎 21 会場

フラン、アルキン、二級アミンを用いた三成分カップリングによる 3－ヒドロキシアントラニル酸エステルのワンポット合成

Convenient Synthesis of 3-Hydroxyanthranilate Derivatives by Three-component Coupling of Furan, Alkyne, and Secondary Amine in One-pot

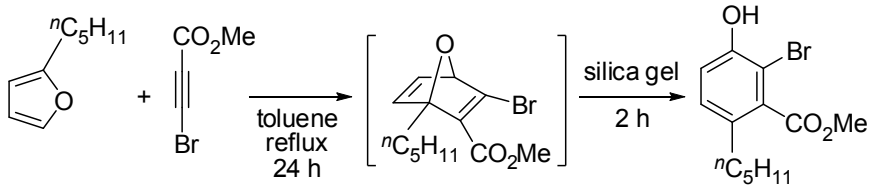
○園田 素啓[1]、篠原 広幸[2]、早金 直哉[2]、北 翔太[2]、小川 昭弥[2]、谷森 紳治[1]([1]阪府大院生命環境、[2]阪府大院工)

○Motohiro SONODA[1], Hiroyuki SHINOHARA[2], Naoya HAYAGANE[2], Shota KITA[2], Akiya OGAWA[2], Shinji TANIMORI[1] ([1]Grad. Sch. of Life and Env. Sci., Osaka Pref. Univ., [2]Grad. Sch. of Engineering, Osaka Pref. Univ.)

【諸言】

アミノヒドロキシ安息香酸誘導体は，5－アミノサリチル酸（抗炎症作用など）や 3－ヒドロキシアントラニル酸（抗酸化活性など）のように，さまざまな生理活性・薬理活性を示すものが多く知られ，新規医農薬品，化粧品，食品添加剤などの開発が期待される重要な化合物群の一つである．しかし，これらの誘導体の合成は，一般に多段階を要し，また，先に導入した官能基の電子的および立体的影響を受けるため，高収率かつ高選択的な合成法の開発が強く望まれている．一方，当研究室では，立体的込合いの少ない非平面のオキサノルボルナジエン誘導体からの開環芳香族化反応に着目し，ベンゼン環に複数の置換基を有する多置換芳香族化合物の合成法の開発を行っている（Scheme 1）[1)]．

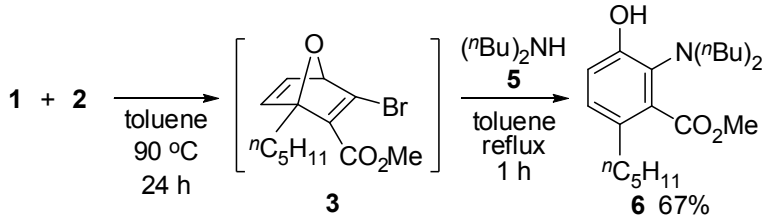
本研究では，この反応の応用展開として，臭化オキサノルボルナジエン誘導体 **3** にアミンを作用させることにより，フラン類，臭化アルキン，およびアミンの三成分カップリングによる 3－ヒドロキシアントラニル酸誘導体のワンポット合成法の開発を目的とした．



Scheme 1

【実験方法と結果】

まず，2-ペンチルフラン（**1**）とブロモプロピオル酸メチル（**2**）をトルエン溶媒中，90°C で加熱して臭化オキサノルボルナジエン **3** とした後，種々のアミンを添加して反応を検討した．その結果，二級アミンであるジ－*n*－ブチルアミン（**5**）を用い，トルエン還流条件にて 1 時間反応させることにより，3-ヒドロキシアントラニル酸エステル（**6**）を収率 67%で得た（Scheme 2）．本反応では，**1** と **2** の Diels－Alder 反応の後，**5** とのアザマイケル付加反応，脱 HBr，および開環芳香族化を経て **6** に至ったものと考えている．



Scheme 2

1) Sonoda, M. *et al. Tetrahedron Lett.* **2011**, *52*, 6238–6241; *ibid.* **2014**, *55*, 5302–5305.

3-Hydroxyanthranilate, Three-component coupling, Furan

講演番号：3E21a10
講演日時、会場：3 月 28 日 10:49～ E 校舎 21 会場

酸化銀によるシナピルアセテートの酸化カップリング
Oxydative coupling of sinapyl acetate by silver oxide
○岸本 崇生、高橋 奈々、濱田 昌弘、中島 範行（富山県大工）
○Takao KISHIMOTO, Nana TAKAHASHI, Masahiro HAMADA, Noriyuki NAKAJIMA (Toyama Pref Univ)

【はじめに】リグニンは、*β-O*-4, *β-β*, *β*-5, 5-5構造などの様々な単位間結合をもつ、複雑なバイオポリマーである。モノリグノールのラジカルカップリングにより形成される。樹木中のリグニンの50~60%は*β-O*-4構造であり、リグニンの物理的化学的性質に大きな影響を与えている。近年のバイオマス研究の進展により、ケナフなどの非木材繊維中のリグニンの構造に注目が集まっている。これらのリグニンは、シリンギル核の割合が高いこと、アセチル基などのアシル基をもつこと、*β-O*-4構造が80%以上の比率を占めることがわかっている。本研究では、このような*β-O*-4構造の多いリグニンの形成過程を理解し、ラジカルカップリングの制御による選択的な分子形成に応用するため、アセチル基をもつシナピルアルコールの酸化銀によるラジカルカップリングについて検討した。
【結果と考察】西洋わさびペルオキシダーゼ(HRP)/H_2O_2によるシナピルアルコールの酸化カップリングでは、高選択的にレジノール(*β-β*)構造を形成することが知られている。そこで、シナピルアルコールの*β-O*-4 構造の形成過程の研究には、HRP/H_2O_2系は不適当と考え、HRP/H_2O_2と同様に一電子酸化作用のある Ag_2O を用いて、シナピルアルコールおよびシナピルアセテートの酸化カップリングを行った。その結果、シナピルアルコールの Ag_2O 酸化では、*β-O*-4 構造が 32%生成した。一方、シナピルアセテートの Ag_2O 酸化では、*β-O*-4 構造の収率が、66%と大幅に増加した。この結果は、γアセチル基を有することにより、*β-O*-4 構造がより選択的に生成したことを示している。この結果を解釈するため、DFT 計算(B3LYP/6-31G*)を行い、モノリグノールラジカルの各炭素原子と酸素電子の電荷とスピン密度を計算した。その結果、アセチル基の有無により、スピン密度（ラジカルの分布）は変化しないことがわかった。一方、Cβ位の電荷は、シナピルアルコール(-0.1656 e)より、シナピルアセテート(-0.1194 e)のほうが小さいことがわかった。*β-O*-4 構造の形成の際は、O4 位(-0.4664 e)とCβ位が近づく必要があり、両者のクーロン反発がアセチル基により抑制されると考えられる。

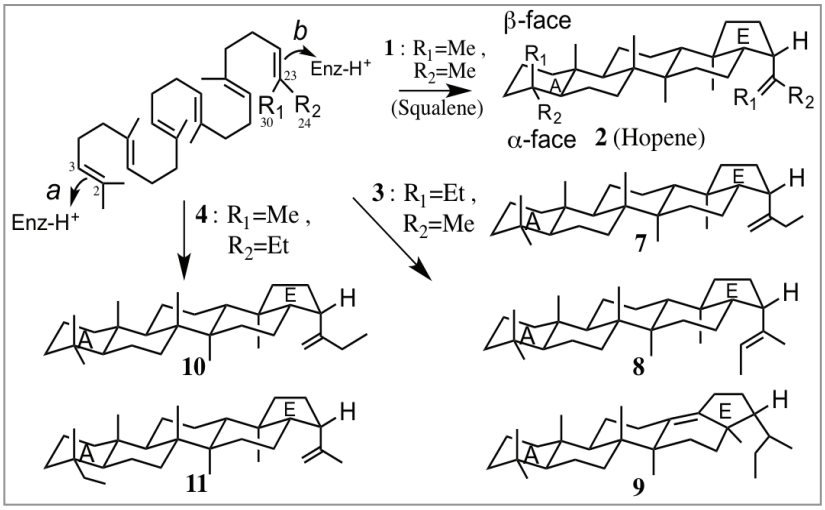
lignin

講演番号：3E21a11
講演日時、会場：3 月 28 日 11:10～ E 校舎 21 会場

スクアレン-ホペン環化酵素：基質スクアレン 23 位の立体サイズが環化反応に及ぼす影響
Squalene-hopene cyclase: Effect of the steric bulk at 23-position of squalene on the polycyclization cascade

○金子 一輝[1]、宮原 悠里[1]、佐々木 勇輔[2]、仲野 千秋[1]、星野 力[1,2] ([1]新潟大院自、[2]新潟大農)
○Ikki KANEKO[1], Yuri MIYAHARA[1], Yusuke SASAKI[2], Chiaki NAKANO[1], Tsutomu HOSHINO[1,2] ([1]Grad. Sch. Sci. Technol., Niigata Univ., [2]Fac. Agri., Niigata Univ.)

【目的】スクアレン-ホペン環化酵素(SHC)は鎖状分子スクアレン(**1**)を基質として 6/6/6/6/5−環系のホペン(**2**)やホパノールを合成する。当研究室では、数多くの変異導入実験や基質アナログ実験を行い、SHC の触媒機構を明らかにしてきた[1)]。今回、基質の末端 Me 基の体積を変化させた基質アナログを合成し、SHC との酵素反応で得た産物を同定して基質末端のサイズが環化に与える影響を検討した。【方法】C27 アルデヒドと 2−ホスホノ酪酸トリエチルとの Wittig 反応等によって基質アナログ **3,4** を合成した。SHC との酵素反応産物を GC-MS により確認し、$AgNO_3$-SiO_2 カラムクロマトグラフィーや HPLC を用いて単離、精製を行い、NMR で構造決定した。



【結果と考察】我々はすでに 29-nor (**5**), 30-nor analogs (**6**)の SHC 反応を報告した。**5** からは E 環が 6 員環[2)], 一方、**6** からは E 環が 6 員環と共に、正常な 5 員環構造の産物も得られた[3)]。従って Z-Me の存在がホペンの 5 員環形成に重要な役割を担っている[2,3)]。今回は、サイズの大きな Et 基に置換した **3,4** の反応を検討した。**3** では path ***a*** からのみ環化し、ホペン骨格のプロダクト **7,8,9** が得られた (**7:8**=1:2.7)。C-22-hopanyl cation の側鎖は回転が可能であるが、Z 配向の Et 基から脱プロトンされたものが多い。一方、**3** からはホペン骨格の **10** に加え、path ***b*** から環化した **11** も得られた (**10**:**11**=2:1)。今回の研究により、2 つの末端 Me 基を Et 基にしても path ***a*** においては正常な folding で環化が進行し、SHC は末端 Et 基を許容できる空間的余裕があることが明らかとなった。また、path ***b*** において環化開始部位の β-face は Z-Me の認識サイトが Et 基を許容できない程にコンパクトであり、逆に α-face は比較的余裕があり Et 基を許容できるという新しい知見が得られた。以上より、基質末端 Me 基の E、Z 配向の違いが閉環反応の立体化学を制御する上で重要な役割を担っていることを示した。

1) Hoshino; Sato, Chem. Commun.2002、291-301（Review）. 2) Hoshino; Kondo, Chem. Commun.1999, 731-732.
3) Hoshino.T et al. *Org. Biomol. Chem.*, 2004,1456-1470

Squalene cyclase, hopene, steric bulk

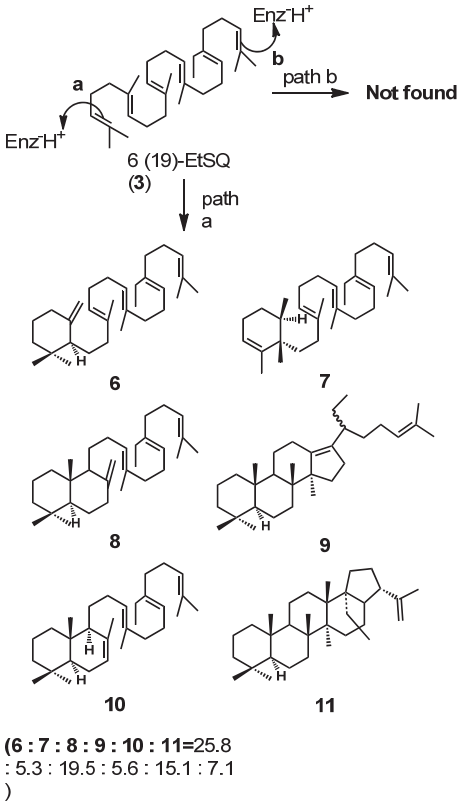
講演番号：3E21a12
講演日時、会場：3 月 28 日 11:21～ E 校舎 21 会場

スクアレンーホペン環化酵素：基質スクアレン 19 位の立体サイズが環化反応に及ぼす影響
Squalene-hopene cyclase: Effect of the steric bulk at 19-position of squalene on the polycyclization cascade

○高橋 一成[1]、渡辺 拓海[2]、仲野 千秋[1]、星野 力[1,2] ([1]新潟大院自、[2]新潟大農)
○Kazunari TAKAHASHI[1], Takumi WATANABE[2], Chiaki NAKANO[1], Tsutomu HOSHINO[1,2] ([1]Grad. Sch. Sci. Technol., Niigata Univ., [2]Fac. Agri., Niigata Univ.)

【目的】スクアレンーホペン環化酵素(SHC)は直鎖状のスクアレン(SQ、C_{30}) (**1**) をホペン(**2**) やホパノールへと変換する酵素であり、この反応は自然界における最も複雑な反応の一つである。当研究室では、SQ の各 Me 基を立体サイズの小さな H に置換した基質アナログを用いて、SHC の基質認識について様々な知見を報告してきた[1), 2)]。また、2014 年度日本農芸化学会において、SQ の 10 位(15 位)の Me 基を立体サイズの大きな Et 基にした基質アナログを用いた例を報告した[2)]。今回、6 位(19 位)の Me 基を Et 基に変換した基質アナログ 6(19)-エチルスクアレン(6 (19)-Et SQ) (**3**)を用いて SHC の更なる検討を試みた。

【方法・結果】スクアレンを過酸でエポキシ化し、過ヨウ素酸処理をすることで、C_{22} アルデヒドを得た。2-ホスホノ酪酸トリエチルを用いた増炭反応、DIBAL 還元、PBr_3 によってブロマイド(**4**)を得た。3-メチル-2-ブテン-1-オールをブロム化後、フェニルスルホン体(**5**)を得た。n-BuLi で **4** と **5** をカップリングし、$LiBEt_3H$ で脱フェニルスルホン化し、**3** を 30 mg 合成した。これを SHC と酵素反応し、得られたプロダクトを GC-MS、NMR を用いて同定した。基質 **3** から単環性の **6** (3.5 mg)と **7** (0.3 mg)、二環性の **8** (3.6 mg)と **10** (3.0 mg)、四環性の **9** (1.2 mg)、ホパン骨格の **11** (1.1 mg)の 6 つのプロダクト（生成比率 **6** : **7** : **8** : **9** : **10** : **11**=25.8 : 5.3 : 19.5 : 5.6 : 15.1 : 7.1）が生成された。いずれも path b からではなく、path a から環化したプロダクトしか確認されていない。このことから、基質の 6 位付近は Et 基を許容できず、A 環のコンフォメーションを崩したため、環化できないのではないかと推測した。また、生成されたプロダクトの多くが、単環および二環性であることから、基質の 19 位付近は Et 基を許容できず、B および C 環のコンフォメーションを変化させたと推測した。以上のことから、6 及び 19 位の Me 基が正確なコンフォメーションをとる上で重要であるといえる。



1) T. Hoshino et al, *Org Lett.* 2002, **4**, 2553-2556. 2) S. Nakano et al, *Org Biomol Chem.* 2004, **2**, 2012-2022. 3) 佐々木ら、農化要旨 2014、2A07p09.

Squalene cyclase, hopene, steric bulk

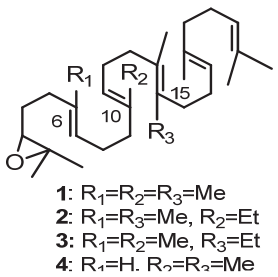
講演番号：3E21a13
講演日時、会場：3 月 28 日 11:32～ E 校舎 21 会場

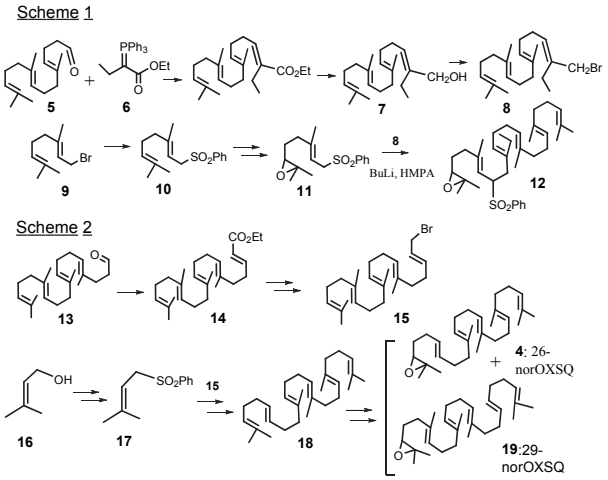
β-アミリン合成酵素：10 位、15 位のエチル基置換体及び 26-ノルオキシドスクアレンの環　化反応について

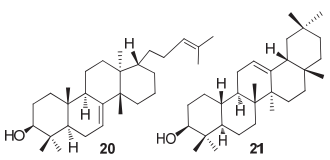
β-amyrin synthase: cyclization reactions of ethyl-substituted oxidosqulenes at 10- and 15-positions and that of 26-noroxidosqualene.

○寺澤 有里[1]、高橋 一成[2]、佐々木 勇輔[1]、仲野 千秋[2]、星野 力[1,2]（[1]新潟大農、[2]新潟大院自）
○Yuri TERASAWA[1], Kazunari TAKAHASHI[2], Yusuke SASAKI[1], Chiaki NAKANO[2], Tsutomu HOSHINO[1,2] ([1]Fac. Agri., Niigata, [2]Grad. Sch. Sci. Technol., Niigata)

【目的】我々は、β-アミリン合成酵素（EtAS）の基質オキシドスクアレン **1**（OXSQ）の基質認識機構解明の一貫として、幾つかの Nor(H)体、ホモメチル(Et)体アナログの酵素反応を報告してきた。[1-3] 今回は、10 位 **2**、15 位 Me の Et 置換体 **3** および 6 位 Me の H 置換体(26-nor 体)**4** の酵素反応を検討した。【方法・結果】**2** と **3** の合成法を Scheme 1 に示す。Squalene を mCPBA、HIO_4 処理で得た **5** と **6** の Wittig 反応、DIBAL-H 還元で **7**, PBr_3 で **8** を得た。Geranyl bromide **9** から phenylsulfone 体 **10**, その後 NBS, K_2CO_3 処理でエポキシ化して **11** を合成した。**11** と **8** の *n*-BuLi によるカップリング反応で **12** を得て $LiBEt_3H$ 還元で目的の **2** を合成した。また、**7** をエポキシ化後、**10** とのカップリング反応、$LiBEt_3H$ 還元で目的の **3** を調製した。基質 **4** は、**13** と **16** を出発原料として Scheme 2 の方法で合成した。**18** を NBS, K_2CO_3 処理で末端二重結合をエポキシドにした。その際、**4** と **19** が約 50:50 の混合物であることを NMR で確認した。EtAS を酵母で発現させ、His-tag カラムで精製した。**1** からは、高収率で 5 環性の β-アミリンが生産される。しかし、**2** と **3** の反応では、酵素量を通常の 10 倍に高めても、産物がまったく検出されなかった。一方、**4** と **19** の混合物の反応では、微量ではあるが、GC-MS で生成物を確認した。**19** の産物は、すでに報告した **20** であった。また、**4** の生成物は **21** であることを MS のフラグメント解析から同定できた。我々は **19** の酵素反応は、時間依存的阻害（自殺基質）がおき、反応収率が極めて低いことを報告している。**4** と **19** の混合物の反応では、**4** の変換効率が **19** よりもかなり悪いことを見出した（生成量；**20**：**21**＝3：1）。【考察】すでに、27-及び 28-norOXSQ はオレアナン骨格を比較的高収率で生成する(15～25%)。従って、10 位、15 位は Me 基よりも大きな Et 基は許容できない。また、6 位が H になると極端に変換収率(~1%)が低かったのは、**19** よりも **4** がもっと時間依存性が高いのか、あるいは、酵素への結合力が極度に低下したためとも考えられる。1) Hoshino, et al, *Org. Lett.*, **2014**, *16*, 3548. 2)金子ら、農芸化学会 2014, 2A07p10, 3)高橋ら、同、2A07p10. など。







β-amyrin synthase, ß-amyrin, oxidosqualene cyclase

講演番号：3E21a14
講演日時、会場：3 月 28 日 11:43～ E 校舎 21 会場

アオウキクサ花芽誘導物質 LDS1 およびその誘導体の合成

Synthesis of LDS1 and the related compounds with flower-inducing activity toward Lemna paucicostata

○土屋 諒[1]、山田 優作[2]、河橋 辰哉[1]、間瀬 暢之[2]、鳴海 哲夫[2]、戸田 三津夫[2]、轟 泰司[1]、渡辺 修治[3]([1]静岡大院農、[2]静岡大院工、[3]静岡大創造院)

○Ryo TSUCHIYA[1], Yusaku YAMADA[2], Tatsuya KAWAHASHI[1], Nobuyuki MASE[2], Tetsuo NARUMI[2], Mitsuo TODA[2], Yasushi TODOROKI[1], Naoharu WATANABE[3] ([1]Grad. School of Agric., Shizuoka Univ., [2]Grad. School of Eng., Shizuoka Univ., [3]Grad. School of Sci. Technol., Shizuoka Univ.)

【目的】花成の研究は開花、収穫時期の制御といった産業的な利用に応用することができる。日長応答性花成制御機構は解明されたが，花芽の人為的制御を目的とした花芽形成に関与する遺伝子に影響を与える低分子化合物の開発が期待されている。 LDS1 : (11E,15Z)-9,13-dihydroxy-10-oxooctadeca-11,15-dienoic acid は乾燥状態のアオウキクサ(Lemna paucicostata)が生産するオキシリピンであり、10 nM 以上の低濃度で L. paucicostata に対して花芽誘導活性を示す(Figure.1)。また LDS1 の前駆体である KODA の投与実験により、9 位の立体化学についても決定している。今回 LDS1 の分子・立体構造と花成の関連性におけるさらなる知見を得ることを目的とし、LDS1 の 13 位における立体配置の決定および LDS1 の合成を行った。【方法】立体配置の決定には L. paucicostata P151 に内生する LDS1 を用いた。アオウキクサ内生 LDS1 は乾燥させた L. paucicostata P151 の水抽出液を酢酸エチルによる抽出、HPLC による精製を経て得られた。キラルカラムを装備した HPLC にアオウキクサ内生 LDS1 を供し、4 つの立体異性体に分離した。立体異性体の絶対立体配置は新モッシャー法を用いて決定した。LDS1 の合成についてはまず始めに逆合成解析を行い、glycidol と oleic acid から全 12step で LDS1 を合成できると考え、有機合成に着手した。

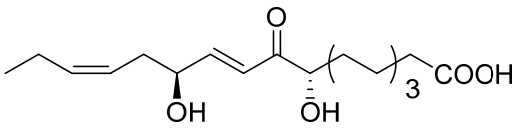


Figure.1. Proposed structure of LDS1

【結果】4 つの立体異性体の内、量が多く得られた 2 種の LDS1 を用いて 2 種類の di-MTPA エステル間におけるケミカルシフトの差をとりまとめた。その結果、最も存在比が高いのは(9R,13R)であった。また各立体異性体の L. paucicostata P151 に対する花芽誘導活性試験を行った。その結果、すべて有意な活性を示したものの各立体異性体間で活性の差異は見られなかった。LDS1 の合成については glycidol から(3E,7Z)-5-((tert-butyldimethylsilyl)oxy)-2-(piperidin-1-yl)deca-3,7-dienenitrile を oleic acid から methyl 9-oxononanoate を合成した。しかし、この 2 つの化合物をカップリングする際予期したスキームとは異なる反応が生じた結果、(11E,13E,15Z)-9-hydroxy-10-oxooctadeca-11,13,15-trienoic acid が得られた。上記のスキームでは LDS1 を合成できないと判断し、glycidol, acetol, 1,8-octanediol を出発物質として全 14step での合成スキームに変更し合成を行っている。それらの結果に加え、構造改変体の合成も試みているのでその検討結果ついても報告する。

flower-inducing compound, total synthesis, structure-activity relationship

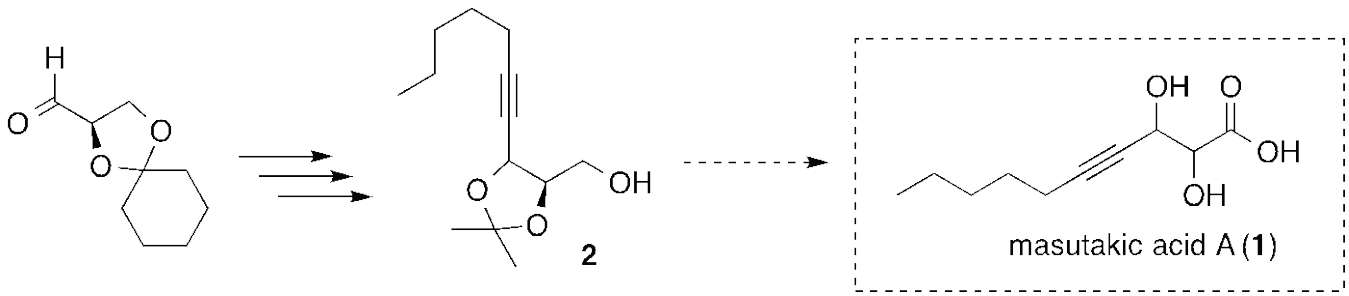
講演番号：3E21a15
講演日時、会場：3 月 28 日 11:54～ E 校舎 21 会場

Masutakic acid A の合成研究

Synthetic studies of masutakic acid A

○野下 俊朗[1]、大内 秀一[2] ([1]県立広島大生命環境、[2]近畿大薬)
○Toshiro NOSHITA[1], Hidekazu OUCHI[2] ([1]Pref. Univ. of Hiroshima, [2]Kinki Univ.)

【目的】Masutakic acid A (**1**)はサルノコシカケ科アイカワタケ属のマスタケ（鱒茸：*Laetiporus sulphureus var. miniatus*）から Yoshikawa らによって、数種のベンゾフラン型ネオリグナンと共に単離され構造決定されたアセチレンカルボン酸である[1)]。これまで masutakic acid A の生物活性に関する報告は無いものの *L. sulphureus* のメタノール抽出物は HIV-1 の逆転写酵素の活性を阻害することが報告されており[2)]、本化合物の活性にも興味がもたれる。また、masutakic acid A は平面構造が知られているのみで、相対および絶対立体配置は未だに不明である。そこで、masutakic acid A の絶対立体配置の解明と生物活性の精査を目的としてその全合成を試みる。
【方法および結果】D-Mannitol から調製した 2,3-*O*-cyclohexylidene-D-glyceraldehyde に 1-heptyne から調製したリチウムアセチリドを反応させ、masutakic acid A の基本骨格を構築した。次いで保護基の変換等を行ないアルコール **2** へと導いた。得られたアルコール **2** は(2*R*,3*R*)-体と(2*R*,3*S*)-体のほぼ 1:1 混合物であり、silica gel カラムクロマトグラフィーによって分離が可能であった。分離した両異性体について、それぞれカルボン酸への酸化、および脱保護を行ない(2*S*,3*S*)-及び(2*S*,3*R*)-masutakic acid A の全合成を完了する予定である。また、別法による masutakic acid A の全合成についても検討を試みる。



---

1) K. Yoshikawa *et al.*, *Chem. Pharm. Bull.*, **49**, 327-329 (2001).
2) A. Mlinarič *et. al*, *Acta Pharm.*, **55**, 69-79 (2005).

masutakic acid A, synthesis, acetylenic acid

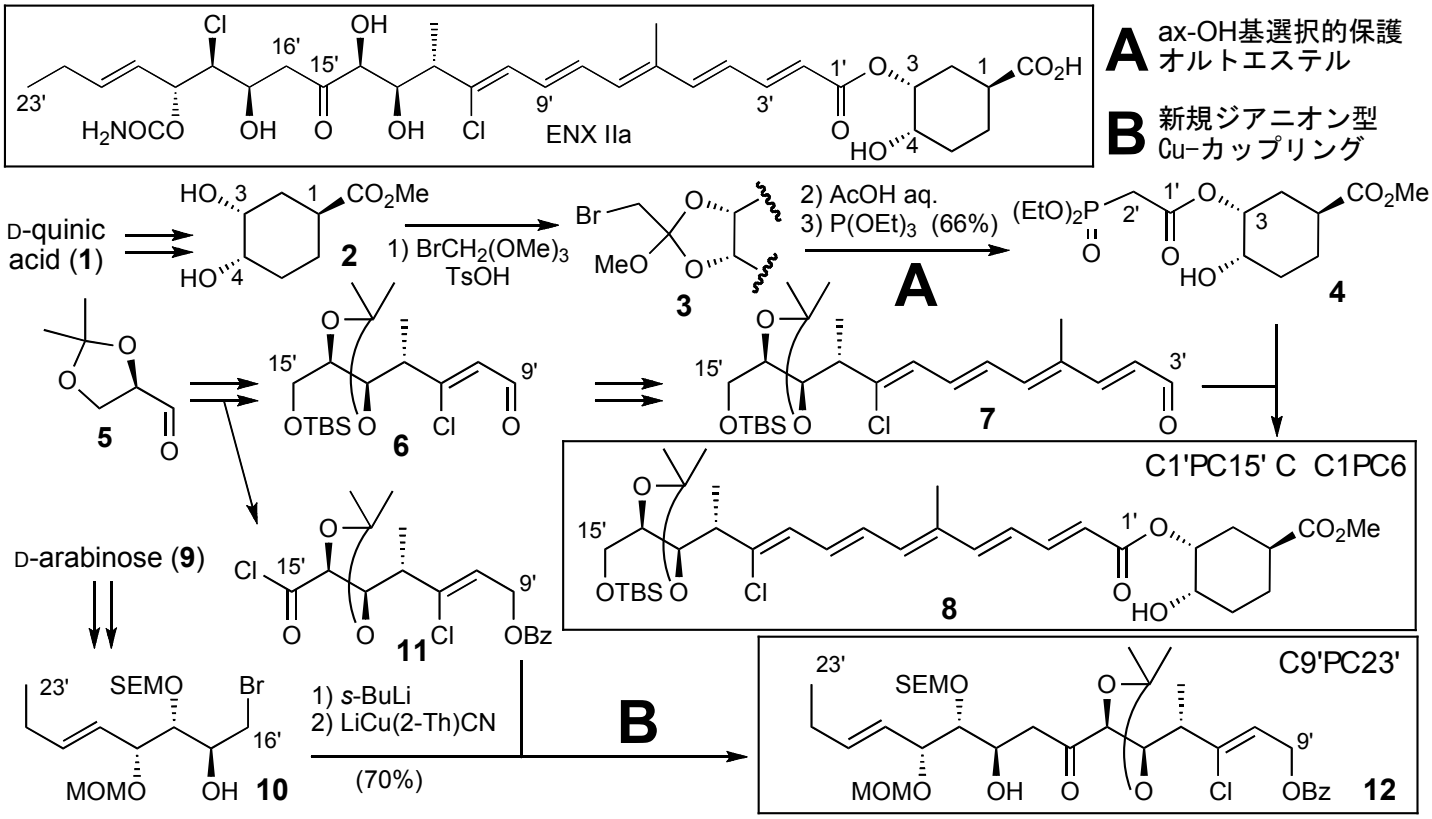
講演番号：3E21p01
講演日時、会場：3 月 28 日 14:00～ E 校舎 21 会場

抗生物質エナシロキシン類の全合成研究

Synthetic Studies of Antibiotic Enacyloxins

○清田 洋正[1]、五十嵐 渉[2]、齋藤 亜紀[2]、古川 博之[2]、星川 浩輝[2]、山田 てい子[2]、桑原 重文[2] ([1]岡山大院・環境生命、[2]東北大院農・生物産業創成)
○Hiromasa Kiyota[1], Wataru Igarashi[2], Aki Saito[2], Hiroyuki Furukawa[2], Hiroaki Hoshikawa[2], Teiko Yamada[2], Shigefumi Kuwahara[2] ([1]Okayama Univ., [2]Tohoku Univ.)

【目的】Enacyloxin (ENX)類は、*Frateuria* sp. W-315 株の生産する抗生物質であり[1]、当研究室で全立体構造を決定した[2]。リボソーム elongation factor-Tu に作用しタンパク質合成を阻害することで抗グラム陽性・陰性細菌活性を示す[3]。我々は抗菌剤への展開を目指し合成研究を行っている。
【結果】C1'-C15'&C1-C6 部位：**1** から Barton 法を用いて **2** を合成した[4]。**2** の 3 位 axial-OH 基をオルトエステル **3** 経由で選択的にアシル化し、**4** に導いた。**5** 或いは D-酒石酸ジエチル[5]から導いた **6** を経て調製したポリエナール **7** と **4** の Horner 反応により **8** の合成に成功した。
C9'-C23'部位：**9** から合成した **10**[6]を新規なジアニオン型銅試薬に導き、酸クロリド **11** とカップリングすることで **12** を得た。相当するジリチオ体を用いた場合でも、同様なカップリング体を得た。



[1] T. Watanabe *et al.*, *J. Antibiot.* **1982**, *35*, 1141. [2] H. Furukawa *et al.*, *Chem. Biodivers.* **2007**, *7*, 1601. [3] A.M. Zuurmond *et al.*, *J. Mol. Biol.* **1999**, *294*, 627. [4] A. Saito *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2014**, *78*, 766. [5] H. Furukawa *et al.*, *Heterocycl. Commun.* **2011**, *17*, 3. [6] W. Igarashi *et al.*, *Heterocycl. Commun.* **2011**, *17*, 7.

enacyloxins, synthetic studies, copper-mediated reaction

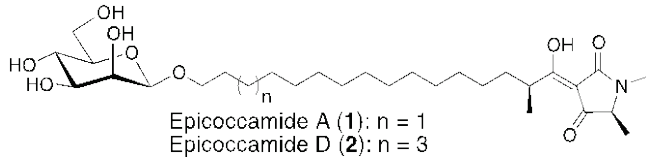
講演番号：3E21p02
講演日時、会場：3 月 28 日 14:11～ E 校舎 21 会場

Epicoccamide 類の全合成

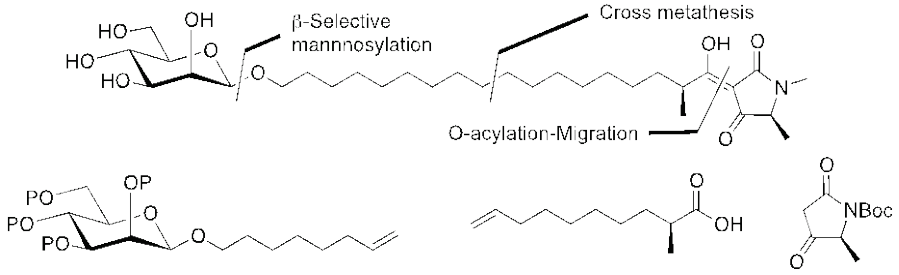
Total synthesis of epicoccamides

○川尻 晃裕、森 綾香、矢島 新、勝田 亮、額田 恭郎（東農大農）
○Akihiro KAWAJIRI, Ayaka MORI, Arata YAJIMA, Ryo KATSUTA, Tomoo NUKADA (Tokyo Univ. of Agriculture)

【目的】Epicoccamide A (**1**)は 2003 年 Wright らによって菌類 *Epicoccumpurpurascens* の培養液より単離された [1)]。Epicoccamide D (**2**)は 2007 年 Hertweck らにより *Epicoccum* 属菌類の培養液より単離され、マウス繊維芽細胞(L-929)とヒト白血病細胞(K-562)に対して弱い抗増殖活性と HeLa 細胞に対し細胞毒性を示すことが報告された [2)]。本研究では epicoccamide アグリコンモデル化合物、および epicoccamide A と D を合成することにより、未決定であった天然物の絶対立体配置を決定することとした。



【結果・方法】合成に際し標的化合物を 2 つのセグメントのクロスメタセシスにより連結する計画を立案した。テトラミン酸セグメントはカルボン酸とアラニン由来のテトラミン酸誘導体との縮合転位反応により合成し、5-ヘキセン-1-オールとのクロスメタセシス反応によりアグリコンモデル化合物を合成した。続いて、D-マンノースを出発原料とし、β 選択的グリコシル化を鍵反応に用いて糖セグメントを合成し、テトラミン酸セグメントとのクロスメタセシス反応により epicoccamide D(**2**)の合成に成功した。同様の手法を用いて epicoccamide A(**1**)の合成も達成した。Epicoccamide アグリコンモデル化合物、epicoccamide A(**1**)および D(**2**)の合成を通して天然物の絶対立体配置を決定したので報告する。なお、我々の研究と同時期に Schobert らも epicoccamide D(**2**)の合成を報告している [3)]。



1) Wright, A.D. *et. al. Org. Biomol. Chem.***2003**,*1*, 507-508.
2)Hertweck, C. *et. al. J. Nat. Prod.* **2007**,*70*, 1800-1803.
3)Schobert, R.; Loscher, S. *Chem. Eur. J*. **2013**, *19*, 10619-10624.

synthesis, tetramic acid, anticancer

講演番号：3E21p03
講演日時、会場：3 月 28 日 14:22～ E 校舎 21 会場

Formosusin A の合成研究

Synthetic studies of formosusin A

○飯塚 悠、矢島 新、勝田 亮、額田 恭朗（東農大農）
○Yu IIZUKA, Arata YAJIMA, Ryo KATSUTA, Tomoo NUKADA (Tokyo Univ. of Agriculture)

Paecilomyces formosus より単離された formosusin A は、抗生物質として知られる variotin の幾何異性体である(Figure 1)[1]。その相違は 6 位の幾何異性と未決定の 12 位の絶対立体配置であるが、formosusin A は variotin に見られない哺乳類 DNA ポリメラーゼβに対する特異的な阻害活性を有している。このことから12位の絶対立体配置と生物活性との相関に興味が持たれる。我々は両鏡像体を合成することで天然物の絶対立体配置を決定するとともに、その活性との相関を調査することを目的として合成研究に着手した。

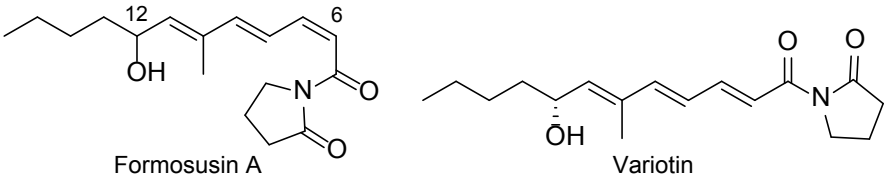
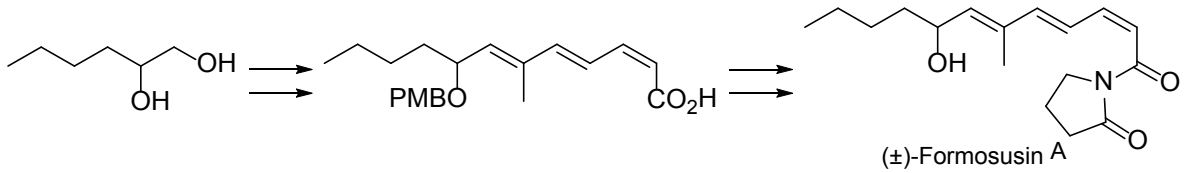


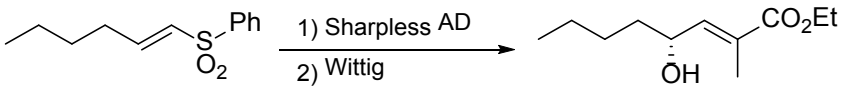
Figure 1. Formosusin A の構造

まず合成経路の確立を目的として、formosusin A のラセミ体での全合成を行った。1,2-ヘキサンジオールを出発原料とし、二級のヒドロキシ基のみを PMB 基で選択的に保護した後、Wittig 反応、HWE 反応、Still-Gennari 法を用いて特徴的な(6*Z*,8*E*,10*E*)のトリエン構造を構築した。これと 2-ピロリジノンを混合酸無水物法により縮合し formosusin A のラセミ体の全合成を達成した(Scheme 1)。



Scheme 1. ラセミ体の全合成

次に両鏡像体の合成を行うため、スルホンを基質とした Sharpress 不斉ジヒドロキシ化を用いて光学活性中間体を合成した(Scheme 2)。現在はこれを用いた両鏡像体の全合成を検討中である。



Scheme 2. 光学活性中間体の合成

1) Mizushina, Y. *et.al. Bioorg. Med. Chem.* **22**, 1070-1076 (2014).

synthesis, formosusin A, mammalian DNA polymerase ß inhibitor

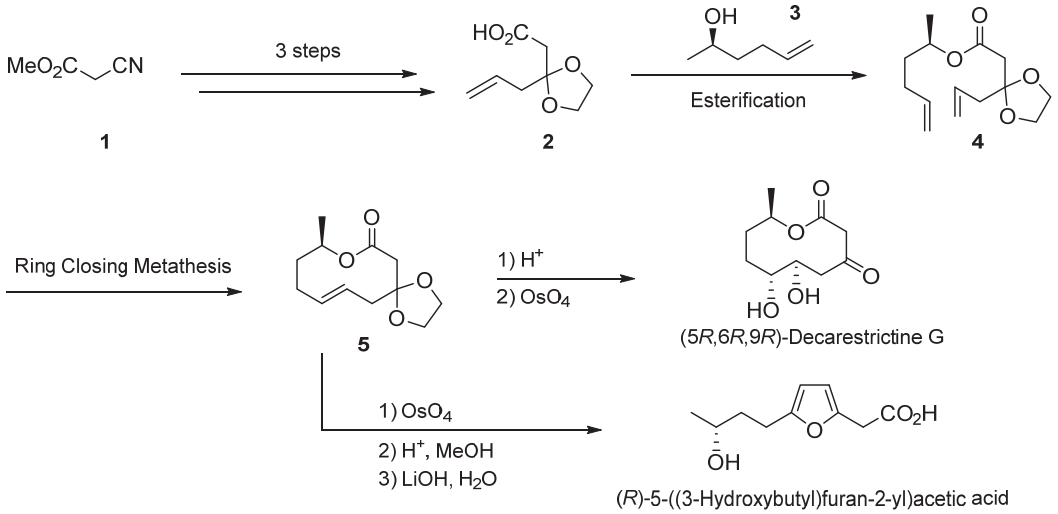
講演番号：3E21p04
講演日時、会場：3 月 28 日 14:33～ E 校舎 21 会場

Decarestrictine G および 5-((3-hydroxybutyl)furan-2-yl)acetic acid の合成と立体化学の研究
Syntheses and stereochemical study of Decarestrictine G and 5-((3-hydroxybutyl)furan-2-yl)acetic acid

○藤川 祥汰、勝田 亮、矢島 新、額田 恭郎（東農大農）
○Shota Fujikawa, Ryo KATSUTA, Arata YAJIMA, Tomoo NUKADA (Tokyo Univ. of Agriculture)

【目的】Decarestrictine 類は 1992 年に *Penicillium* 属菌から単離、構造決定された化合物群であり、多くがコレステロール生合成調節活性を有している [1)]。これらは構造上 10 員環ラクトンを中心とした化合物群であるが、中でも decarestrictine G はビシナルジオール及び β-ケトラクトン構造を有する点が特徴的である。我々は decarestrictine G の構造と生物活性に興味を持ち decarestrictine G の初の全合成を目的とし合成研究を行った。

【方法及び結果】Decarestrictine G の 10 員環ラクトンは、キラルなエステル **4** の閉環メタセシス反応により構築し、生じた二重結合をジヒドロキシ化することにより、7 工程、総収率 12.2%で(5*R*,6*R*,9*R*)-decarestrictine G の全合成を達成した。今回合成に成功した化合物の各種スペクトルデータが天然物のスペクトル値とよく一致している事から、天然物の立体化学は従来提唱されていた 5*S*,6*S*,9*R* ではなく 5*R*,6*R*,9*R* である可能性が高いと考えられる。また、この結果は NMR スペクトルデータの理論化学計算からも支持された。一方で、decarestrictine G 合成の中間体より 3 段階で合成可能なフラン環を含む天然物 5-((3-hydroxybutyl)furan-2-yl) acetic acid は冬虫夏草 *Cordyceps militaris* 由来の抗高脂血症作用を有する化合物である [2)]。本化合物の絶対立体配置は決定されていなかったが、今回(*R*)-体を合成し天然物と比旋光度を比較した結果、天然物の絶対立体配置は *S* であることが明らかとなった。



1) Wink, J. *et al*. *J*. *Antibiot*. **1992**, *45*, 56-65.
2) 日本メクトロン株式会社、鈴木 功徳、田子 晴美、平光 時幸、2-カルボキシメチル-(3-ヒドロキシブチル)フラン、その製造法およびそれを有効成分とする抗高脂血症作用剤、特開平 7-224053.

synthesis, decarestrictine, cholesterol

講演番号：3E21p05
講演日時、会場：3 月 28 日 14:44～ E 校舎 21 会場

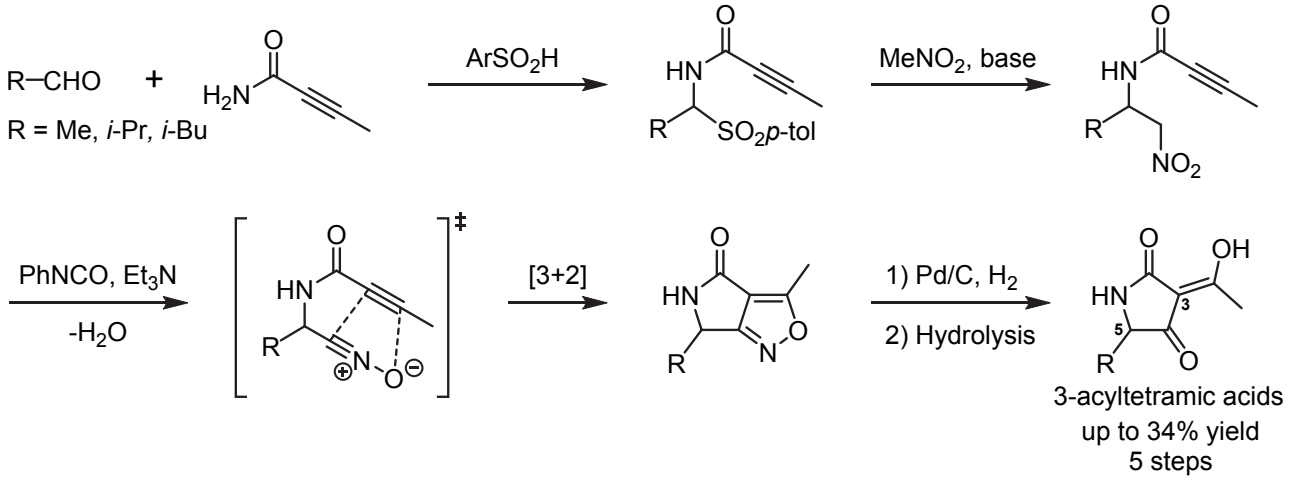
3-アシルテトラミン酸類新規合成法の開発

Development of an alternative synthetic route to 3-acyltetramic acids

○一條 洋樹、佐々木 弘太郎、足立 一磨、勝田 亮、矢島 新、額田 恭朗（東農大農）
○Hiroki Ichijo, Kotaro Sasaki, Kazuma Adachi, Ryo Katsuta, Arata Yajima, Tomoo Nukada (Tokyo Univ. of Agriculture)

【目的】生物活性を有するテトラミン酸類(TA)は種々の天然資源から単離される。アミノ酸とポリケチドにより生合成される TA は、構成単位の多様性から 1,3,5 位に様々な側鎖を有しており、生物活性を有する TA の 3 位はアシル基により置換されている場合が多い。構造の多様性は TA の持つ様々な生物活性と密接に関係しているが、現存する既知の TA 合成法は多くが天然由来のアミノ酸を出発原料とする経路を採用しているため、非天然型の側鎖を有する TA の合成には必ずしも適していない。特殊な側鎖を有する TA の合成のためには、簡便かつ汎用性の高い合成法の開発が望まれる。そこで我々は任意の側鎖の導入、さらに不斉反応を利用した光学活性体の合成についても可能とするアミノ酸非依存的な 3-アシル TA 新規合成法の開発に着手した。

【方法・結果】上記目的の達成のため我々は、多岐に渡る化合物が容易に入手可能なアルデヒドおよび 2-アルキン酸アミド、ニトロメタンを原料とし、ニトロ Mannich 反応および分子内 1,3-双極子付加環化を用いる 3-アシル TA 合成法を立案した。我々はこの戦略に基づき、α-アミドスルホンを経由するニトロ Mannich 反応により各種アルデヒド、2-ブチン酸アミド、ニトロメタンの三成分を縮合した後、アルキンに対するニトリルオキシドの分子内双極子付加環化によりイソオキサゾールを構築、水素化、加水分解を経て、isotenuazonic acid を含む数種の 3-アシル TA のラセミ体合成に成功した。また、不斉ニトロ Mannich 反応を用いた 3-アシル TA の光学活性体合成についても検討したので、併せて報告する。



synthesis, 3-acyltetramic acids, isotenuazonic acid

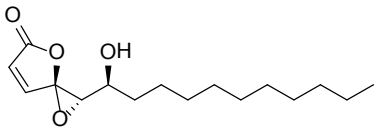
講演番号：3E21p06
講演日時、会場：3 月 28 日 15:05～ E 校舎 21 会場

抗マイコバクテリア活性を示す Ramariolide A の化学合成

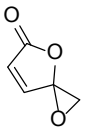
Synthesis of Ramariolide A, Antimycobacterial Spiro Oxiranebutenolide

○八田 雅士、久世 雅樹、滝川 浩郷（神戸大院農）
○Masashi HACHIDA, Masaki KUSE, Hirosato TAKIKAWA (Kobe Univ.)

【目的】 Ramariolide A はホウキタケ属きのこ（*Ramaria cystidiophora*）から単離された天然物であり、結核菌などのマイコバクテリアに対する抗菌活性を示す。[1] また、天然物としては珍しい spiro oxiranebutenolide 骨格を特徴としており、新規抗マイコバクテリア薬のリード化合物として期待されている。本研究では ramariolide A の化学合成を目的とした。

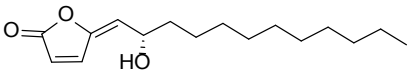


Ramariolide A



Spiro oxiranebutenolide 骨格

【方法】 Ramariolide A の spiro oxyranebutenolide 骨格は、最終段階におけるエポキシ化反応によって構築することにした。この前駆体となる butenolide 化合物は実際に天然から単離されており、この butenolide 化合物の合成を経て ramariolide A の合成を試みた。



butenolide 化合物

【結果】 市販の 1,2-ドデカンジオールを出発原料とし、3 段階でα-ヒドロキシドデカナールを得た。向山アルドール反応によってフラン環を導入した後、脱水反応およびヒドロキシ基の脱保護により butenolide 化合物を得た。この butenolide 化合物には幾何異性体が含まれていたが、天然型の幾何異性体は分離精製が可能であり、そのスペクトルデータは報告値と一致した。この天然型 butenolide 化合物をエポキシ化することにより、ジアステレオマー混合物ではあるが ramariolide A の合成を総工程数 8 段階で達成した。

文献 1 ：Centko R, et al., *J. Nat. Prod*., **75**, 2178-2182, (2012).

total synthesis, antimycobacterial activity, butenolide

講演番号：3E21p07
講演日時、会場：3 月 28 日 15:16～ E 校舎 21 会場

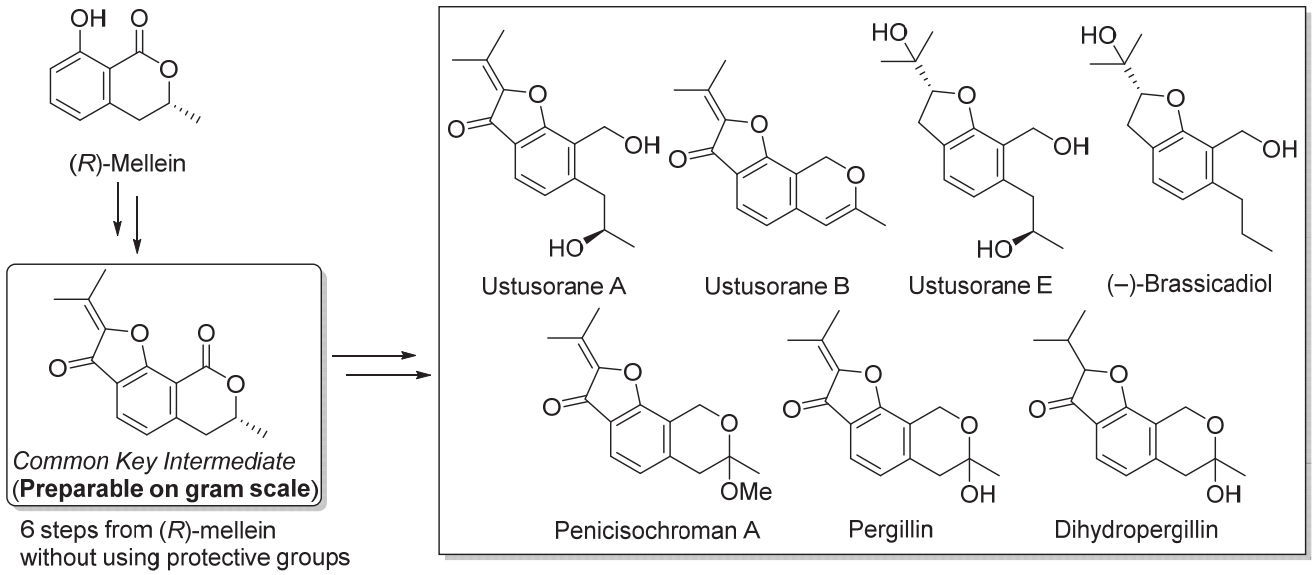
天然ベンゾフラノイド類の網羅的合成

Synthesis of natural benzofuranoids

○倉持 幸司、椿 一典（京府大院生命環境）
○Kouji Kuramochi, Kazunori Tsubaki (Kyoto Prefectural Univ.)

Ustusorane A～E は *Aspergillus ustus* 094102 から単離、構造決定されたベンゾフラノイドである[1]。このうち ustusorane E にはヒト白血病 HL-60 細胞に対する細胞増殖抑制活性（IC_{50} = 0.13 μM）が報告されている。しかしながら、ustusorane A と E の絶対立体配置は未決定である。また、ustusorane E と同様の骨格を有する brassicadiol が *Alternaria brassicae* から単離・構造決定されている[2]。これら化合物以外にも pergillin[3]、dihydropergillin[4]、penicisochroman A[5] などのベンゾフラノイド類が報告されている。

今回我々は、(*R*)-ベンゾラクトンを共有中間体として下図の天然ベンゾフラノイド類を網羅的に合成した。また、ustusorane A と E の絶対立体配置を決定したので、これら一連の研究成果について発表する。



【参考文献】(1) Lu, Z. *et al*. *J. Nat. Prod*. **2009**, *72*, 1761–1767. (2) Ayer, W. A. *et al*. *J. Nat. Prod*. **1987**, *50*, 408–417. (3) Cutler, H. G. *et al*. *J. Agric. Food Chem*. **1980**, *28*, 989–991. (4) Cutler, H. G. *et al*. *J. Agric. Food Chem*. **1981**, *29*, 981–983. (5) Trisuwan, K. *et al Tetrahedron* **2010**, *66*, 4484–4489.

total synthesis, natural product, benzofuranoid

講演番号：3E21p08
講演日時、会場：3 月 28 日 15:27～ E 校舎 21 会場

新規骨格転位反応の開発；kinamycin 類の生合成反応の検討

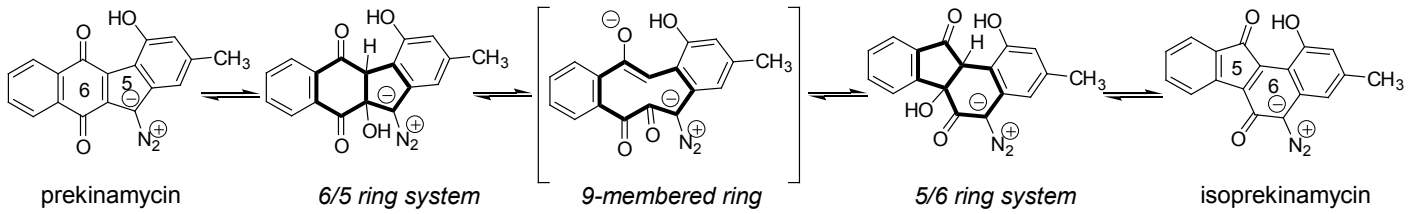
Development of novel skeletal rearrangement; Investigation on the proposed biosynthetic reaction of prekinamycin derivatives.

○河村 萌、久保 このみ、倉持 幸司、椿 一典 (京府大院生命環境)
○Moe Kawamura, Konomi Kubo, Kouji Kuramochi, Kazunori Tsubaki (Kyoto Prefectural Univ.)

【目的】

抗腫瘍性抗生物質 kinamycin 類はその特異的な構造と強力な生物活性のために、注目を集めてきた。そのうち prekinamycin と isoprekinamycin は同じ放線菌から単離され、構造的な関連性から相互変換することが推測されている (Scheme 1)。この反応では 6/5 員環が縮環部分で開環し、9 員環エノラートを経て 5/6 員環へ変化すると考えられる。我々はこの生合成仮説に示される骨格転位反応に注目し、新規骨格転位反応の開発と一般性の検討に着手した。

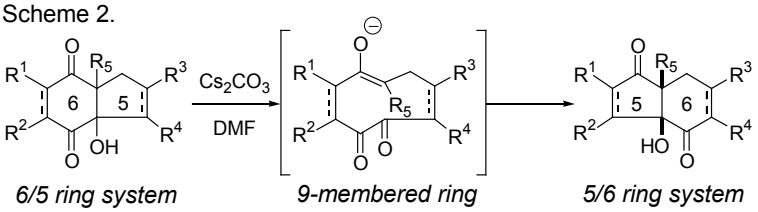
Scheme 1.



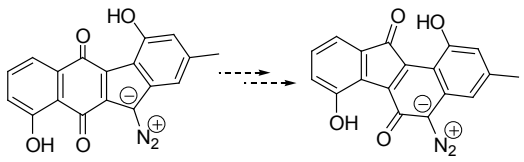
【方法と結果】

Prekinamycin の基本骨格である 6/5 員環を有する化合物群を合成し、塩基に炭酸セシウム、溶媒に DMF を用いた条件で転位反応を行った (Scheme 2)。これまでに 4 種類の基質を合成し、目的の骨格転位反応の進行を確認した。また、Scheme 1 に示す prekinamycin の生合成仮説を実証すべく、prekinamycin の骨格を合成し、骨格転位反応の検討を行った (Scheme 3) 。

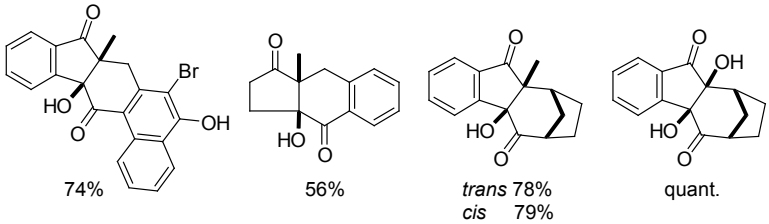
Scheme 2.



Scheme 3.



Products and yields obtained by the skeletal rearrangement



Prekinamycin, rearrangement, 9-membered ring intermediate

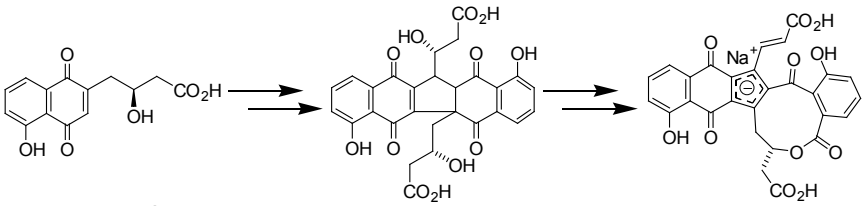
講演番号：3E21p09
講演日時、会場：3 月 28 日 15:38～ E 校舎 21 会場

Juglorubin 及び関連天然物の合成研究

Synthetic studies toward juglorubin and related natural products

○加茂 翔伍、倉持 幸司、椿 一典（京府大院生命環境）
○Shogo Kamo, Kouji Kuramochi, Kazunori Tsubaki (Kyoto Prefectural University)

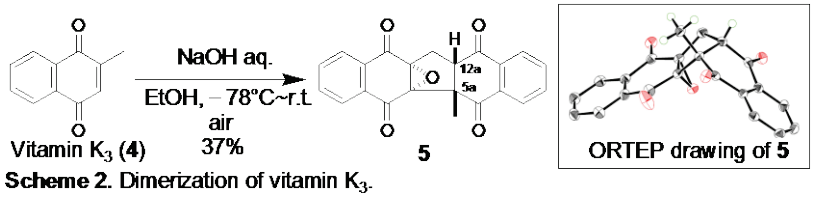
【目的】Juglorubin (**1**) は 1993 年に放線菌 *Streptomyces* sp. より単離された赤色イオン性有機色素である。Juglorubin の生合成は同じく放線菌より単離された天然物 Juglomycin C (**2**) と Juglocombin A (**3**) を経由すると推定されている (Scheme 1)。これらの化合物は興味深い構造を有するが、活性や機能に関する詳細な研究は行われておらず、合成研究に関しても未だ報告がない。そのためこれら天然物群の合成法を確立し、誘導体を含めた化合物の供給が可能となれば、医農薬や材料研究など幅広い分野への応用展開が可能であると考えられる。そこで推定生合成経路に基づき、Juglorubin 類の合成に着手した。



Scheme 1. Proposed biosynthesis of Juglorubin (**1**).

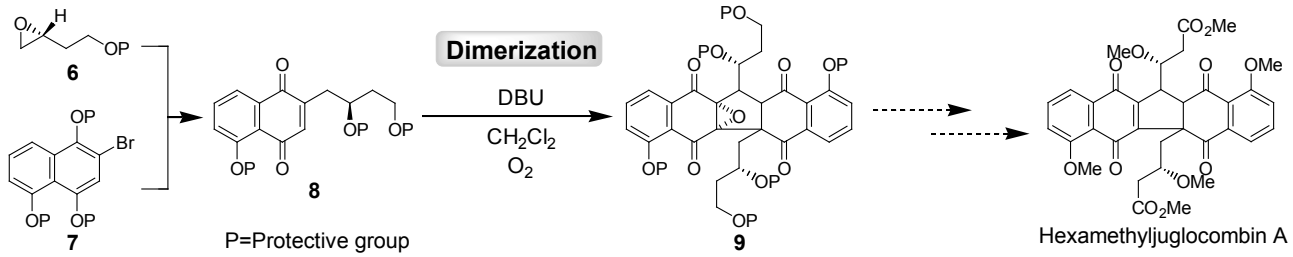
【方法と結果】

我々は過去の研究で vitamin K_3 を酸素存在下、塩基で処理すると二量体 **5** が得られることを見出した (Scheme 2)。今回この反応を Juglomycin C 誘導体の二量化に応用し、Juglocombin A の合成を目指した。



Scheme 2. Dimerization of vitamin K_3.

Juglocombin A の合成を目指すにあたり L-アスパラギン酸を出発原料とした収束的合成法を考案し、モデル基質による検討を行った。まず L-アスパラギン酸より合成した光学活性なエポキシド **6** と 2-ブロモナフタレン **7** をカップリングし、酸化を経て Juglomycin C 誘導体 **8** を合成した。これを酸素存在下、塩化メチレン中 DBU で処理することで所望の二量体 **9** を収率よく得ることに成功した。次にこの化合物 **9** から側鎖官能基変換により Hexamethyljuglocombin A の合成を行った。



Scheme 3. Synthetic studies toward Juglocombin A.

natural product synthesis, 1,4-naphthoquinone, dimerization

講演番号：3E21p10
講演日時、会場：3 月 28 日 15:49～ E 校舎 21 会場

1,4-ナフトキノン二量化反応による機能性分子の創成

Synthesis of highly functionalized compounds by dimerization of 1,4-naphthoquinones

○太田 元博、倉持 幸司、椿 一典（京府大院生命環境）
○Motohiro OTA, Kouji KURAMOCHI, Kazunori TSUBAKI (Kyoto Prefectural Univ.)

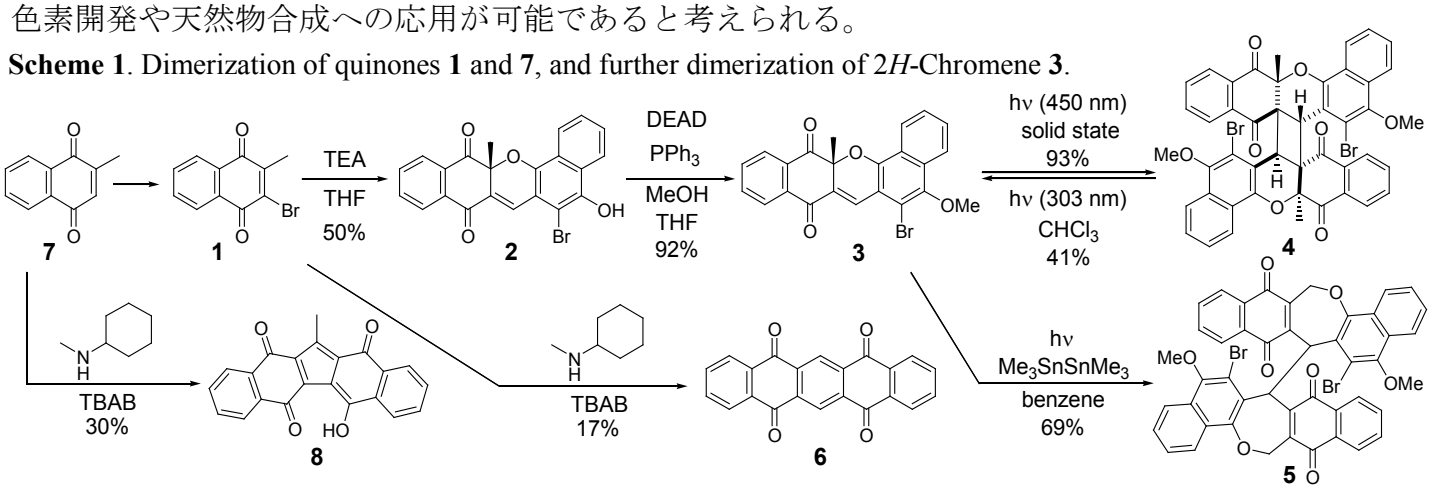
【背景】

キノン類は一般にその反応点の多さから、反応制御が困難である。しかし、その一方で反応条件を厳密に制御すれば、特異な反応を選択的に進行させることが可能になると考えられる。我々の研究室では、2-ブロモ-3-メチル-1,4-ナフトキノン (**1**) の多様な二量化反応の開発に取り組み、様々な骨格を選択的に構築することに成功している。[1] 昨年度の本大会において、化合物 **1** の新規二量化反応と、その誘導体 **3** の光 [2+2] 環化二量化反応を報告した。

【概要】

我々はこれまでに化合物 **3** に固体状態で光を照射すると、[2+2] 環化付加体 **4** が得られる事を見出している。今回、ベンゼン溶液中ヘキサメチルジチン存在下で光照射したところ、骨格転位を伴うラジカル付加体 **5** が収率 69% で生成することを見出した。形式の全く異なる 2 つの光二量化反応が進行する化合物 **3** は、光応答性分子などへの応用展開が今後期待される。また、基質 **1** をイオン性液体であるテトラブチルアンモニウムブロミド (TBAB) 中で塩基処理すると、有機半導体材料として有用な 5,7,12,14-ペンタセンテトロン (**6**) が収率 17% で得られた。さらに基質 **1** をビタミン K_3 (**7**) に変更した条件では、五員環ジキノイド化合物 **8** が収率 30% で得られた。化合物 **8** は溶液状態で鮮やかな紫色を呈するだけでなく、カバの汗の成分中にも類似の構造が存在するため、色素開発や天然物合成への応用が可能であると考えられる。

Scheme 1. Dimerization of quinones **1** and **7**, and further dimerization of 2*H*-Chromene **3**.



1) Azuma, S.; Nishio, K.; Kubo, K.; Sasamori, T.; Tokitoh, N.; Kuramochi, K.; Tsubaki, K. *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 4812.

naphthoquinone, photodimerization, ionic liquid

講演番号：3E21p11
講演日時、会場：3 月 28 日 16:10～ E 校舎 21 会場

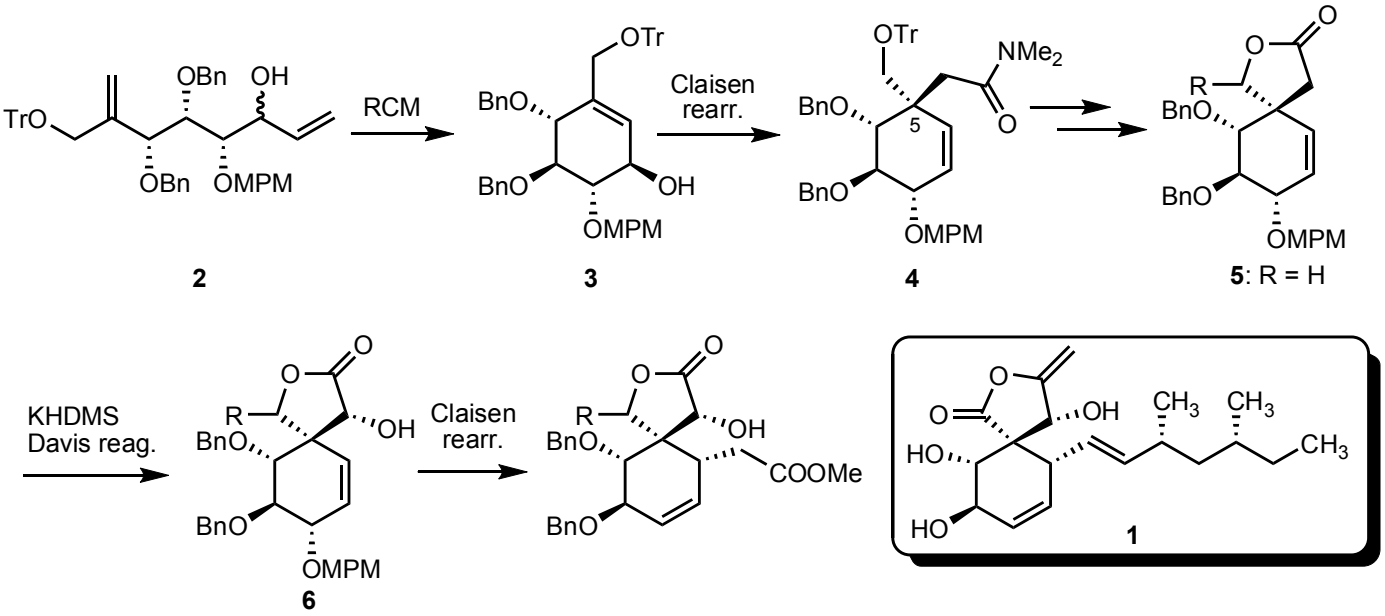
spiroleptosphol の全合成研究

total synthetic study on spiroleptosphol

○高橋 萌子、橋本 勝 (弘前大学農生)
○Moyoko Takahashi, Masaru Hashimoto (Hirosaki Univ.)

当研究室で単離した spiroleptosphol (**1**)は、p388 マウス白血病細胞に対し IC50 = 20μg / ml で細胞毒性を示す。また、スピロ構造を中心に不正炭素が集中し、合成化学的にも興味深い化合物である。以上の背景から **1** の合成研究を行っている。

D-glucose から、19 工程により **2** を調製後、環化オレフィンメタセシスによりシクロヘキセノール **3** に導いた。次に、Eshenmoser-Claisen 転位反応により 5 位四級炭素を立体選択的に導入して **4** を得た。さらに官能基変換を行うことでスピロ環化合物 **5** とし、Davis 酸化により立体選択的に望みのアルコール **6** へと変換した。再び Claisen 転位を行い、側鎖を導入して **1** に導く計画である。本大会では、**6** の合成、立体の決定などを中心に報告する。



1) T. Murakami, M. Hashimoto *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.* **19**, 492-495 (2009).
2) T. Murakami, M. Hashimoto *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.,* **19**, 1122-1125 (2009)

total synthesis, spiroleptosphol, Claisen rearrangement

講演番号：3E21p12
講演日時、会場：3 月 28 日 16:21～ E 校舎 21 会場

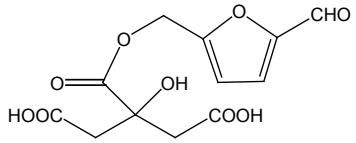
ムメフラールの効率的合成法

Efficient synthesis method of mumefural

松本 恵実、○藤野 和孝、牧岡 富広、中塚 進一 (長良サイエンス株式会社)
Emi MATSUMOTO, ○ Kazutaka FUJINO, Tomihiro MAKIOKA, Shin-ichi NAKATSUKA (Nagara Science Co. Ltd.)

【目的】梅は梅干し等の食品に加工され、日本の伝統的な健康食品として親しまれてきた。1998 年、青梅の果汁を煮詰めて作られる梅エキスに血流改善効果があることが報告され、その後の研究で、梅エキスにムメフラール及びその関連化合物が含まれ、これらの化合物が血流改善効果を示すことが報告された[1),2)]。ムメフラール及びその関連化合物は梅果汁中には存在せず、青梅の果汁を煮詰める梅エキス製造過程で生成し、糖質の一種 5-ヒドロキシメチル-2-フルフラール (HMF)とクエン酸が結合してムメフラールが生成する[2)]。従来のムメフラール合成法はスクロース又はフルクトースと有機酸を加熱する方法であるが[2),3)]、我々はこれらの化合物の生成機構を考慮し、HMF と有機酸を原料にしてムメフラールの効率的合成を試みた。
【結果】クエン酸(**1**)と HMF (**2**)を 120℃で 6 時間加熱したところムメフラール(**3**)を収率 25%で合成することができた。さらに各成分を HPLC で分離精製し、純度 99%ムメフラール(**3**)940mg、異性体(**4**)450mg を得た。
【考察】従来のムメフラール合成法と異なり HMF を合成原料として使用し、生成機構を詳細に検討することでムメフラールの合成収率を 25%の向上に成功し、これにより高純度ムメフラールの大量合成に成功した。また、本法は HMF と有機酸のみを使用する方法であるから、ムメフラール及びその関連化合物を食品や医薬品に利用できると考えている。





1) Chuda, Y. *et al.*, *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 828-831 (1999).
2) 我藤伸樹ら, ヘモレオロジー研究会誌, **3**, 81-87 (2000).
3) 小野裕嗣ら, 特開平 11-279166.
4) 中塚進一ら, 日本食品化学学会第 20 回学術大会(2014).

Mumefural

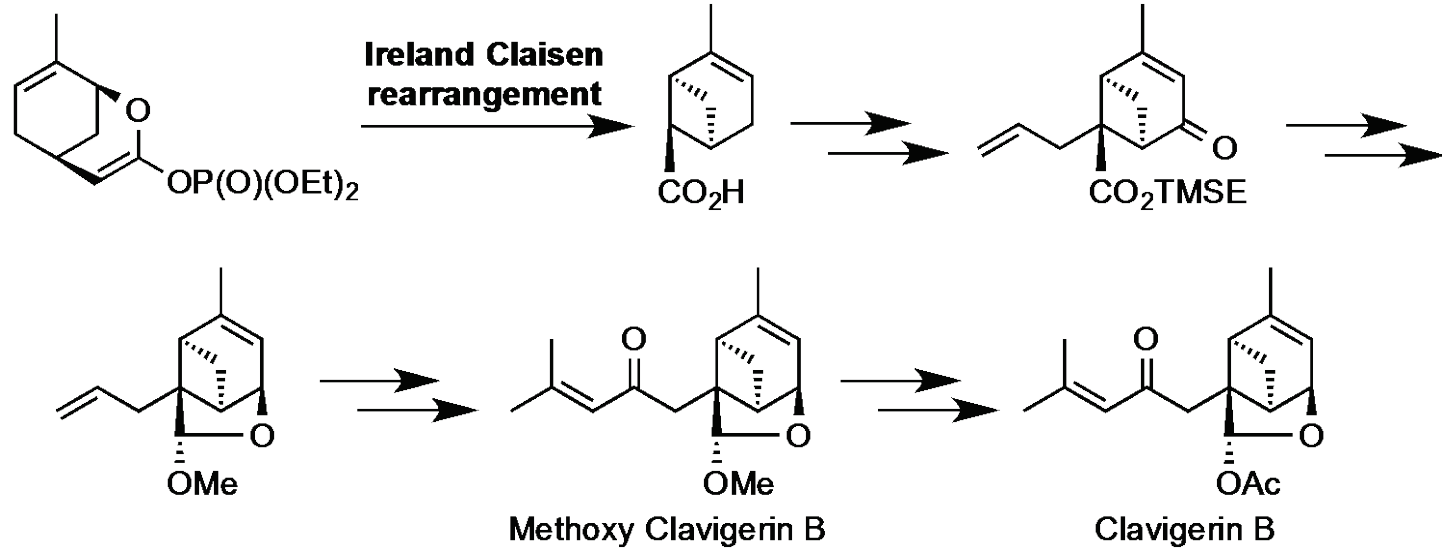
講演番号：3E21p13
講演日時、会場：3 月 28 日 16:32～ E 校舎 21 会場

昆虫摂食阻害活性を有する Clavigerin 類の全合成

Total synthesis of Clavigerins, insect antifeedant compounds

○柿本 望、渡邉 秀典（東大院農生科・応生化）
○Nozomu KAKIMOTO, Hidenori WATANABE (Tokyo Univ.)

【目的】Clavigerin 類はニュージーランドに生息するスギゴケ *Lepidolaena clavigera* より単離、構造決定されたセスキテルペンであり、衣類害虫であるコイガやカツオブシムシの幼虫に対する摂食阻害活性を示すことが報告されている。我々は本化合物の四員環、五員環、六員環を有する三環性の特徴的な構造に興味をもち、絶対立体配置の決定と更なる活性試験への供与を目的として合成研究に着手した。
【方法と結果】我々はエノールホスフェートを用いた Ireland Claisen 転位反応により、ビシクロ［3.1.1］ヘプテン骨格の構築に成功したことを一昨年度の本学会にて報告している。その後、四員環部分にアリル基を導入した後、六員環オレフィンのアリル位を選択的に酸化しエノンとした。続く数工程により環部分の骨格を構築した後、側鎖部分の伸長を行い、Methoxy Clavigerin B、および Clavigerin B の初のラセミ体全合成を達成した。また合成中間体の光学分割を検討したところ、転位体であるカルボン酸とL-プロリノールとを縮合させたアミドのTBS保護体の両ジアステレオマーがシリカゲルカラムクロマトグラフィーで容易に分離可能なことを見出した。今後は得られた両ジアステレオマーより Clavigerin 類の両鏡像異性体を合成し、天然物の絶対立体配置を決定する予定である。



claisen rearrangement, sesquiterpene, total synthesis

講演番号：3E21p14
講演日時、会場：3 月 28 日 16:43～ E 校舎 21 会場

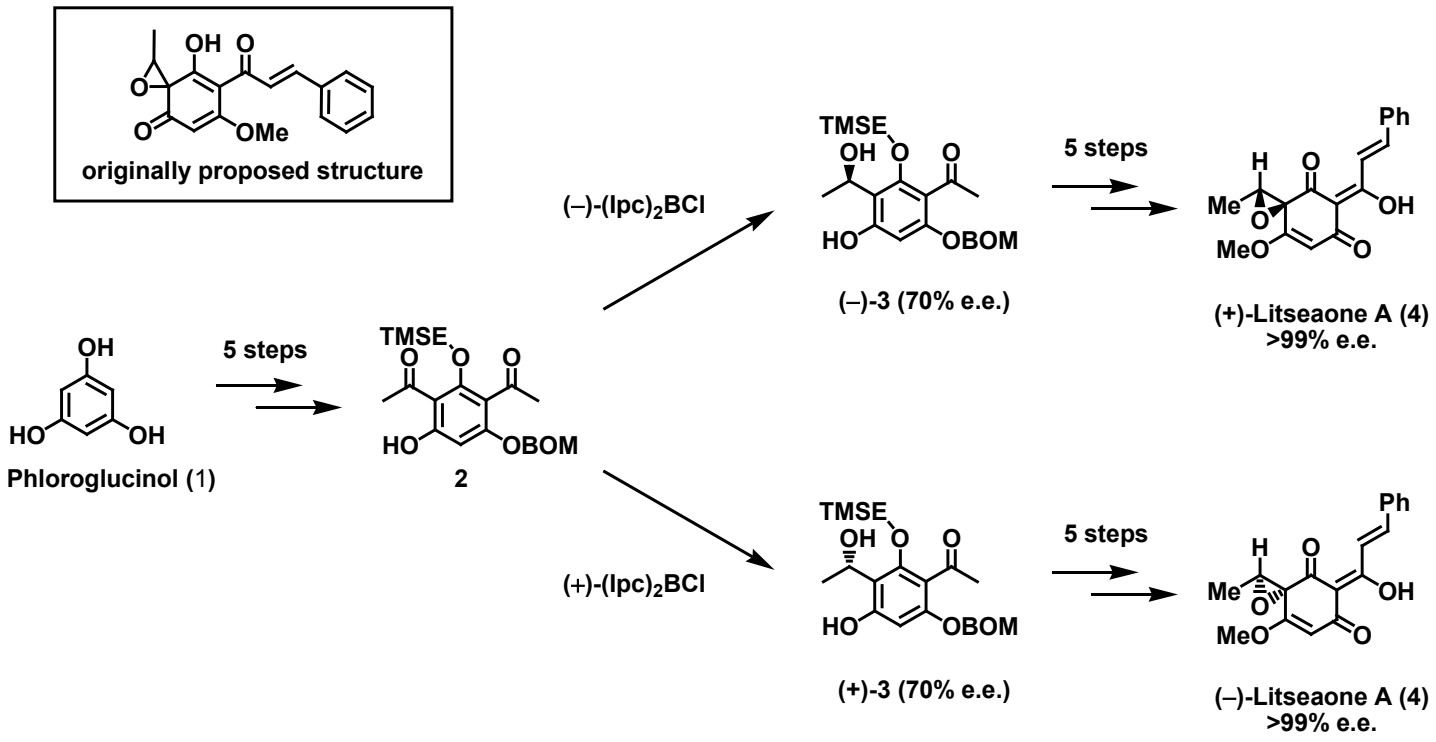
Litseaone A の不斉全合成

Asymmetric total synthesis of Litseaone A

○影治 秀晃、渡邉 秀典（東大院農生科）
○Hideaki KAGEJI, Hidenori WATANABE (Tokyo Univ.)

Litseaone A はハマビワ属の樹木の樹皮より単離された細胞毒性活性を有するカルコン誘導体である。前大会では、本化合物の構造改訂と相対立体配置の決定について報告した。今回、本化合物の初の不斉全合成を達成したのでここに報告する。

フロログルシノール（1）より 5 工程で得られる還元前駆体 2 に対して、(+)および(–)-$(Ipc)_2BCl$を用いた不斉還元を行うことで光学活性なアルコール 3 を得た。このアルコール 3 から 5 工程の変換を経て Litseaone A（4）の両鏡像体の合成を完了した。



total synthesis, natural product, chalcone derivative

講演番号：3E21p15
講演日時、会場：3 月 28 日 16:54～ E 校舎 21 会場

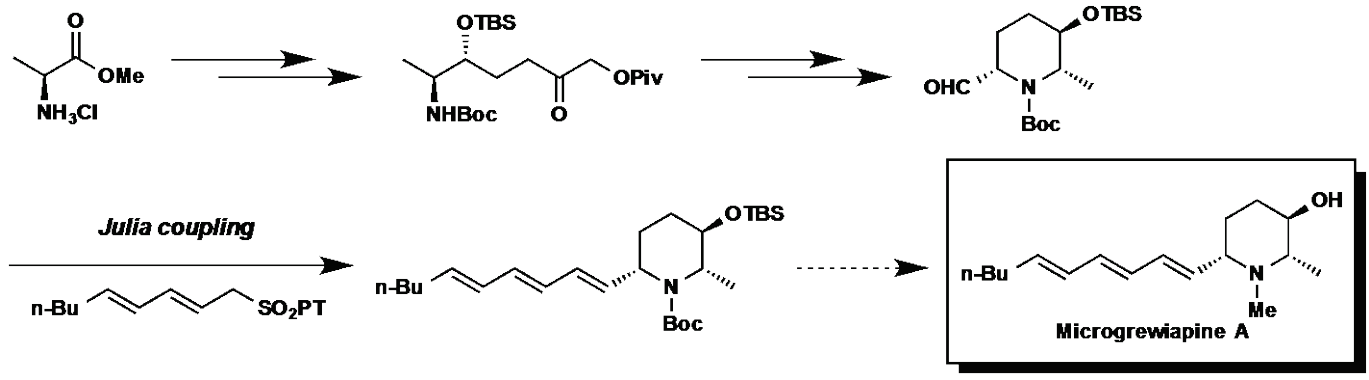
ピペリジンアルカロイド Microgrewiapine A の合成研究

Synthetic study of piperidine alkaloid, Microgrewiapine A

○野上 恭平、石神 健、渡邉 秀典 (東大院農生科)
○Kyohei NOGAMI, Ken ISHIGAMI, Hidenori WATANABE (Tokyo Univ.)

［目的］ ピペリジンアルカロイド類には抗腫瘍活性、殺虫活性など多様な生理活性を有する化合物が知られている。Microgrewiapine A はアオイ科の *Microcos paniculata* L. から単離されたピペリジンアルカロイドで、ヒトのα3β4、α4β2 ニコチン性アセチルコリン受容体（nAChR）のアンタゴニストとして作用すると報告されている[1)]。また、ヒトの結腸腺癌由来の HT-29 細胞に対して選択的な細胞毒性を示すとの報告もある。Microgrewiapine A は 3 つの不斉中心を有するが、その立体化学は ^{1}H NMR の結合定数と改良 Mosher 法によって決定されている。nAChR は様々な疾病に関連することから、我々は本化合物の活性に興味を持ち、合成研究に着手することとした。

［方法・結果］ これまでに当研究室では、殺虫活性を有するピペリジンアルカロイドに関して効率的かつ類縁体合成にも応用可能な合成経路を確立している[2)]。そこで本法を Microgrewiapine A の合成に応用することとした。L-アラニンメチルエステル塩酸塩を出発原料とし 7 工程で環化前駆体を合成した。その後、還元的アミノ化によりピペリジン環を立体選択的に合成し、3 つの不斉中心の構築に成功した。ジエン側鎖とピペリジン環のカップリングには Julia カップリングを用いて種々検討したが、PT スルホンを用いた際に *E* 選択的に反応は進行し、基本骨格の構築に成功した。現在は保護基の除去、メチル基の導入を経て Microgrewiapine A への誘導を検討中である。



1) P.C. Still, B. Yi, T. F. Gonzaĺez-Cestari, L. Pan, R.E. Pavlovicz, H.-B. Chai, T. N. Ninh, C. Li, D. D. Soejarto, D.B. McKay, A. D. Kinghorn; *J. Nat. Prod.* 2013, *76*, 243-249.
2) Y. Nakatani, J. Oshita, K. Ishigami, H. Watanabe, T. Kitahara; *Tetrahedron* 2006, *62*, 160-165

total synthesis, natural product, piperidine alkaloid

講演番号：3E21p16
講演日時、会場：3 月 28 日 17:15～ E 校舎 21 会場

立体選択的 oxypalladation を用いた decytospolide B の合成研究

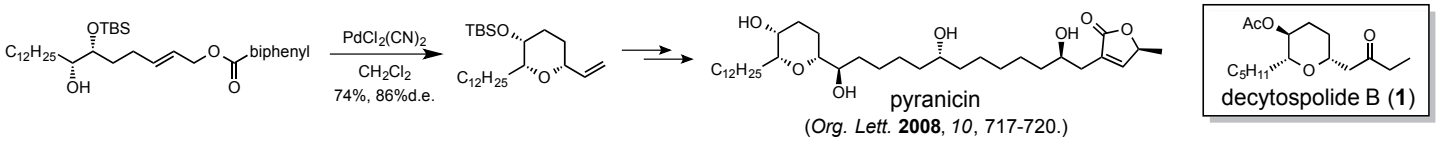
Synthetic studies on decytospolide B via oxypalladation

○黒米 雄次、真壁 秀文（信大院農）
○YUJI KUROGOME, HIDEFUMI MAKABE (Shinshu Univ. Grad. Sch. Agr.)

【背景・目的】

テトラヒドロピラン環は生理活性を有する種々の天然物に含まれる重要な骨格で、その多くが 2,6-*cis*-二置換 THP 環であり、多くの研究グループが効率的な不斉合成法を報告している。

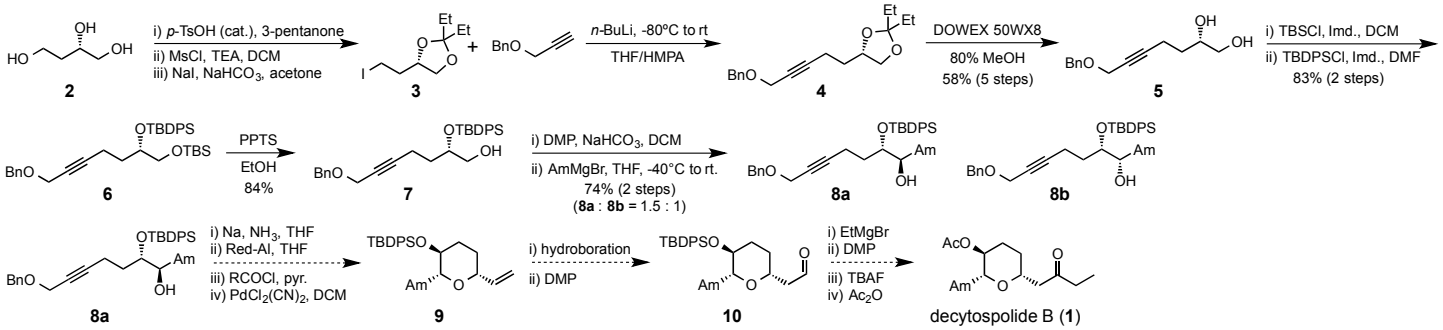
当研究室では 2 価 Pd 触媒によるオキシパラデーションを用いた 2,6-*cis*-二置換 THP 環の立体選択的な構築方法を開発し、ミトコンドリア complex I を強力に阻害する pyranicin の全合成を達成した。環化反応の収率・立体選択性について現在までに更なる最適化を見いだした事から、2,6-*cis*-二置換 THP 環の構築のターゲットとして多くのグループが合成を行ってきた decytospolide B (**1**)の合成を行った。



【方法・結果】

出発物質である(*S*)-1,2,4-ブタントリオール (**2**)の 1,2-ジオールを選択的に保護し、Finkelstein 反応に続くアルキル化反応、一級水酸基の選択的 TBS 保護・脱保護の後、Dess-Martin 酸化によりアルデヒドとした後、Grignard 試薬によりアミル側鎖を導入し精製によりジアステレオマー **8a**, **8b** を分離した。

今後はベンジル基を脱保護して(*E*)-アリルアルコールとし、脱離基を導入しオキシパラデーションにより THP 環 **9** の構築を行う。最後に側鎖を導入し decytospolide B (**1**)の全合成を完了する予定である。



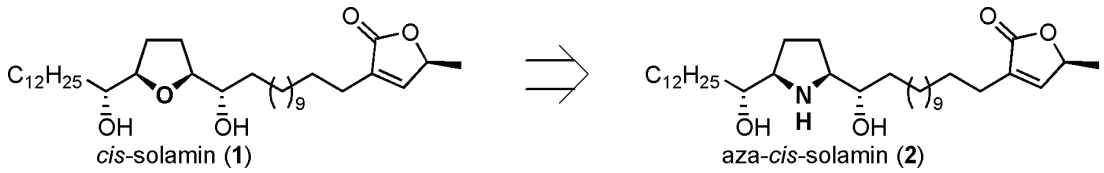
total synthesis, natural product, asymmetric synthesis

講演番号：3E21p17
講演日時、会場：3 月 28 日 17:26～ E 校舎 21 会場

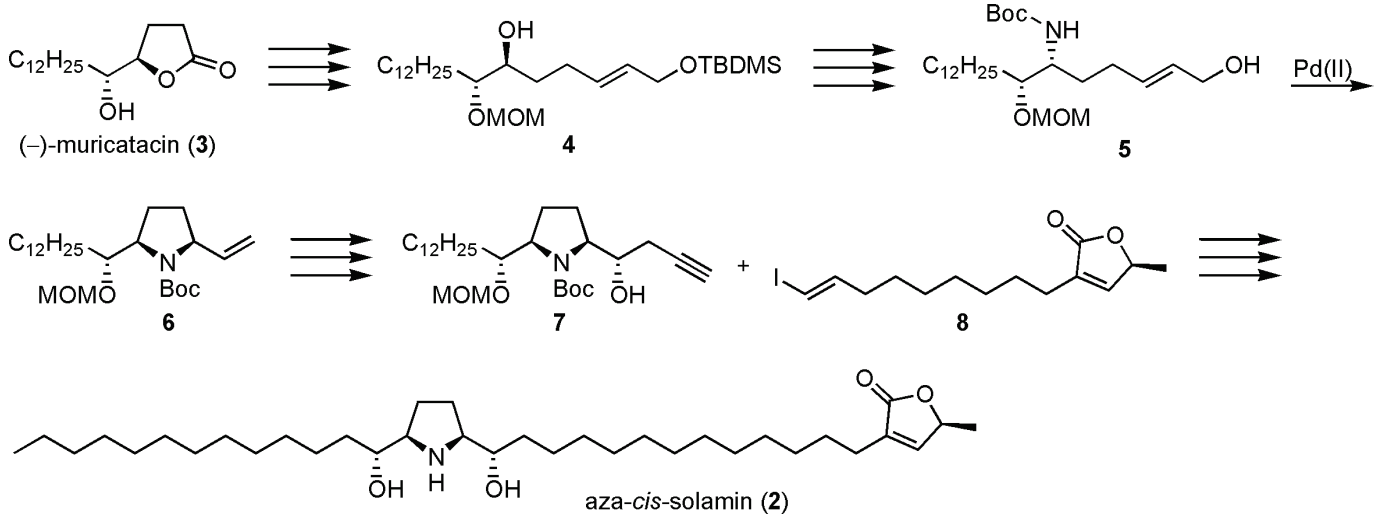
バンレイシ科アセトゲニン類誘導体、aza-*cis*-solamin の合成
Synthesis of aza-*cis*-solamin, an analogue of annonaceous acetogenins

○服部 恭尚[1]、大西 康司[1]、櫻井 春華[1]、葛山 昌伴[1]、古田 善宏[1]、照屋 健太[2]、真壁 秀文[3]、小林 数也[1]、赤路 健一[1] ([1]京都薬大薬、[2]京府医大院医、[3]信州大院農)
○Yasunao HATTORI[1], Kohji Ohnishi[1], Haruka Sakurai[1], Masatomo Katsuyama[1], Masahiro Furuta[1], Kenta Teruya[2], Hidefumi Makabe[3], Kazuya Kobayashi[1], Kenichi Akaji[1] ([1]Kyoto Pharmaceutical Univ., [2]Kyoto Pref. Univ. of Medicine, [3]Shinshu Univ.)

【目的】熱帯・亜熱帯産のバンレイシ科植物によって生産される二次代謝産物であるバンレイシ科アセトゲニン類の生物活性発現メカニズムとして、ミトコンドリア電子伝達系における NADH-ubiquinone oxidoreductase (complex I) の阻害作用が報告されている。今回、現在のところ不明なアセトゲニン類の環上ヘテロ原子が活性に及ぼす影響を明らかにすることを目的とし、*cis*-solamin (**1**) の THF 環上酸素原子を窒素原子に置換した aza-*cis*-solamin (**2**) の合成を行うこととした。



【方法と結果】(–)-Muricatacin (**3**) を出発物質とし、10 工程で環化前駆体 **5** を得た。得られた **5** を二価パラジウム触媒による環化反応に付したところ、望む立体化学を有する環化体 **6** へと導くことに成功した。続く 4 工程の構造変換によりアセチレン **7** へ導き、別途合成したγ-ラクトン部分 **8** との薗頭クロスカップリングを行った後、2 工程で aza-*cis*-solamin (**2**) の合成を達成した。今後、合成した **2** をミトコンドリア complex I 阻害活性試験に供する予定である。



pyrrolidine, natural product, stereoselective synthesis

講演番号：3E21p18
講演日時、会場：3 月 28 日 17:37～ E 校舎 21 会場

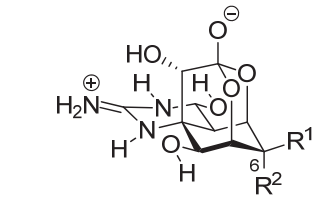
6-epi テトロドトキシンの合成研究

Synthetic studies on 6-epi tetrodotoxin

○橋本 穂果、今津 拓也、榊原 良、安立 昌篤、西川 俊夫 (名大院生命農)
○Honoka HASHIMOTO, Takuya IMAZU, Ryo SAKAKIBARA, Masaatsu ADACHI, Toshio NISHIKAWA (Nagoya Univ.)

【目的】

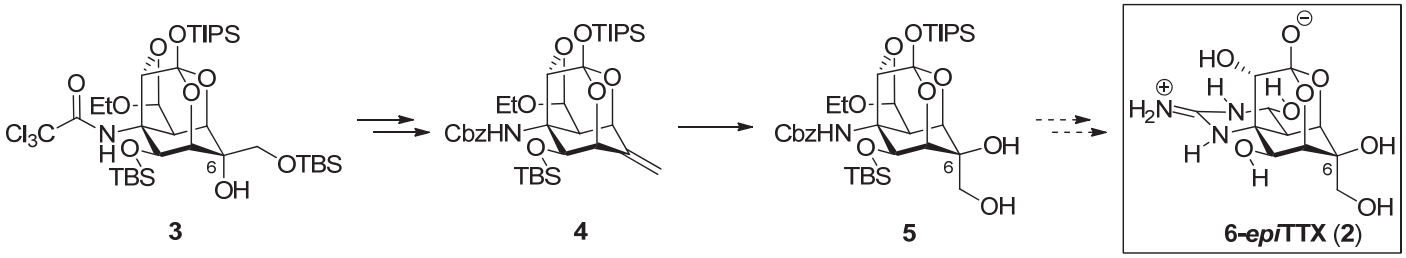
フグ毒テトロドトキシン(TTX, **1**)は、電位依存性ナトリウムチャネル(VGSC)の強力な阻害活性を持つ天然有機化合物である。VGSC には 10 種のサブタイプが存在し、TTX 抵抗性を示すサブタイプも報告されている。当研究室は、これらの機能解明に必要不可欠であるサブタイプ特異的な VGCS 阻害剤の創製を目的として、TTX 類縁体の柔軟な合成法を開発してきた。本研究では、6 位の立体化学がナトリウムチャネル阻害活性に与える影響に注目し、沖縄産シリケンイモリから単離された 6-*epi*TTX (**2**)[1]の全合成を検討した。



TTX (**1**) $R^1 = CH_2OH$, $R^2 = OH$
6-*epi*TTX (**2**) $R^1 = OH$, $R^2 = CH_2OH$

【方法および結果】

当研究室では最近、TTX および天然 TTX 類縁体であるチリキトキシンの全合成に成功した[2]。それらの共通中間体であるエチルアセタール **3** を用い、6 位の立体配置を反転することで 6-*epi*TTX が合成できると考えた。中間体 **3** のトリクロロアセチル基を Cbz 基に変換した後、一級 TBS 基の脱保護と Corey-Winter 反応により *exo*-オレフィン **4** を合成した。さらに、**4** をジヒドロキシル化することで、望む立体配置を持つジオール **5** を得た。現在、ジオール **5** から 6-*epi*TTX (**2**)の全合成を検討中である。



3 **4** **5** **6-*epi*TTX** (**2**)

1) Yasumoto, T.; Yotsu, M.; Murata, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1988***, 110*, 2344.
2) Adachi, M.; Imazu, T.; Sakakibara, R.; Satake, Y.; Isobe, M.; Nishikawa T. *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 1247.

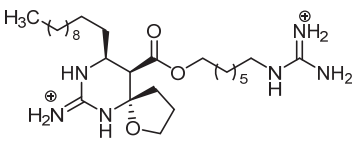
tetrodotoxin, sodium channel, total synthesis

講演番号：3E21p19
講演日時、会場：3 月 28 日 17:48～ E 校舎 21 会場

クランベシン B カルボン酸とその誘導体の不斉合成

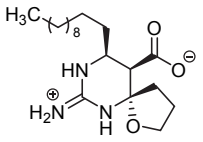
Asymmetric synthesis of crambescin B carboxylic acid and its analogues

○中根 嘉祈、中崎 敦夫、西川 俊夫 (名大院生命農)
○Yoshiki NAKANE, Atsuo NAKAZAKI, Toshio NISHIKAWA (Nagoya Univ.)

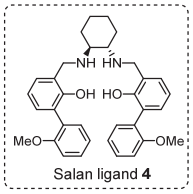

crambescin B

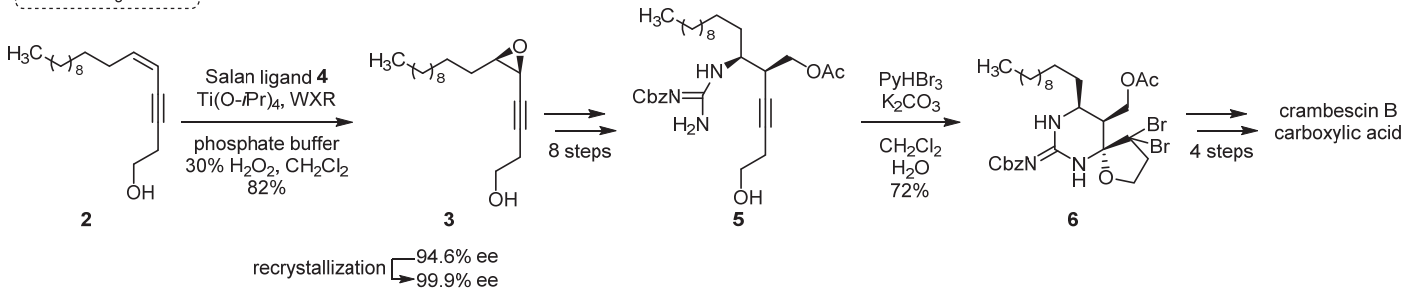
Crambescin 類は、1990 年に Berlinck らによって地中海に生息する海綿 *Crambe crambe* から単離された環状グアニジンアルカロイドである [1]。生理活性として魚毒活性と L1210 細胞に対する細胞毒性を有する。1993 年には Snider らによってラセミ全合成が報告された [2]。

我々はこれまでに crambescin B のエステル化前駆体である crambescin B carboxylic acid(**1**)のラセミ合成を達成している [3]。その後の研究により、**1** が電位依存性 Na^+チャネルに対し非常に強い阻害活性を示すことが明らかとなった。この事実を踏まえ、我々は **1** の不斉合成による両エナンチオマーの化学的供給を目指し研究を開始した。


crambescin B carboxylic acid (**1**)

1-dodecanol から 4 段階で合成されるエンイン **2** に対し、香月らによって報告された salan リガンド **4** を用いた不斉エポキシ化反応 [4] を行うことで高い光学純度を持つエポキシド **3** の合成に成功した。続いて、**3** を種々の官能基変換により環化前駆体 **5** へと導いた後、当研究室にて開発されたカスケード型ブロモ環化反応 [5] を行うことで *gem*-ジブロモスピロヘミアミナール **6** を得た。**6** に対し脱ブロモ化、脱アセチル化、Jones 酸化、脱 Cbz 化反応を行うことで crambescin B carboxylic acid の両鏡像体の不斉合成を達成した。


Salan ligand **4**



References

1. Berlinck, R. G. S.; Braekman, J. C.; Daloze, D.; Hallenga, K.; Ottinger, R. *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 6531.
2. Snider, B. B.; Shi, Z. *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 3828.
3. Nakazaki, A.; Ishikawa, Y.; Sawayama, Y.; Nishikawa, T. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 53.
4. Shimada, Y.; Kondo, S.; Matsumoto, K.; Katsuki, T. *Synlett* **2007**, 2445.
5. Sawayama, Y.; Nishikawa, T. *Synlett* **2011**, 651.

Crambescin, Asymmetric synthesis, Na^+ Channels

講演番号：3E21p20
講演日時、会場：3 月 28 日 17:59～ E 校舎 21 会場

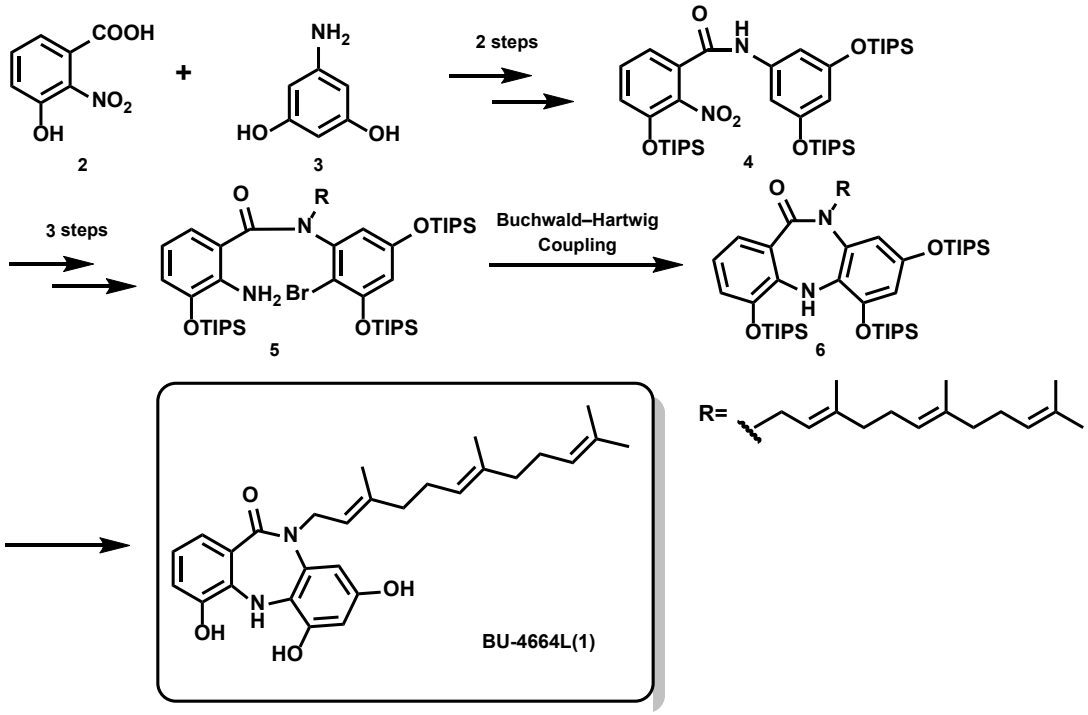
癌細胞浸潤阻害物質 BU-4664L の合成

Synthesis of the tumor cell invasion inhibitor BU-4664L

○高橋 祐介、廣川 高史、藤田 聡美、渡邊 麻衣、桑原 重文（東北大院農）
○Yusuke TAKAHASHI, Takafumi HIROKAWA, Satomi FUJITA, Mai WATANABE, Shigefumi KUWAHARA (Tohoku Univ.)

【目的】BU-4664L (**1**)は放線菌 *Micromonospora* sp. より単離・構造決定された、天然では非常に珍しいジベンゾジアゼピノン骨格にファルネシル側鎖がついた構造を有する化合物である [1)]。**1** はマウス結腸癌細胞 26-L5 に対する浸潤阻害活性(IC_{50} = 1.0 μg/ml)や、HUVEC に対する血管新生阻害活性(IC_{50} = 0.72 μg/ml)を有することが報告されている [2)]。本研究では、**1** の初の全合成および構造活性相関研究に向けた標品供給を目的とした。

【方法・結果】市販の安息香酸 **2** と既知のアニリン **3** を縮合した後、３つのフェノール性水酸基を TIPS で保護して **4** を合成した。アミド部位へのファルネシル基の導入を含む数工程の変換を経て **5** へと導き、これに対して分子内 Buchwald–Hartwig カップリング反応を行うことでジベンゾジアゼピノン骨格を構築し **6** を得た。最後に脱保護を行うことで **1** の全合成を達成した。



1) Igarashi, Y. *et al.*, *J. Antibiot.* **2005**, *58*, 350-352.
2) Miyashita, S. *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 963.

BU-4664L, total synthesis, tumor cell invasion inhibitor

講演番号：3E23a02
講演日時、会場：3 月 28 日 09:11～ E 校舎 23 会場

イネにおけるフェアリーリング惹起物質の生合成経路に関する化学的研究
Chemical studies on biosynthetic pathway of fairy-ring causing substance in rice
○崔 宰熏[1]、岩堀 倫大[1]、鈴木 智大[2]、平井 浩文[1,2]、浅川 倫宏[3]、菅 敏幸[3]、河岸 洋和[1,2,4] ([1]静大院農・応生化、[2]静大・グリーン研、[3]静県大・薬、[4]静大院・創造)
○Jae-Hoon CHOI[1], Tomohiro IWAHORI[1], Tomohiro SUZUKI[2], Hirofumi HIRAI[1,2], Tomohiro ASAKAWA[3], Toshiyuki KAN[3], Hirokazu KAWAGISHI[1,2,4] ([1]Department of Applied Biochemistry, Graduate School of Agriculture, Shizuoka University, [2]Research Institute of Green Science and Technology, Shizuoka University, [3]School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka, [4]Graduate School of Science and Technology, Shizuoka University)

【目的】

我々はフェアリーリング惹起物質としてコムラサキシメジの培養濾液から植物成長調節活性を有する2-azahypoxanthine (AHX) を単離し[1)]、2013年度本大会においてAHXが植物内で内生されていることを報告した[2)]。また、AHXは化学合成法が既に知られており、5-aminoimidazole-4-carboxamide (AICA) を前駆体として合成される。さらに、AHXをイネ科等の植物に投与すると、2-aza-8-oxohypoxanthine（AOH）に代謝され、このAOHもまた植物成長調節作用を有することが確認されている。AOHは市販のキサンチンオキシダーゼの酵素反応によってAHXから合成が可能であるが、植物体内の代謝ではAHXからAOH変換のみを酵素が存在する可能性が示唆されている[3)]。本研究では、AOH合成酵素の単離、精製を目的とした。

【方法・結果】

発芽させ、2週間培養したイネの根をTris-HCl緩衝液で抽出し、硫安沈殿、イオン交換カラム、疎水カラム、アフィニティーカラムなどによる分画を経て得られたフラクションを酵素液とした。透析後、これらに^{13}CラベルしたAHXを添加することでそのAHX変換活性を確認した。その結果、LC-MS/MS分析により、アフィニティーカラムにより精製された画分で^{13}Cラベル化AOHの生成が確認できた。さらに、マスコット解析を行いAHXのみを特異的に変換する画分から酵素の同定を試みている。

1) J-H Choi et al., *ChemBioChem*, 11, 1373-1377 (2010)
2) 崔ら、2012 年農芸化学会大会講演要旨集
3) J-H Choi et al., *Angew. Chem. Int. Ed.*, 53, 1553-1555 (2014)

Fairy-ring, biosynthetic pathway, enzyme

講演番号：3E23a03
講演日時、会場：3 月 28 日 09:22～ E 校舎 23 会場

コムラサキシメジにおける植物成長調節物質の生合成経路に関する化学的研究

Chemical studies on biosynthetic pathway of plant growth regulators in *Lepista sordida*.

○寺島 百合香[1]、圓山 和希[1]、崔 宰熏[1]、鈴木 智大[2]、平井 浩文[1,2]、浅川 倫宏[3]、菅 敏幸[3]、河岸 洋和[1,2,4] ([1]静大農・応生化、[2]静大・グリーン研、[3]静県大・薬、[4]静大院・創造)

○Yurika TERASHIMA[1], Waki MARUYAMA[1], Jae-Hoon CHOI[1], Tomohiro SUZUKI[2], Hirofumi HIRAI[1,2], Tomohiro ASAKAWA[3], Toshiyuki KAN[3], Hirokazu KAWAGISHI[1,2,4] ([1]Grad. Sch. of Agric., Shizuoka Univ., [2]RIGST, Shizuoka Univ., [3]Sch. of Pharm. Sci. Univ. of Shizuoka, [4]Grad. Sch. of Sci. and Tech., Shizuoka Univ.)

【目的】

フェアリーリング惹起物質としてコムラサキシメジ培養ろ液から単離された2-azahypoxanthine（AHX）およびimidazole-4-carboxamide（ICA）は、植物生長調節物質としての活性を有することが示されたが[1,2]、これらの生合成に関与する遺伝子群は未だ同定されていない。また前大会において、AHXおよびICA産生量が増加したArgの^{13}C,^{15}Nラベル化体を添加してコムラサキシメジを培養したところ^{15}N-AHXおよび^{15}N-ICAが検出され、これら化合物の生合成においてArgが窒素源として関与していることを報告した[3]。そこで本研究では次世代シーケンサー（MiSeq）を用いて生合成に関わる遺伝子群の同定及び各種取り込み実験を行い生合成経路の解明を目的とした。

【方法および結果】

AHXの化学合成前駆体であるaminoimidozole-4-carboxyamide (AICA)の代謝経路を阻害する葉酸拮抗阻害剤メトトレキサートを添加してコムラサキシメジを培養したところ、AHX産生量が減少した。よって、コムラサキシメジにおいてもAHXはAICAから合成されることが示唆された。またAICAの生合成前駆体であるAICA-リボチド（AICAR）を添加してコムラサキシメジを培養したところ、AHX産生量が増加した。そこでAICAR添加及び未添加の菌体からtotal RNAを抽出しそれぞれライブラリーの作成を行った。得られたライブラリーは両末端150 bpのPaired-endでシーケンスを行った。現在詳細に発現差解析を行っている。

1) J-H Choi *et al.*, *ChemBioChem*, 11，1373-1377 (2010)
2) J-H Choi *et al.*，*J. Agric. Food Chem.*, 58，9956-9959 (2010)
3) 圓山ら、平成24年度日本農芸化学会大会講演要旨集

Lepista sordida, plant growth-regulation, biosynthetic pathway

講演番号：3E23a04
講演日時、会場：3 月 28 日 09:33～ E 校舎 23 会場

フェアリーリング惹起物質の代謝に関する生物有機化学的研究
Bioorganic chemical studies on metabolism of fairy-ring causing compounds
○澤田 梓[1]、崔 宰熏[1]、鈴木 智大[2]、平井 浩文[1,2]、浅川 倫宏[3]、菅 敏幸[3]、河岸 洋和[1,2,4] ([1]静大農・応生化、[2]静大・グリーン研、[3]静県大・薬、[4]静大院・創造)
○Azusa Sawada[1], Jae-Hoon Choi[1], Tomohiro Suzuki[2], Hirohumi Hirai[1,2], Tomohiro Asakawa[3], Toshiyuki Kan[3], Hirokazu Kawagishi[1,2,4] ([1]Department of Applied Biochemistry, Faculty of Agriculture, Shizuoka University, [2]Research Institute of Green Science and Technology, Shizuoka University, [3]School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka, [4]Graduate School of Science and Technology, Shizuoka University)

【目的】
我々は以前、フェアリーリング惹起物質としてコムラサキシメジの培養濾液から植物成長調節活性を有する 2-azahypoxanthine（AHX）を単離した[1)]。また、AHX は植物に処理することにより 2-aza-8-oxohypoxanthine（AOH）に代謝され[2)]、この AOH もまた植物成長調節活性を有していることが示唆されている[3)]。以前の研究で AHX あるいは AOH を処理したイネの抽出物から AOH のβ-グルコシドである化合物２種及び AHX のβ-グルコシドを単離した[3)]。本研究では、AHX、AOH の植物体内におけるさらなる代謝産物の単離、精製を目的とした。

【方法・結果】
2 週間 AHX 処理したイネをエタノール、アセトンで順次抽出し、得られた可溶部を減圧濃縮後、HPLC による分析を行った。分析の結果、無処理のイネに見られない代謝産物の存在が示唆されたため、各種クロマトグラフィーに供し、精製を行い、代謝産物を単離した。NMR による構造決定を行い、AOH の新たなβ-グルコシドであることを明らかにした。また、AHX 処理イネ抽出物の HPLC 分析よりさらなる代謝産物が検出された。現在それらの代謝産物の単離を試みている。さらに得られた代謝産物の構造を明らかにし、構造活性相関を調べる。

1) J-H Choi et al., *ChemBioChem*, 11, 1373-1377 (2010)
2) J-H Choi et al., *Angew. Chem. Int. Ed.*, 53, 1553-1555 (2014)
3) 竹田翔伍ら、平成 24 年度農芸化学会大会講演要旨集

fairy-ring, metabolism

講演番号：3E23a05
講演日時、会場：3 月 28 日 09:44～ E 校舎 23 会場

フェアリーリング惹起物質配糖化酵素の探索
Search for glucosyltransferase to form glucosides of fairy-ring causing substances
○伊藤 里奈[1]、崔 宰熏[1]、鈴木 智大[2]、平井 浩文[1,2]、浅川 倫宏[3]、菅 敏幸[3]、河岸 洋和[1,2,4] ([1]静大農・応生化、[2]静大・グリーン研、[3]静県大・薬、[4]静大院・創造)
○ Rina Ito[1], Jae-Hoon Choi[1], Tomohiro Suzuki[2], Hirohumi Hirai[1,2], Tomohiro Asakawa[3], Toshiyuki Kan[3], Hirokazu Kawagishi[1,2,4] ([1]Department of Applied Biochemistry, Faculty of Agriculture, Shizuoka University, [2]Research Institute of Green Science and Technology, Shizuoka University, [3]School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka, [4]Graduate School of Science and Technology, Shizuoka University)

【目的】
我々はフェアリーリング惹起物質としてコムラサキシメジ培養濾液から植物成長調節活性を有する 2-azahypoxanthine (AHX)を単離し[1)]、AHX が植物内で内生されていることを報告した。また、AHX をイネ科等の植物に投与すると 2-aza-8-oxohypoxanthine (AOH)に代謝され、この AOH もまた植物成長調節活性を有することが確認されている[2)]。さらに、2013 年度本大会において植物内から AHX 及び AOH の代謝産物が検出され、これらはβ-グルコシドであると報告した[3)]。これらの化合物の生成には glucosyltransferase の関与の可能性が示唆された。本研究では、この酵素を精製､同定することを目的とした。

【方法・結果】
LC-MS/MS における AHX-グルコシド, AOH-グルコシドの最適な検出条件を検討した。また、発芽させ､2 週間培養したイネを地上部と地下部に分け pH 8.1 の 100 mM Tris-HCl buffer (0.4% Triton X-100, 0.1% CHAPS, 1 mM PMSF, 3 mM DTT)で抽出を行い、30%と 70%の濃度で順次硫安沈殿を行った。70%硫安沈殿画分を陰イオン交換カラム DEAE-650M で分画した後、各画分に AHX や AOH を添加することで酵素活性試験を行った。これらを LC-MS/MS で分析したところ、一部の画分でグルコシドの生成が確認できた。現在、さらなる分画の検討を行っている。

1) J-H Choi et al., *ChemBioChem*, 11, 1373-1377 (2010)
2) J-H Choi et al., *Angew. Chem. Int. Ed.*, 53, 1553-1555 (2014)
3) 竹田 翔伍ら、2013 年度農芸化学会大会講演要旨集

fairy-ring, glucosyltransferase

講演番号：3E23a06
講演日時、会場：3 月 28 日 10:05～ E 校舎 23 会場

フェアリーリング惹起物質の代謝産物に関する生物有機化学的研究
Biochemical studies on metabolites of fairy ring causing compounds

○松崎 信生[1]、崔 宰熏[2]、平井 浩文[2,3]、近藤 満[3]、浅川 倫宏[4]、菅 敏幸[4]、鈴木 智大[3]、河岸 洋和[1,2,3] ([1]静大院・創造、[2]静大院農・応生化、[3]静大・グリーン研、[4]静県大・薬)
○Nobuo Matsuzaki[1], Jae-Hoon Choi[2], Hirohumi Hirai[2,3], Mitsuru Kondo[3], Tomohiro Asakawa[4], Toshiyuki Kan[4], Tomohiro Suzuki[3], Hirokazu Kawagishi[1,2,3] ([1]Graduate School of Science and Technology, Shizuoka University, [2]Department of Applied Biochemistry, Graduate School of Agriculture, Shizuoka University, [3]Reserch Institute of Green Science and Technology, Shizuoka University, [4]School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka)

【目的】

フェアリーリングを引き起こす物質として、これまでにコムラサキシメジ（*Lepista sordida*）から、2-azahypoxanthine (AHX) [1] と，imidazole-4-carboxamide (ICA) [2] が単離された。AHX は植物に内生する物質であり、また植物内で 2-aza-8-oxohypoxanthine (AOH) [3] に代謝されて、植物の成長を促進することが明らかにされている。一方 ICA は、主に植物の成長抑制に関わることは示されているものの、植物での内生の有無は分かっておらず、また ICA が植物内でどのような物質に代謝されるのかも、化学的に明らかにされていない。本研究では ICA の代謝産物の構造の決定、代謝産物の活性の調査を目的とした。

【方法・結果】

イネの種子を用意し，培地で 1 週間前培養させた後、ICA の濃度を 0.5 mM に調整した培地に移し替えて、さらに 2 週間培養させた。 培養後、地上部と根部に分けて、エタノール、アセトン抽出を行った。地上部と根部の抽出液をそれぞれ一部取り、HPLC で分析した結果、コントロールのイネでは検出されない、ICA の代謝産物であると考えられるピークが 3 つ検出された。抽出液を濾過した後に、ジクロロメタンで水層と有機層に溶媒分画した。水層を ODS による逆相クロマトグラフィーに供し、ICA の代謝産物の含まれる画分を分画して精製した。得られた代謝産物を構造解析した結果、２つの代謝産物が新規化合物であることが示された。

1) Choi et al, *ChemBioChem,* 11. 1373-1377 (2010)
2) Choi et al, *J. Agric. Food Chem.*, 58. 9956-9959 (2010)
3) Choi et al, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 53. 1552-1555 (2014)

imidazole-4-carboxamide, fairy ring, metabolite

講演番号：3E23a07
講演日時、会場：3 月 28 日 10:16～ E 校舎 23 会場

アンニンコウ(*Grifola gargal*)子実体由来の機能性化合物の探索
Search for functional compounds from fruiting bodies of *Grifola gargal*
○加藤 理史[1]、小堀 一[2]、呉 静[3]、原田 栄津子[4]、鈴木 智大[3]、崔 宰熏[1]、ガバザ エステバン[5]、平井 浩文[1,3]、河岸 洋和[1,2,3] ([1]静大農・応生化、[2]静大院・創造、[3]静大・グリーン研、[4]岩出菌学研究所、[5]三重大医・免疫)
○ Satoshi KATO[1], Hajime KOBORI[2], Wu JING[3], Etsuko HARADA[4], Tomohiro SUZUKI[3], Jae-Hoon CHOI[1], Esteban GABAZZA[5], Hirofumi HIRAI[1,3], Hirokazu KAWAGISHI[1,2,3] ([1]Sch. of Agric., Shizuoka Univ., [2]Grad. Sch. of Sci. and Tech., Shizuoka Univ., [3]RIGST, Shizuoka Univ., [4]Iwade Research Inst., [5]Dept. of Immunol., Mie Univ. Sch. of Med.)

【目的】
アンニンコウ（*Grifola gargal*）はナンキョクブナ属の *Nothofagus oblicua* の枯木や倒木に発生するマイタケと同属のキノコで、チリ南部からアルゼンチン南部のパタゴニア地方原産の大型食用担子菌である。我々はこれまでに、アンニンコウ温風乾燥子実体ヘキサン可溶部および酢酸エチル可溶部から複数の破骨細胞形成阻害物質の単離を報告している [1,2)]。そこで本研究では、アンニンコウ由来の更なる機能性物質の探索を目的とし、抗アレルギー活性などの種々の活性試験を指標にして更なる活性物質の単離を試みた。

【方法・結果】
アンニンコウ子実体の熱水抽出残渣をヘキサン、酢酸エチル、エタノールおよび水で順次抽出した。得られた各可溶部を抗アレルギー活性試験に供したところ、酢酸エチル可溶部が抗アレルギー作用を示した。この結果により、酢酸エチル可溶部を各種クロマトグラフィーによって分画し、数種の化合物の単離に成功した。これらの化合物の構造は、ESI-TOF-MS および各種 NMR スペクトルデータの解析によって同定した。現在、これらの化合物の一部を各種活性試験に供し、その影響を観察している。

1) 吉田ら、2009 年農芸化学大会講演要旨集 p. 7
2) Jing Wu, *et al*. *Tetrahedron* 67, p. 6576-6581 (2011)

Grifola gargal, functional compound, fruiting body

講演番号：3E23a08
講演日時、会場：3 月 28 日 10:27～ E 校舎 23 会場

サクラシメジが産生する機能性物質に関する化学的研究

Chemical studies on biologically functional compounds produced by *Hygrophorus russula*

○森 千夏[1]、呉 静[2]、鈴木 智大[2]、崔 宰熏[1]、平井 浩文[1,2]、河岸 洋和[1,2,3] ([1]静大院農・応生化、[2]静大・グリーン研、[3]静大院・創造)
○Chinatsu MORI[1], Jing Wu[2], Tomohiro Suzuki[2], Jae-Hoon Choi[1], Hirofumi Hirai[1,2], Kawagishi Hirokazu[1,2,3] ([1]Grad. Sch. of Agric., Shizuoka Univ., [2]RIGST, Shizuoka Univ., [3]Grad. Sch. of Sci. and Tech., Shizuoka Univ.)

【目的】

サクラシメジ（*Hygrophorus russula*）はヌメリガサ科ヌメリガサ属のキノコであり、グアテマラ、ロシア、ブータンなどさまざまな国でよく発生する可食性のキノコである。日本では秋にコナラ、ミズナラ、ブナ、カシなどの広葉樹の林の地上に群生する。以前に我々はサクラシメジ子実体からマンノースα1-6結合を特異的に認識するレクチンを報告している。[1)] しかし，このキノコの低分子物質に関する研究はほとんどされていない。そこでサクラシメジ子実体抽出物を抗菌活性試験に供したところ、活性がみられた。本研究では、サクラシメジ子実体から抗菌活性物質などの各種生物活性物質の単離、精製、および構造決定を目的とした。

【方法】

サクラシメジ子実体をエタノール、アセトンで順次抽出し、抽出液を減圧濃縮後、ヘキサン、酢酸エチル、エタノール、水で順次抽出し、得られた各可溶部を抗菌活性試験に供した。抗菌活性が確認された酢酸エチル可溶部を各種クロマトグラフィーによって分画した。

【結果】

酢酸エチル可溶部より、新規化合物を含む数種の物質を単離した。これらの化合物の構造はMS、IRおよび各種NMRスペクトルにより決定した。各化合物は各種生物活性試験に供しているところである。さらに各種活性試験で活性が確認された画分から、活性物質の探索を進めている。

1) Suzuki, T. *et al.* Glycobiology, **22**(5), 616-629 (2012)

Hygrophorus russula, mushroom, structural determination

講演番号：3E23a09
講演日時、会場：3 月 28 日 10:38～ E 校舎 23 会場

ヤマブシタケ培養ろ液由来の生理活性物質の探索
Search for biologically functional compounds from culture broth of *Hericium erinaceus*
○近田 梓[1]、徳永 大輝[1]、呉 静[3]、石神 洸太[1]、鈴木 智大[3]、崔 宰熏[1]、徳山 真治[1]、平井 浩文[1,3]、河岸 洋和[1,2,3] ([1]静大院農・応生化、[2]静大院・創造、[3]静大・グリーン研)
○Azusa KONDA[1], Taiki TOKUNAGA[1], Jing WU[3], Kota ISHIGAMI[1], Tomohiro SUZUKI[3], Jae-Hoon CHOI[1], Shinji TOKUYAMA[1], Hirofumi HIRAI[1,3], Hirokazu KAWAGISHI[1,2,3] ([1]Grad. Sch. of Agric., Shizuoka Univ., [2]Grad. Sch. of Sci. and Tech., Shizuoka Univ., [3]RIGST, Shizuoka Univ.)

【目的】
ヤマブシタケ (*Hericium erinaceus*) はサンゴハリタケ科サンゴハリタケ属の可食性のキノコである。広く北半球温帯以北に分布しており、夏の終わりから秋にかけて広葉樹の立木や枯木などに生える。過去に当研究室は、認知症の予防や治療への有効性が指摘されている神経成長因子の合成を促す物質として、hericenone類およびerinacine類を、それぞれヤマブシタケ子実体および菌糸体から発見した[1-6]。またHeLa細胞に対して増殖阻害活性を示す物質として、ヤマブシタケ培養ろ液からerinapyrone A、Bを単離したが[7]、ヤマブシタケ子実体および菌糸体に比べ、培養ろ液に関する研究はあまり行われていない。そこで本研究では、ヤマブシタケ培養ろ液に由来する生理活性物質の探索を試みた。

【方法および結果】
ヤマブシタケ培養ろ液を減圧濃縮後、ヘキサンおよび酢酸エチルで液 - 液分配を行った。得られたヘキサン可溶部および酢酸エチル可溶部をそれぞれフラッシュクロマトグラフィー、HPLC等を用いて分画し、化合物の単離・精製を試みた。その結果、酢酸エチル可溶部から新規化合物を含む数種の化合物の単離に成功した。これらの化合物の構造はMS、IRおよび各種NMRスペクトル、X線結晶構造解析により決定した。これらの化合物を各種活性試験に供し、生理活性について検討する予定である。

1）Kawagishi H, et al : Tetrahedron Lett. 32, 4561-4364, 1991
2）Kawagishi H, et al : Phytochemistry 32, 175-178, 1993
3）Kawagishi H, et al : Tetrahedron Lett. 35, 1569-1572, 1994
4）Kawagishi H, et al : Heterocycl. Commun. 2, 51-54, 1996
5）Kawagishi H, et al : Tetrahedron Lett. 37, 7399-7402, 1997
6）Lee EW, et al : Biosci. Biotechnol. Biochem. 64, 2402-2405, 2000
7）Kawagishi H, et al : Chemistry Lett. 2475-2476, 1992

Hericium erinaceus, biologically functional compound, structural determination

講演番号：3E23a10
講演日時、会場：3 月 28 日 10:49～ E 校舎 23 会場

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

Search for functional compounds from *Tricholoma flavovirens*

○邱 偉涛[1]、小堀 一[1]、鈴木 智大[2]、崔 宰熏[3]、平井 浩文[2,3]、河岸 洋和[1,2,3]（[1]静大院・創造、[2]静大・グリーン研、[3]静大院農・応生化）
○Weitao QIU[1], Hajime KOBORI[1], Tomohiro SUZUKI[2], Jae-Hoon CHOI[3], Hirofumi HIRAI[2,3], Hirokazu KAWAGISHI[1,2,3] ([1]Grad. Sch. of Sci. and Tech., Shizuoka Univ., [2]RIGST, Shizuoka Univ., [3]Grad. Sch. of Agric., Shizuoka Univ.)

【目的】

キシメジ（*Tricholoma flavovirens*）は、ハラタケ目キシメジ科キシメジ属のキノコである。秋にマツなどの針葉樹林やコナラ、ミズナラなどのナラ類の広葉樹林内の地上に発生し、北半球一帯に広く分布している[1)]。古くから可食性のキノコとして利用されてきたが、化学的研究はほとんど報告されていない。我々はこれまでに、キシメジ子実体ヘキサン可溶部および酢酸エチル可溶部から出芽酵母に対するアンチエイジング活性物質およびレタスの根や胚軸に対する植物成長調節活性物質の単離を報告した[2,3)]。そこで本研究では、このキノコから更なる機能性物質の探索を目的とした。

【方法・結果】

キシメジ子実体をエタノールおよびアセトンにより順次抽出を行った。抽出液を減圧濃縮後、液-液分配する事によって、ヘキサン可溶部、酢酸エチル可溶部、ブタノール可溶部及び水可溶部にそれぞれ分画した。その後、酢酸エチル可溶部を各種クロマトグラフィーに供し、化合物の単離・精製を試みた結果、複数の化合物の単離に成功した。現在、それらの化合物をレタスの根や胚軸に対する植物成長調節活性試験等のバイオアッセイに供し、その活性を観察している。

1）今関　六也ら、日本のきのこ、山と渓谷社、p. 79
2）邱　偉涛ら、平成 26 年度日本農芸化学会大会講演要旨集
3）W. Qiu *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **54**, p. 5481-5483 (2014)

Tricholoma flavovirens, fruiting body, functional compound

講演番号：3E23a11
講演日時、会場：3 月 28 日 11:10～ E 校舎 23 会場

ナラタケ属の産生する他感作用物質に関する化学的研究
Chemical studies on allelopathic compounds from *Armillaria* sp.
○小堀 一[1]、関谷 敦[2]、鈴木 智大[3]、崔 宰熏[4]、近藤 満[1,3,5]、平井 浩文[3,4]、河岸 洋和[1,3,4] ([1]静大院・創造、[2]森林総研、[3]静大・グリーン研、[4]静大院農・応生化、[5]静大院理・化学)
○ Hajime KOBORI[1], Atsushi SEKIYA[2], Tomohiro SUZUKI[3], Jae-Hoon CHOI[4], Mitsuru KONDO[1,3,5], Hirofumi HIRAI[3,4], Hirokazu KAWAGISHI[1,3,4] ([1]Grad. Sch. of Sci. and Tech., Shizuoka Univ., [2]FFPRI, [3]RIGST, Shizuoka Univ., [4]Grad. Sch. of Agric., Shizuoka Univ., [5]Grad. Sch. of Sci., Shizuoka Univ.)

【目的】
タマバリタケ科ナラタケ属 (*Armillaria* sp.) に属する一連のキノコは、現在40種類程が種として認められているが、多数の亜種や変種に富むことが知られている。また、古くから世界中の広い地域で食用として利用されてきた。その一方で、ナラタケ属のキノコは生きている植物に対する影響が非常に強く、その寄生による病害は「ナラタケ病」と呼ばれている。また、ナラタケ属のキノコは他の菌類に対する影響も強く、タマウラベニタケ (*Entoloma abortivum*) やオオミノミミブサタケ (*Wynnea americana*) は近傍にナラタケの菌糸があると奇形子実体を生じることが知られている[1]。しかし、「ナラタケ病」や他の菌類に対する奇形子実体誘導の化学的解明は一切なされていない。
我々は現在までに、ナラタケ属のキノコであるナラタケ488菌株および543菌株培養ろ液からレタスの根や胚軸に対して植物成長調節活性や、複数のキノコに対して菌糸体伸長抑制活性、奇形子実体誘導活性を有する複数の化合物の単離を報告している[2,3]。本研究では、ナラタケ属の複数の菌株から、これらの現象の原因物質の更なる探索を目的とした。

【方法・結果】
ナラタケ属543菌株を約3週間、ポテトデキストロース培地によって液体培養することで得られた培養液を濾過し、菌体および培養ろ液に分けた。培養ろ液を、分液ロートを用いて液-液分配することにより、*n*-ヘキサン可溶部、酢酸エチル可溶部、*n*-ブタノール可溶部および水可溶部に順次分画した。それらのうち*n*-ヘキサン可溶部、酢酸エチル可溶部から数種類の既知化合物および2種類の新規化合物の単離に成功した。また、それらの化合物のうち収量の多いものをキノコの菌糸体やレタスに対する成長調節活性試験に供した。現在、その影響を観察中である。

1) 安藤洋子, 千葉菌類談話会通信 2000, **16-17** 号, 19-25
2) 小堀 一ら, 平成 26 年度日本農芸化学会大会講演要旨集
3) H. Kobori *et al*., *Tetrahedron lett*. 2013, **54**, 5481-5483

Armillaria sp., culture broth, allelopathic compounds

講演番号：3E23a12
講演日時、会場：3 月 28 日 11:21～ E 校舎 23 会場

高等菌類の子実体形成物質の探索

Search for fruiting body-inducing compound(s) in higher fungi

○呉 静[1]、森 千夏[2]、鈴木 智大[1]、崔 宰熏[2]、平井 浩文[1,2]、河岸 洋和[1,2,3] ([1]静大・グリーン研、[2]静大院農・応生化、[3]静大院・創造)
○Jing Wu[1], Chinatsu Mori[2], Tomohiro Suzuki[1], Jae-Hoon Choi[2], Hirofumi Hirai[1,2], Hirokazu Kawagishi[1,2,3] ([1]RIGST, Shizuoka Univ., [2]Grad. Sch. of Agric., Shizuoka Univ., [3]Grad. Sch. of Sci. and Tech., Shizuoka Univ.)

【目的】多くの生物種は、特有のホルモンを有している。しかし、高等菌類であるキノコにおけるホルモンは全く明らかにされていない。キノコ（子実体）を形成する高等菌類は、胞子から菌糸、菌糸から子実体、そして子実体から胞子という生活環を持っている。本研究では、特に菌糸から子実体を発生させる子実体形成物質（発茸ホルモン）の発見を目的とした。
【方法】様々なキノコが、その発生時に菌糸体表面に液体を分泌する。我々は、この液体が子実体形成に深く関与していると考え、fruiting liquid（FL）と命名した。そして、ヤマブシタケ（*Hericium erinaceus*）の FL（Y-FL）を大量（ポット数千個分）に入手し、その Y-FL を減圧濃縮後、ヘキサンおよび酢酸エチルで液-液分配を行った。得られた酢酸エチル可溶部をフラッシュクロマトグラフィー、HPLC 等を用いて分画し、化合物の単離・精製を試みた。さらに、ヤマブシタケやエノキタケ菌糸体等を用いて、これらの化合物の菌糸成長、子実体形成に及ぼす影響を検討した。
【結果】酢酸エチル可溶部から新規化合物を含む数種の化合物の単離に成功した。これらの化合物の構造は MS、IR および各種 NMR スペクトルにより決定した。また Y-FL はエノキタケの子実体形成を誘導した。

fruiting liquid, fruiting body-inducing compound, structure determination

講演番号：3E23a13
講演日時、会場：3 月 28 日 11:32～ E 校舎 23 会場

ツクリタケ（Agaricus bisporus）由来のキノコホルモン候補および新規機能性物質の探索

Search for candidate for mushroom hormone and novel functional compounds from Agaricus bisporus

○須藤 佳葵[1]、呉 静[2]、森 千夏[1]、鈴木 智大[2]、崔 宰熏[1]、平井 浩文[1,2]、河岸 洋和[1,2,3]（[1]静大院農・応生化、[2]静大・グリーン研、[3]静大院・創造）

○Yoshiki Sudo[1], Jing Wu[2], Chinatsu Mori[1], Tomohiro Suzuki[2], Jae-Hoon Choi[1], Hirofumi Hirai[1,2], Hirokazu Kawagishi[1,2,3] ([1]Grad. sch. of Agric., Shizuoka Univ., [2]RIGST, Shizuoka Univ., [3]Grad. Sch. of sci. and Tech., Shizuoka Univ.)

[目的]

多くの生物種は生理的機能を調節する特有のホルモンを有することが明らかとなっている。しかし高等菌類であるキノコにおけるホルモンの存在は確認されていない。キノコ（子実体）は、胞子から菌糸、菌糸から子実体、そして子実体から胞子という生活環を持っており、我々はこの生活環の各段階にホルモンが関与していると予想している。キノコホルモン候補として茶樹茸から単離されたステロイド骨格化合物 chaxine B-E[3,4]、サケツバタケから単離された前例のないステロイド骨格化合物 strophasterol A-D[1,2,3] である可能性高いと推定された。本研究ではキノコホルモン候補を多く含むと予想されるツクリタケ（*Agaricus bisporus*）中の chaxine 類、strophasterol 類の確認、新規機能性物質の探索を目的とした。

[方法および結果]

ツクリタケ子実体をエタノール、アセトンで抽出し、減圧濃縮後、ヘキサン、酢酸エチルで液-液分配を行った。ヘキサン可溶部を各種クロマトグラフィー、HPLC 等を用いて分画し、化合物の単離・精製を試みた。その結果、ヘキサン可溶部より chaxine B を含む数種の化合物の単離に成功した。また、菌糸体を用いた菌糸体伸長阻害活性実験の結果、chaxine 類の 1 種に菌糸体伸長阻害活性が確認された。

参考文献

1) Wu, J. et al., *Angew. Chem., Int. Ed.,* 51, 10820-10822 (2012)
2) Wu J. et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.,* 77, 1779-1781 (2013)
3) 呉静ら、平成25 年度日本農芸化学会大会講演要旨集、p.259
4) Kawagishi, H. et al., *Heterocycles*, 69, 253-258 (2006)
5) Choi, J-H. et al., *Tetrahedron*, 65, 9850–9853 (2009)

fruiting body-inducing compound, chaxine, mushroom

講演番号：3E23a14
講演日時、会場：3 月 28 日 11:43～ E 校舎 23 会場

トリコデルマとの対峙培養で観察されるシイタケ浸出液の成分
Component of *Lentinula edodes* exudate appearing in dual culture with *Trichoderma harzianum*.
○中村 優花[1]、石原 亨[2]、時本 景亮[3]、中島 廣光[2]([1]鳥取大院農、[2]鳥取大農、[3]菌蕈研)
○ YUKA NAKAMURA[1], ATSUSHI ISHIHARA[2], KEISUKE TOKIMOTO[3], HIROMITSU NAKAJIMA[2] ([1]Grad. Sch. Agric., Tottori Univ., [2]Tottori Univ., [3]Tottori Mycol. Inst.)

【研究の背景】
シイタケ（*Lentinula edodes*（Berk.）Pegler）の日本における生産量はきのこ類の中で第 3 位である。シイタケ栽培において害菌・害虫の被害は深刻であり、これらの効果的な防御法の開発が望まれている。本研究室ではこれまで害菌に対するシイタケの防御反応を分子レベルで解明することを目的とした研究を行ってきており、その過程で、害菌の中でも特に危険性の高い糸状菌 *Trichoderma harzianum*（以下、トリコデルマと呼ぶ）とシイタケとの対峙培養において両菌の拮抗部に nona-3,5,7-triyn-1-ol、ω-hydroxypachybasin 等の抗菌性物質の蓄積を見出し報告してきた。本研究では、対峙培養において拮抗線が形成された後に両菌の拮抗部付近のトリコデルマ側菌糸表面に茶黒い浸出液が出現する現象に着目した。この浸出液とシイタケの防御反応との関連を解明するために浸出液成分の化学構造の解明を試みた。また、同成分の生理活性を調べ、さらに対峙培養における蓄積量の分布を明らかにすることで、浸出液生成と拮抗現象との関連を追究することにした。
【方法と結果】
野生株を含むシイタケ 4 菌株の浸出液を HPLC で分析し、共通して存在するピークを特定した。化合物 **1** はそのうちの一つで、シイタケとトリコデルマの対峙培養抽出物中にも存在することから、その単離には浸出液ではなく調製が容易な対峙培養抽出物を用いることにした。シイタケ野生株とトリコデルマを対峙培養し、その対峙培養物のメタノール抽出物を水-酢酸エチルで分配した。得られた酢酸エチル層を HPLC のピークを指標にヘキサン-酢酸エチルを溶出溶媒とするシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し、SepPak C18 カートリッジ処理後、分取 HPLC で化合物 **1** を単離した。収量はプレート 1 枚あたり 0.01 mg であった。NMR、MS スペクトルデータから化合物 **1** を、すでにシイタケ子実体から単離の報告がある 3,7-bis(hydroxymethyl)-1-benzoxepin-5(2*H*)-one と同定した。化合物 **1** はシイタケ単独培養物および対峙培養物の LC-MS 分析では検出されたが、トリコデルマの単独培養物では検出されなかった。化合物 **1** はシイタケに対して 1 mg/mL で弱い生育阻害活性を示し、トリコデルマに対しては 0.5 mg/mL で胞子形成誘導作用と弱い生育阻害活性を示した。化合物 **1** のトリコデルマ抵抗性への関与を明らかにするために、化合物 **1** の上記以外の生理活性を詳細に調べるとともに、トリコデルマに対する抵抗性が異なるシイタケ菌株の対峙培養におけるその蓄積量の違いを調べる予定である。

Lentinula edodes, *Trichoderma harzianum*, secondary metabolites

講演番号：3E23p02
講演日時、会場：3 月 28 日 14:11～ E 校舎 23 会場

抗 HBV 活性を有する真菌由来の新規天然有機化合物

A new Anti-HBV active compound from fungal metabolites

○松永 大輝[1]、金子 学[2]、山口 泰弘[1]、竹内 倫文[1]、渡士 幸一[2]、紙透 伸治[1]、菅原 二三男[1] ([1]東理大理工、[2]国立感染研)
○Hiroki Matsunaga[1], Manabu Kaneko[2], Yasuhiro Yamaguchi[1], Toshifumi Takeuchi[1], Koichi Watashi[2], Shinji Kamisuki[1], Fumio Sugawara[1] ([1]Tokyo Univ. of Sci., [2]NIID)

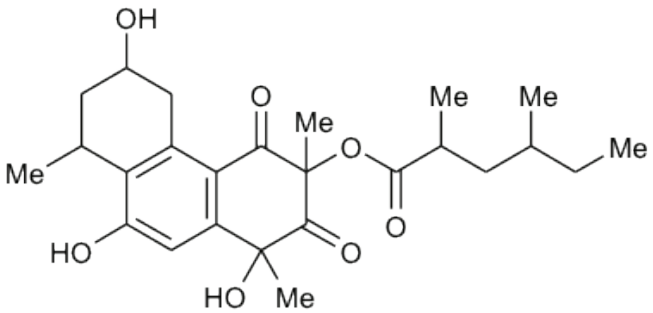
【目的】微生物の二次代謝産物は、多様な構造や有用な生理活性を有している。このような化合物で構成される化合物ライブラリーを種々の生理活性試験に賦すことにより、数多くの生理活性物質が発見されている。

本研究は、抗 B 型肝炎ウイルス (HBV) 活性の探索を目的とした。抗 HBV 薬として、核酸アナログとインターフェロン類の 2 系統が用いられている。しかし、現行の治療法では HBV の完全排除が難しいため、新規抗ウイルス薬の開発が求められている。

そこで、海洋・土壌由来の真菌を単離・培養し、その抽出液から、抗 HBV 活性を有する生理活性物質の探索を試みた。

【方法】日本各地の土壌・海洋生物を採取し、酢酸・アルコールで処理後、付着している真菌を単離した。それから液体培地で 3 ～ 6 週間培養し、その培養液を有機溶媒で抽出した。得られた抽出物をシリカゲルクロマトグラフィーで精製し、化合物を単離した。単離した化合物を MS や NMR などで解析し、その構造を決定した。単離・構造決定した化合物を、抗 HBV 活性試験に賦した。

【結果】千葉県の葛西臨海公園で採取した海砂をエタノール処理後、分離した真菌をポテトデキストブロース培地 (4 L)、39 日間、室温暗所静置培養し、この培養液を塩化メチレンで抽出した。得られた粗抽出物をフラッシュシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製した。単離した化合物を MS、NMR などで解析し、以下のような構造の新規化合物と決定した。また、この化合物の抗 HBV 活性を測定したところ、用量依存的に活性を示すことが明らかとなった。



化合物 **1**

natural product, HBV, fungal metabolites

講演番号：3E23p03
講演日時、会場：3 月 28 日 14:22～ E 校舎 23 会場

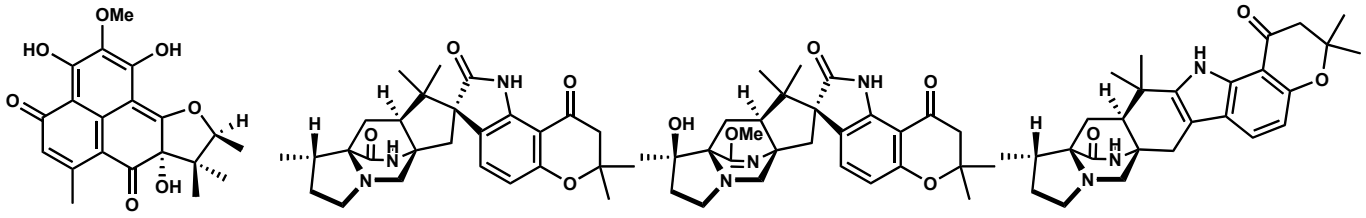
Penicillium herquei が生産する抗 C 型肝炎ウイルス活性を有する新規化合物
A new anti-HCV active compound from metabolites of Penicillium herquei

○錦織 秀[1]、竹本 健二[1]、中嶋 翔[2]、片山 友里[1]、渡士 幸一[2]、紙透 伸治[1]、菅原 二三男[1] ([1]東京理大・理工、[2]国立感染研)
○ Shu NISHIKORI[1], Kenji TAKEMOTO[1], Syo NAKAJIMA[2], Yuri KATAYAMA[1], Koichi WATASHI[2], Shinji KAMISUKI[1], Fumio SUGAWARA[1] ([1]Faculty of Sci. & Technol., Tokyo Univ. of Sci., [2]NIID)

【目的】
真菌の二次代謝産物から新規天然有機化合物を得ること、更に得られた化合物から生理活性物質を見出すことを目指した。

【方法】
日本各地で採取したコケ、海藻、泥などに付着した微生物を PDA プレート培地に播種し、継代を繰り返して微生物を単離した。続いて PDB 液体培地で約 20 日間、室温暗所で静置培養し、塩化メチレンで抽出した。得られた抽出物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー及び逆相 HPLC で精製し、各種化合物を単離した。単離した化合物を NMR・MS などで構造解析し、構造決定した化合物は、がん細胞増殖抑制試験や抗肝炎ウイルス活性試験などに賦した。

【結果】
三重県鳥羽市の海藻から得られた真菌 *Pinicillium herquei* の培養液から、現在までに 4 種の新規化合物を含む、計 8 種の天然有機化合物を単離・構造決定した。新規化合物 **1** はフェナレノン骨格を有する既知化合物 herqueinone の構造類縁体であり、**2**、**3**、**4** はアミド結合を含むビシクロ環と隣接した β-メチルプロリン環、及びスピロ炭素を有する既知化合物 paraherquamide の構造類縁体であった。各種生理活性試験の結果、新規化合物 **1** は抗 C 型肝炎ウイルス (HCV) 活性を示した。



1 **2** **3** **4**

Natural products, Penicillium herquei, HCV

講演番号：3E23p04
講演日時、会場：3 月 28 日 14:33～ E 校舎 23 会場

微生物代謝産物からの MRSA に対する ABK 耐性克服活性物質の探索

Search for circumventors of arbekacin resistance in MRSA

○椎名 真夕[1]、須賀 拓弥[1]、浅見 行弘[1,2]、野中 健一[1,2]、大村 智[2]、塩見 和朗[1,2]（[1]北里大院感染制御、[2]北里大生命研）
○Mayu SHIINA[1], Takuya SUGA[1], Yukihiro ASAMI[1,2], Kenichi NONAKA[1,2], Satoshi OMURA[2], Kazurou SHIOMI[1,2] ([1]Grad. Sch. Infect. Control. Sci., kitasato Univ., [2]Kitasato Inst. Life. Sci.)

【背景と目的】

MRSA 感染症は基礎疾患を有する患者において合併症を引き起す危険性が高く、急性でかつ肺炎のような重篤な症状をきたす。また、MRSA 感染症は緑膿菌などとの混合感染が半数を占め、治療において菌交代症が問題となるケースが多いことが知られている。このような重篤な MRSA 感染症の治療薬として、アルベカシン（ABK）やバンコマイシン、テイコプラニン、リネゾリド、ダプトマイシンなどがあるが、いずれも耐性菌が報告されている。ABK などのアミノグリコシド系薬剤に対する主な耐性化機構は、修飾酵素によることが明らかとされている。特に問題となっている修飾酵素は二機能酵素 AAC(6')/APH(2")である。この酵素が、ABK6'位のアセチル化および 2"位のリン酸化を触媒することで、耐性化がおこる。この酵素を阻害することができれば、ABK 耐性克服に繋がることが期待される。そこで、微生物代謝産物より MRSA に対する ABK 耐性克服活性物質の探索を行った。

【方法】

活性評価はペーパーディスク法により行い、試験菌として臨床分離 ABK 耐性 MRSA TH-1466 株を用いた。菌の増殖に影響を与えない濃度の ABK 含有寒天培地と ABK 非含有寒天培地にそれぞれペーパーディスクを置いて培養後、ABK 含有寒天培地の阻止円径がより大きいものを選択した。単離した活性物質については、リコンビナント大腸菌より精製した二機能酵素 AAC(6')/APH(2")を用いて酵素阻害活性試験を行った。

【結果と考察】

微生物培養液 9,317 サンプルをスクリーニングした結果、19 サンプルの微生物培養液に ABK 含有培地と非含有培地で選択性が認められた。そのうち特に良好な選択性を示した 2 株を培養し、活性物質の探索を行った。糸状菌 *Metarhizium* sp. FKI-7236 株および *Metarhizium* sp. FKI-7513 株より単離した活性物質は、ABK 含有、非含有寒天培地での選択性がいずれも 10 倍であった。この 2 株より単離した化合物の構造と活性について報告する。

MRSA, Circumventor, ABK

講演番号：3E23p05
講演日時、会場：3 月 28 日 14:44～ E 校舎 23 会場

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

Search for inhibitors against Entamoeba histolytica specific biosynthetic pathway of sulfur-containing amino acids produced by microorganisms

○酒井 一成[1]、森 美穂子[1,2]、野中 健一[1,2]、松本 厚子[1,2]、野崎 智義[3]、大村 智[2]、塩見 和朗[1,2] ([1]北里大院,感染制御、[2]北里大,生命研、[3]感染研)
○Kazunari SAKAI[1], Mihoko MORI[1,2], Kenichi NONAKA[1,2], Atsuko MATSUMOTO[1,2], Tomoyoshi NOZAKI[3], Satoshi OMURA[2], Kazurou SHIOMI[1,2] ([1]Grad. Sch. Infect. Control. Sci.,Kitasato Univ., [2]Kitasato Inst. Life. Sci., [3]Dept. Parasitol., NIID)

【背景と目的】赤痢アメーバ症は単細胞の寄生虫（原虫）である赤痢アメーバ（*Entamoeba histolytica*）が水・食物から経口感染し大腸に寄生することにより起こる下痢症であり、熱帯～亜熱帯の開発途上国で感染者が多く見られる。近年、日本でも男性同性愛者間に感染が拡大しており、年間 1,000 件を超える報告がある。治療に用いられている抗菌・抗原虫薬であるメトロニダゾールは、シストには効かないことや耐性原虫の出現、催奇形性等の問題があり、作用機構の異なる新薬の開発が望まれている。我々は赤痢アメーバ特異的な含硫アミノ酸代謝経路（Fig. 1）に着目し、本経路上のセリン-アセチル転移酵素（SAT1, 2, 3）またはシステイン合成酵素（CS1, 2, 3）を阻害する物質は宿主であるヒトに害を及ぼさない抗赤痢アメーバ薬になると考えた。そこで微生物二次代謝産物を探索源とし、SAT、CS を阻害する物質の探索研究を進めた。

【方法】放線菌または糸状菌の培養液を 96 穴プレートに入れ、そこに大腸菌で発現させた酵素（SAT1, 3、CS1, 3）と基質を加え Fig. 1 に示す酵素反応を行った。生成したシステインを酸ニンヒドリン試薬と反応させ 550 nm の吸光度を測定することで検出し、サンプルの酵素阻害活性を調べた。また、阻害活性を示したサンプルがシステイン検出系自体を阻害していないかを確認するために、サンプルにシステイン溶液を加えて呈色反応の阻害を調べた。酵素阻害物質の精製は活性を追跡しながら常法に従って行った。

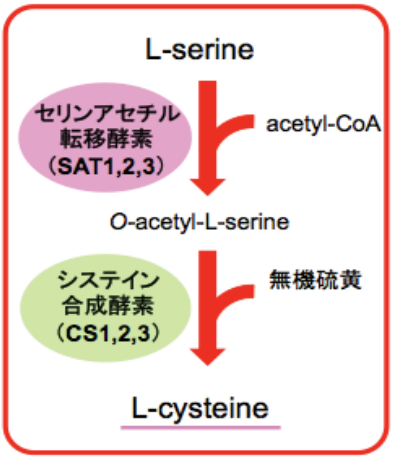


Fig. 1　赤痢アメーバ特異的含硫アミノ酸代謝経路

【結果と考察】4,425 サンプルの糸状菌培養液から属不明の糸状菌 FKI-7005 株培養液に CS1、CS3 両アイソザイムに対する阻害活性を見いだした。この培養液を各種クロマトグラフィーで精製した結果、CS 阻害物質を単離した。本物質の CS1 阻害活性は IC_{50}=11 μg/mL であった。

E.histolytica, microorganisms, inhibition activity

講演番号：3E23p06
講演日時、会場：3 月 28 日 15:05～ E 校舎 23 会場

微生物代謝産物からの抗赤痢アメーバ物質の探索

Search for inhibitors against Entamoeba histolytica produced by microorganisms

○柘植 聡志[1]、森 美穂子[1,2]、野中 健一[1,2]、松本 厚子[1,2]、野崎 智義[3]、大村 智[2]、塩見 和朗[1,2]([1]北里大院,感染制御、[2]北里大,生命研、[3]感染研)
○Satoshi TSUGE[1], Mihoko MORI[1,2], Kenichi NONAKA[1,2], Atsuko MATSUMOTO[1,2], Tomoyoshi NOZAKI[3], Satoshi OMURA[2], Kazurou SHIOMI[1,2] ([1]Grad. Sch. Infect. Control. Sci., Kitasato Univ., [2]Kitasato Inst. Life. Sci., [3]Dept. Parasitol., NIID)

【背景と目的】赤痢アメーバ症は、単細胞の寄生虫（原虫）である赤痢アメーバ（*Entamoeba histolytica*）が腸管に寄生して起こる疾患である。赤痢アメーバ症患者は世界に 5,000 万人存在し、死亡者数は年間 7~10 万人と推定されている。治療薬には主にメトロニダゾールが用いられるが、耐性原虫の出現に加え、催奇形性などの副作用があるため、新たな作用機構を持つ新薬の開発が望まれている。我々は新薬シーズを見出すことを目的に原虫を用いた評価系を構築し、微生物二次代謝産物から抗赤痢アメーバ物質の探索を行った。

【評価系の構築】赤痢アメーバの生育・生存にはシステインが必須であり、ヒトとは異なる酵素を用いてシステインを合成する。そのため赤痢アメーバのシステイン合成経路は創薬標的として適していると考えた。そこでシステイン生合成経路阻害サンプルの選別が可能な評価系を構築した。はじめに一次スクリーニングではシステイン非含有培地を用い、抗赤痢アメーバ活性を示すサンプルを選択した。二次スクリーニングではシステイン含有培地を用いて、抗赤痢アメーバ活性を調べた。システイン含有培地で活性を示すサンプルは標的不明の抗赤痢アメーバ物質、活性のみられないサンプルはシステイン合成阻害物質である可能性が示唆された(Fig. 1) 。三次スクリーニングでヒト繊維芽細胞(MRC-5) に対する毒性の有無を調べ、毒性を示さないものを優先的に選択した。

【結果】北里天然化合物ライブラリーの 219 物質を評価した結果、14 物質が抗赤痢アメーバ活性を示し、そのうち 2 物質にシステイン生合成経路を阻害している可能性を見出した。次に約 3,000 サンプルの放線菌または糸状菌の培養液を評価した結果、26 サンプルが抗赤痢アメーバ活性を示した。うちシステイン生合成経路を阻害する可能性のあるものは 11 サンプルであった。現在、活性を示した微生物培養液から抗赤痢アメーバ物質を精製している。

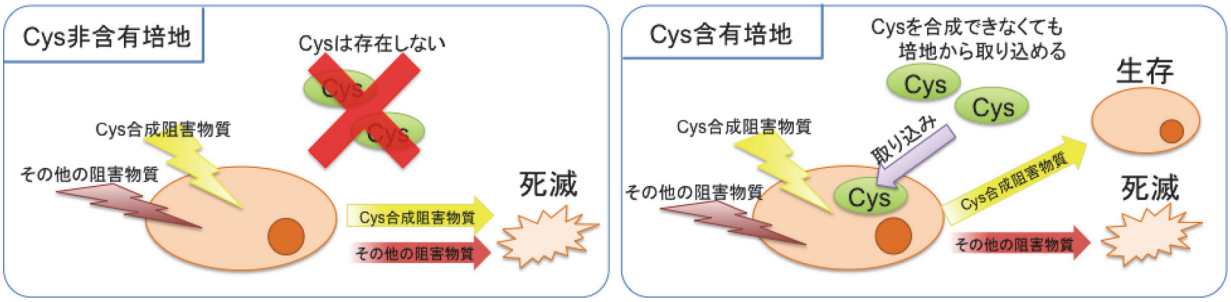


Fig. 1 システイン含有、非含有培地を用いた活性評価

Entamoeba histolytica, inhibitory activity, microbial metabolite

講演番号：3E23p07
講演日時、会場：3 月 28 日 15:16～ E 校舎 23 会場

微生物代謝産物からの metallo-β-lactamase 阻害剤の探索

Search for inhibitors against metallo-ß-lactamase produced by microorganisms

○鹿島 由衣[1]、須賀 拓弥[1]、浅見 行弘[1,2]、岩月 正人[1,2]、野中 健一[1,2]、大村 智[2]、塩見 和朗[1,2]（[1]北里大院感染制御科学、[2]北里大生命研）
○ Yui KASHIMA[1], Takuya SUGA[1], Yukihiro ASAMI[1,2], Masato IWATSUKI[1,2], Kenichi NONAKA[1,2], Satoshi OMURA[2], Kazuro SHIOMI[1,2] ([1]Graduate school of infection Control Sciences, Kitasato University, [2]Kitasato Institute for Life Sciences, Kitasato University)

【背景・方法】

βラクタム系抗菌薬は細菌の細胞壁合成阻害剤であり、その選択性の高さから臨床で頻繁に使用される抗菌薬である。しかし、近年βラクタム薬に耐性を示す菌が問題視されており、その主な耐性機構はβラクタマーゼを産生することによるものである。βラクタマーゼは活性中心がセリン残基のセリンβラクタマーゼ(SBL)と亜鉛原子のメタロβラクタマーゼ(MBL)に大別される。我が国で分離された多剤耐性腸内細菌の約半数はサブクラス B1 に属する IMP 型 MBL 産生株である。また、MBL 産生多剤耐性緑膿菌においても IMP 型 MBL が多数報告され、臨床現場で院内感染の起因菌となりうることから非常に警戒されている。現在までにクラブラン酸やスルバクタムがβラクタム薬との合剤として臨床で使用されているが、これらは SBL を阻害するものであり、MBL を阻害することは出来ない。MBL の阻害剤としては、メルカプト酢酸、カプトプリルといったチオール化合物や金属キレーターが報告されているが、臨床応用に至ったものはなく、有効な MBL 阻害剤の開発が望まれている。

【結果】

日本国内で最も分離される IMP 型 MBL 産生臨床分離株を用いて、微生物代謝産物より MBL 阻害剤のスクリーニングを行った。本スクリーニングにより、糸状菌 *Paecilomyces* sp. FKI-6801 株より活性物質として 3*Z*,5*E*-octa-3,5-diene-1,3,4-tricarboxylic acid 3,4-anhydride (ODTAA) が単離され、実際に MBL 産生大腸菌の粗酵素液を用いた酵素実験により、MBL 阻害活性を有することが示唆された。

さらに、高活性体取得のためメタノール、エタノール、イソプロパノールと脱水縮合させた誘導体を合成した。ペーパーディスク法による活性評価を行ったところ、MBL 産生大腸菌において Et–ODTAA、Me–ODTAA が ODTAA よりもそれぞれ約 10 倍、33 倍高活性であることが明らかとなった。また、βラクタム薬 meropenem (MEPM) との併用効果をチェッカーボード法により調べたところ、ODTAA および ODTAA 誘導体は MEPM と相乗効果を示した。中でも、Et–ODTAA、Me–ODTAA についてはそれぞれ 48.4 μg/mL、6.1 μg/mL を添加することで MBL 非産生大腸菌と同程度まで MEPM 感受性が上がった。

metallo-ß-lactamase, secondary metabolites, IMP1

講演番号：3E23p08
講演日時、会場：3 月 28 日 15:27～ E 校舎 23 会場

微生物代謝産物からのマラリア脂肪酸合成酵素 PfFabI 阻害物質の探索

Search for inhibitors of Plasmodium falciparum FabI from microbial resources

○浮山 颯[1,2]、岩月 正人[1,3]、野中 健一[1,2]、松本 厚子[1,2]、石山 亜紀[1,3]、穂苅 玲[3]、乙黒 一彦[3]、大村 智[2]、塩見 和朗[1,2]（[1]北里大院感染制御、[2]北里大生命研、[3]北里大生命研熱帯病評セ）
○So Ukiyama[1,2], Masato Iwatsuki[1,3], Kenichi Nonaka[1,2], Atsuko Matsumoto[1,2], Aki Ishiyama[1,3], Rei Hokari[3], Kazuhiko Otoguro[3], Satoshi Omura[2], Kazuro Shiomi[1,2] ([1]Grad. Sch. Infect. Control. Sci., kitasato Univ., [2]Kitasato Inst. Life. Sci., [3]Res. Center for Tropical Diseases, Kitasato Inst. for Life Sci., Kitasato Univ.)

【背景と目的】

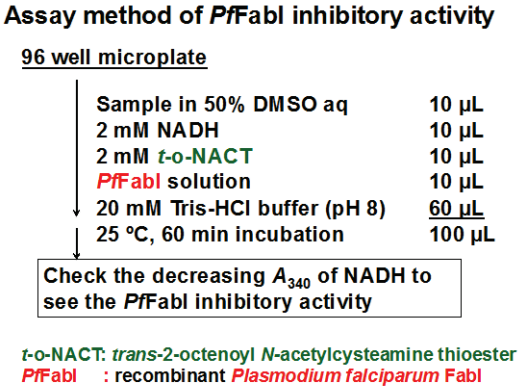
生物が利用している脂肪酸合成系には type Ⅰと type Ⅱが存在する。人を含むほ乳類は type Ⅰ脂肪酸合成系を、植物やマラリア、多くのバクテリアが有する type Ⅱ脂肪酸合成系を利用している。Type Ⅰは一つの酵素が各種の反応を司る。一方、type Ⅱは複数の酵素が反応に用いられている。このような脂肪酸合成系の大きな違いは、選択毒性の高い薬剤探索において有望なターゲットであると考えられる。この合成経路の中でも FabI（*trans*-2-enoyl ACP から acyl-ACP への還元を触媒）はマラリア肝臓後期ステージにおいて原虫の生存に必須であることが明らかになっている。そこで予防薬、伝播阻止薬として利用出来るような化合物を得るために、マラリア原虫の FabI 阻害物質のスクリーニングを行った。

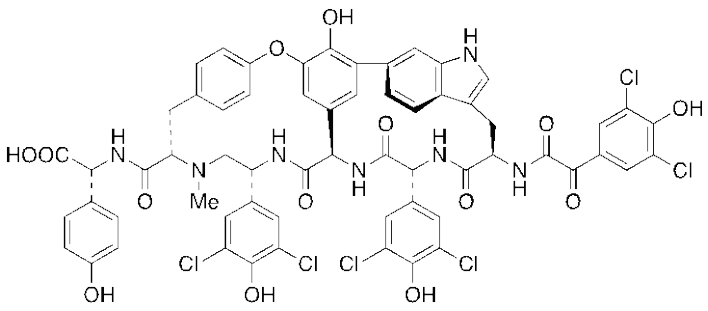
【方法】

発現させた *Pf*FabI に対する阻害活性の評価は、文献（*J. Biol. Chem.*, 2002, **277**, 13106）の方法を参考にした。酵素、基質(crotonyl-CoA もしくは *t*-o-NAC)、NADH を混合し、反応の進行に伴って減少する NADH の吸収(340 nm)をモニターした。

【結果と考察】

糸状菌 1816 サンプル、放線菌 2410 サンプルのスクリーニングを行い、選択された放線菌 K12-0828 株の精製を行った結果、*Pf*FabI 阻害活性物質として complestatin を同定した。Complestatin の *Pf*FabI 阻害活性は IC_{50} = 1.0 μM と非常に強い活性を示しており、また HIV integrase 阻害活性などが報告されているが、FabI 阻害活性は初の知見である。





Complestatin の構造

malaria, fatty acid synthesis

講演番号：3E23p09
講演日時、会場：3 月 28 日 15:38～ E 校舎 23 会場

真菌由来の新規 DNA ポリメラーゼ阻害物質の単離、構造解析

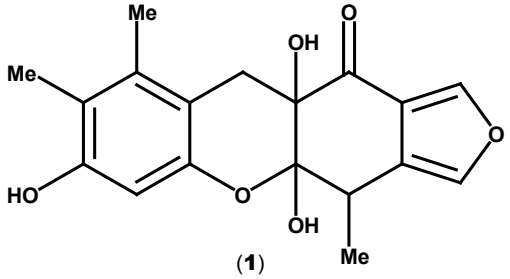
Isolation and structure determination of a novel DNA polymerases inhibitor from fungus

○謝 佩廷[1]、松永 大輝[1]、水品 善之[2,3]、紙透 伸治[1]、菅原 二三男[1] ([1]東京理大・理工、[2]神戸学院大・栄養、[3]神戸学院大・LSC)
○Pei Thing CHIA[1], Hiroki MATSUNAGA[1], Yosiyuki MIZUSHINA[2,3], Shinji KAMISUKI[1], Fumio SUGAWARA[1] ([1]Faculty of Sci. & Technol., Tokyo Univ. of Sci., [2]Faculty of Nutrition, Kobe Gakuin Univ., [3]LSC, Kobe Gakuin Univ.)

【目的】
真菌の二次代謝産物は様々な生理活性を有する化合物が多く存在している。それらは医薬や香料などの開発に利用されている。本研究では、真菌由来の二次代謝産物から新規天然化合物を得ることを目的とした。得られた化合物は、種々の生理活性試験により、生理活性を探索した。

【方法】
日本各地で得られた土壌、樹皮などに付着する真菌を PDB 培地で単離・培養し、有機溶媒を用いて二次代謝産物を抽出した。シリカゲルカラムクロマトグラフィー及び逆相 HPLC によって化合物を精製した。単離した化合物は MS と NMR によって構造解析し、新規物質を探索した。得られた化合物は DNA ポリメラーゼ阻害活性試験, がん細胞増殖抑制試験などに賦した。

【結果】
千葉県野田市で採取した樹皮から単離した菌株を PDB 液体培地で 3 週間、静置培養した後、化合物をジクロロメタンで抽出した。シリカゲルカラムクロマトグラフィー及び逆相 HPLC により精製し、17 種の化合物を単離した。^{1}H 及び ^{13}C-NMR 、2 次元 NMR に基づき、**1** は新規な骨格を有する化合物と推測された。HRMS 分析により、分子式 $C_{18}H_{18}O_6$ が得られた。^{13}C-NMR により、99.8 ppm のシグナルから、**1** はヘミケタールを持った構造であると考えられた。また、HMBC 相関により、下図で示すようなフラン環を含む 4 環性の構造が示唆された。得られた化合物を種々の活性試験を行った結果、**1** は DNA ポリメラーゼ阻害活性を有することが明らかとなった。



(**1**)

DNA polymerase, natural products

講演番号：3E23p10
講演日時、会場：3 月 28 日 15:49～ E 校舎 23 会場

新規 eptaibol 化合物である FKI-6324A は害虫 AAC 遺伝子組換え酵母の増殖を抑制する
FKI-6324A, a new peptaibol-type compound, inhibits the growth of agricultural pest AAC recombinant Saccharomyces cerevisiae

○須賀 拓弥[1]、浅見 行弘[1,2]、橋本 祥平[1]、岩月 正人[1,2]、野中 健一[1,2]、中島 琢自[2]、渡邊 善洋[1]、松本 厚子[1,2]、菅原 亮平[3]、塩月 孝博[3]、山本 武範[4]、篠原 康雄[4]、一丸 直哉[5]、村井 正俊[5]、三芳 秀人[5] ([1]北里大院感染制御科学、[2]北里大生命研、[3]農生資研、[4]徳島大疾患プロテオゲノム研究センター、[5]京大院農)

○Takuya Suga[1], Yukihiro Asami[1,2], Shoei Hashimoto[1], Masato Iwatsuki[1,2], Kenichi Nonaka[1,2], Takuji Nakashima[2], Yoshihiro Watanabe[1], Atsuko Matsumoto[1,2], Ryohei Sugawara[3], Takahiro Shiotsuki[3], Takenori Yamamoto[4], Yasuo Shinohara[4], Naoya Ichimaru[5], Masatoshi Murai[5], Hideto Miyoshi[5] ([1]Graduate school of Infection Control Sciences, Kitasato University, [2]Kitasato Institute for Life Sciences, Kitasato Universityi, [3]Insect Growth Regulation Research Unit, National Institute of Agrobiological Sciences, [4]Institute for Genome Research, Tokushima Univ., [5]Division of Applied Life Sciences, Graduate School of Agriculture, Kyoto Univ.)

【背景】

農業害虫といわれるエンドウヒゲナガアブラムシやコクヌストモドキの ATP は主にミトコンドリアにおいて産生され、生命活動の維持に必要なエネルギー源である。そのため、ヒトとの選択毒性の観点から、ミトコンドリアの ATP 産生を抑制するこれら農業害虫の殺虫剤の実用化は難しいと考えられてきた。しかし、近年ミトコンドリア機能を阻害する fenpyroximate, fenazaquin, pyrimidifen, strobilurin A 等といった高性能の農薬も上市され、安全性の面からも十分に実用化できることが証明されている[1)]。また、ミトコンドリアの複合体 I を作用点とする殺ダニ剤は、ダニ以外の害虫にも有効であることから、化学構造次第では新たな活性や特性を付与した殺害虫剤のシード化合物の創出が期待できると考えられ、ミトコンドリアの ATP 産生に作用点を狙った研究がなされている。

1) 山本出監修 農薬開発の動向生物制御化学への展開 CMC 出版 (2003) pp.99-101.

【目的】

そこで本研究では、殺害虫剤のターゲットとなる標的分子をミトコンドリア内膜に局在する ADP/ATP 輸送体（AAC）とした。害虫の生命維持に必須な ATP 輸送を担う AAC の機能を選択的に阻害することができれば、新しいタイプの殺害虫剤のリード化合物になると期待できる。以上のことを踏まえ、殺害虫剤開発の出発点であるリード化合物となりうる天然物リガンドを微生物二次代謝産物から単離・精製および構造解析して、その天然物リガンドの生物活性を評価することを目的とした。

【方法および結果】

害虫（エンドウヒゲナガアブラムシ、コクヌストモドキ）およびヒトの AAC をミトコンドリア内膜で機能発現させた組換え出芽酵母を用いた。これら出芽酵母株を用いて、害虫の AAC 機能を選択的に阻害し阻止円を形成させる微生物培養液サンプルをペーパーディスク法により選抜し、活性物質の精製を行った。4,380 サンプルの糸状菌および放線菌の微生物培養液から、優先的に害虫 AAC 発現株に阻止円を形成する微生物培養液を見出した。活性物質を取得するために、*Trichoderma* sp. FKI-6324 株を培養後、各種クロマトグラフィーおよび、各種機器分析の測定から、新規 peptaibol 類縁体として FKI-6324A（4.6 mg）を単離・構造決定し、生物活性を評価した。

なお本研究は農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業の支援を受けて行った。

natural product, agricultural pest, mitochondria

講演番号：3E23p11
講演日時、会場：3 月 28 日 16:10～ E 校舎 23 会場

疫病菌 *Phytophthora infestans* の付着器形成阻害物質の同定とその作用

Identification and characterization of an inhibitor of appressorium formation in *Phytophthora infestans*

○川本 真也、谷 修治、甲斐 建次、炭谷 順一、川口 剛司（阪府大院・生環科）
○Masaya KAWAMOTO, Syuji TANI, Kenji KAI, Jun-ichi SUMITANI, Takashi KAWAGUCHI (Osaka Pref. Univ.)

【目的】*Phytophthora infestans* はナス科植物に感染し疫病を引き起こす植物病原卵菌である。*P. infestans* の遊走子嚢は 15℃以上の環境では直接発芽し菌糸を伸長するが，15℃以下では双鞭毛を持つ遊走子を放出する。放出された遊走子は走化的に植物側に遊泳後，シストを形成する。その後シストが発芽し，発芽管の先端に付着器を形成して植物に感染する。この低温に応答した遊走子嚢分化が植物感染および疫病蔓延の主要経路であるものの，クロミスタ界に属する *Phytophthora* の遊走子嚢分化機構は未解明な部分が多い。そこで本研究では，*P. infestans* 遊走子嚢各分化段階を特異的に阻害する物質を土壌中の放線菌が産生する二次代謝産物を対象としてスクリーニングし，同定した物質をツールとして遊走子嚢分化機構を分子レベルで解明することを目的とした。
【方法・結果】フミン酸を単一炭素源とした培地を用いて放線菌を選択的に単離した。放線菌の培養液に等量のアセトンを加えたものをサンプルとして *P. infestans* 遊走子嚢に添加し，10℃に静置して 18 時間後の形態を顕微鏡下で観察した。約 800 株の抽出サンプルについて各分化段階を阻害する活性を探索したところ，付着器形成を阻害したものが 2 サンプル観察され，それらに着目して解析を進めた。付着器形成阻害物質を生産する 2 株の 16S ribosomal RNA 系統解析を行ったところ，共に *Streptomyces chartreusis* の近縁種であった。そこで付着器形成阻害活性のより高かった no. 287 株の培養液から付着器形成阻害物質の精製を試みた。*Streptomyces* sp. no.287 株の培養液 8.7L を等量の酢酸エチルで抽出後，各種クロマトグラフィーにより精製を行い活性物質 3mg を得た。^{1}H-NMR，^{13}C-NMR および ESI-MS スペクトル分析にて構造解析を行った結果，この化合物は Chartreusin であることが判明した。Chartreusin 標品を用いて改めて遊走子嚢分化阻害活性を解析したところ，高濃度の Chartreusin を遊走子嚢に添加した際にはシストの発芽が阻害され，低濃度では付着器形成が阻害された。また，Chartreusin 処理による *P. infestans* 植物感染への影響を評価した。未処理の遊走子はトマトの葉に感染したが，Chartreusin で処理した遊走子は感染能が著しく低下した。今後，Chartreusin を用いて *P. infestans* の感染機構の解析を行う予定である。

Phytophthora infestans, appressoria, chartreusin

講演番号：3E23p12
講演日時、会場：3 月 28 日 16:21～ E 校舎 23 会場

野菜ジュースからの植物疫病菌有性生殖促進物質の探索

Search for sexual reproduction stimulators of *Phytophthora* from a vegetable juice

○天廣 志保、岩井 里佳、小鹿 一（名大院生命農）
○Shiho TENHIRO, Rika IWAI, Makoto OJIKA (Nagoya Univ.)

【背景・目的】疫病菌とは、*Phytophthora* 属の植物病原糸状菌の総称であり, 様々な農作物に感染して葉や果実を軟化腐敗させる。この疫病菌は世界中で甚大な被害を及ぼしており、その基礎的研究や防除は農業上極めて重要である。疫病菌は卵菌類に属しており、通常は無性生殖を営むが、条件が整うと有性生殖も行うことが知られている。疫病菌の有性生殖には、異なる 2 つの交配型 A1 と A2 の共存を必要とするヘテロタリック種（自家不和合性）と自家受精により有性生殖を行うホモタリック種がある。ヘテロタリック種の有性生殖には交配ホルモンα1、α2 が関与している。一方、ホモタリック種では V8 野菜ジュース培地では有性生殖が起こるのに対し、別の培地（グリーンピース培地）では有性生殖が起きないことが判明した。本研究では V8 野菜ジュース中から疫病菌の有性生殖を促進する物質の単離同定を目的とした。

【方法・結果】活性検定にはアズキ茎疫病菌 *Phytophthora vignae* NRBC 30613 用い、有性生殖の際に形成される卵胞子の数を指標に行った。サンプルの DMSO 溶液を混ぜた 1/4 グリーンピース寒天培地に疫病菌を植菌し、25℃、暗所で 9 日間培養後に培地の一部を切り出し、形成された卵胞子数を顕微鏡下で計測した。精製方法としては、まず V8 野菜ジュース終濃度 40%になるようにの MeOH を加えて、室温で 1 時間撹拌することで抽出を行い、吸引濾過により沈殿物を取り除いた。得られた上清を濃縮し ODS オープンカラムに供したところ、60～80%MeOH 溶出画分に卵胞子形成を促進する活性がみられた。この活性画分を逆相 HPLC（MeOH-H_2O）に供して精製し、活性検定を行った。いくつか活性のある画分が得られたが、いずれも微量であったため、さらに V8 野菜ジュースからの量上げをこころみた。これらについても同様に 40%MeOH で抽出、ODS オープンカラムで精製し、活性のあった画分を逆相 HPLC（MeCN-H_2O）によって精製し、複数の活性画分を得た。現在、これら活性画分のさらなる精製を進めている。

Phytophthora, homothalic, sexual reproduction

講演番号：3E23p13
講演日時、会場：3 月 28 日 16:32～ E 校舎 23 会場

粘液細菌由来の抗疫病菌活性物質の単離と構造

Isolation and structure of anti-Phytophtora metabolites from a myxobacterium

○櫨山 大貴[1]、戸村 友彦[1]、不藤 亮介[2]、飯塚 俊[2]、小鹿 一[1]([1]名大院生命農、[2]味の素（株））
○Daiki HAZEYAMA[1], Tomohiko TOMURA[1], Ryosuke FUDOU[2], Takashi IIZUKA[2], Makoto OJIKA[1] ([1]Nagoya Univ., [2]Ajinomoto Co., Inc.)

【背景・目的】　粘液細菌とは、子実体の形成を特徴とする好気性グラム陰性桿菌で多細胞周期を含む複雑な生活環をもつ。粘液細菌からは、現在までに新奇骨格および特異的な生理活性作用を有する化合物が数多く発見されており、これらの化合物はその 5 割が真菌に、3 割が細菌に増殖抑制効果を示す。しかし、粘液細菌は生育が遅いうえ、分離・培養が困難なため、抗生物質資源としてほとんど注目されなかった。しかし、最近では新種が徐々に分離され、そこから従来にない新規な構造を持つ抗生物質が発見されるようになった。中でもセルロース分解性の土壌生育菌である *Sorangium cellulosum* が生産する Epothilone 類という化合物は抗真菌物質として発見され、その後、抗がん剤である paclitaxel と同じ微小管安定作用機構と顕著な抗がん活性が見出され、人工誘導体が抗がん剤として 2007 年、米国で認可されている。我々は、粘液細菌の二次代謝産物に着目し、保有する数株について様々な条件で培養を行い、*Sorangium cellulosum* KU-1 株に強い抗疫病菌活性を見出した（本大会発表)。そこでこの菌株から活性本体を単離することを目的とした。

【方法・結果】　*Sorangium cellulosum* KU-1 株を寒天培地で約 3 週間生育させた後、その菌体を液体培地に接種した。その際、吸着樹脂を加えたもの、ゲルキューブを加えたもの、無添加のものの 3 条件で約 1 ヶ月培養した。その後、菌体をアセトン抽出し、酢酸エチルで分配することで抽出物を得た。その中でも、ゲルキューブでの培養を行った抽出物に植物病原菌 *Phytophthora capsici* に対する抗疫病菌活性と B16 メラノーマ細胞に対する細胞毒性活性が見られたため、カラムクロマトグラフィーと HPLC によって単離精製を行った。しかし、分離した化合物は HPLC において 2 本のピークとして表れ、ピークごとの分取を行っても、もとの 2 本のピークとして表れてしまうため、我々はこの化合物を平衡混合物と予想し、混合物の状態で構造解析を試みた。現在、二次元 NMR による構造解析中である。

myxobacteria, Sorangium cellulosum, anti-Phytophthora activity

講演番号：3E23p14
講演日時、会場：3 月 28 日 16:43～ E 校舎 23 会場

Physicochemical Screening を用いた希少放線菌からの新規物質の探索

Search for new compounds from rare actinomycetes using Physicochemical Screening

○木村 徹[1]、中島 琢自[2]、松本 厚子[1,2]、岩月 正人[1,2]、佐藤 倫子[3]、浅見 行弘[1,2]、塩見 和朗[1,2]、高橋 洋子[2]、大村 智[2] ([1]北里大院・感染制御科学府、[2]北里大・生命研、[3]北里大・薬学部)
○Toru KIMURA[1], Takuji NAKASHIMA[2], Atsuko MATSUMOTO[1,2], Masato IWATSUKI[1,2], Noriko SATO[3], Yukihiro ASAMI[1,2], Kazuro SHIOMI[1,2], Yoko TAKAHASHI[2], Satoshi OMURA[2] ([1]Grad. Sch. Infection Control Sci. Kitasato Univ., [2]Kitasato Inst. Life Sci., [3]Kitasato Univ. Pharm.)

【目的】放線菌は有用な産業微生物であり、その代謝産物から多くの生物活性物質が発見されてきた。その多くは生物活性を指標に見いだされ、医薬品や農薬に活用されている。しかし、その培養液の中には多くの化合物が含まれており、指標した生物活性スクリーニングでは見いだされなかった有用物質が未発見のまま取り残されてきていると考えられる。本研究は植物やその周辺土壌から分離した希少放線菌を用いて、生産物質の吸収スペクトル、分子量や極性など化合物特有の物理化学的性質を指標に物質を探索する方法（Physicochemical Screening）で新規物質の探索を実施した。

【方法】北里大学薬用植物園よりアシタバの根及びその周辺土壌を採取した。その試料を用いて 27ºC で 3 週間培養することにより放線菌を分離した。分離培地には、water proline 寒天培地及び carboxymethyl cellulose 寒天培地を用いた。分離した放線菌は 16S rRNA 遺伝子塩基配列の解析を行い、希少放線菌で生育良好株を選択し、4 種類の生産培地を用いて培養液抽出物を作製した。その培養液抽出物を LC/UV および LC/MS を用いて二次代謝産物を解析した。得られた MS 値や UV 吸収スペクトルなどの物性情報をもとにデータベース検索を行い、新規物質と推定した化合物を精製し、構造解析を行った。

【結果および考察】アシタバの根から 65 株、その周辺土壌から 36 株の放線菌を分離した。その放線菌の中から希少放線菌で生育良好株を 23 株を選択し、機器分析により二次代謝産物の解析を行った。その結果、*Actinomadura* sp. K13-0306 株を Y19-2 培地（2.2% soluble starch, 2.2% glycerol, 3.3% soybean meal, 1.2% meat extract, 2.0% peptone, 2.2% $CaCO_3$）で培養することにより、分子量 569、組成式 $C_{37}H_{47}O_4N$、UV 極大吸収 270, 285 及び 333 nm の物性を有する化合物を生産していた。本物性情報をデータベースで検索した結果、該当する既知化合物はなく新規物質と推定された。本物質の培養条件を検討した結果、soybean meal（SBM）が重要であることがわかり、3.3% SBM で 10L 培養し、各種クロマトグラフィーを用いて精製を行い、目的物質を 8.4 mg 取得することができた。各種 NMR を用いて構造解析を行い、ポリエン化合物であることがわかった。現在、詳細な構造解析を行っている。

Physicochemical Screening

講演番号：3E23p15
講演日時、会場：3 月 28 日 16:54～ E 校舎 23 会場

Talaromyces 属の属内分類群と ukulactone 類縁ポリエン化合物生産との関係
The relationship between infrageneric taxa of *Talaromyces* and production of ukulactone-like polyenes.

○海渕 覚[1]、森 美穂子[1,2]、野中 健一[1,2]、増間 碌郎[1,2]、大村 智[2]、塩見 和朗[1,2] ([1]北里大院感染制御、[2]北里大生命研)
○Satoru KAIFUCHI[1], Mihoko MORI[1,2], Kenichi NONAKA[1,2], Rokuro MASUMA[1,2], Satoshi OMURA[2], Kazuro SHIOMI[1,2] ([1]Kitasato Univ., [2]Kitasato Inst.)

[背景と目的]演者らは新規抗寄生虫薬の開発を目指し、ブタ回虫などの嫌気的な環境に生育する寄生虫に特徴的な呼吸鎖酵素、NADH-フマル酸還元酵素（NADH-fumarate reductaces, NFRD）に対する阻害剤を微生物代謝産物から探索している。その過程において、*Talaromyces* 属糸状菌 3 株が NFRD 阻害活性を持つポリエン化合物群を生産することを見出した。この化合物群はいずれもポリエン鎖でピロン環とオキサビシクロ環がつながれた特異な構造を持ち、なかでもペンタエン鎖を持つ ukulactone 類が強力な NFRD 阻害活性を示した（Ukulactone A: IC_{50}=2.4 nM）[1)]。

Talaromyces 属は形態的特徴および分子系統解析などにより現在 7 節に分類される [2)]。前述の 3 株の生産株について分子系統解析を行った結果、全ての株が *Islandici* 節に分類された。

以上の結果より、*Talaromyces* 属の中でも特に *Islandici* 節に分類される菌株から探索研究を行えば、NFRD 阻害活性を持つ上述の ukulactone 類縁ポリエン化合物を効率よく見出すことが出来るのではないかと考え、本研究では *Talaromyces* 属内の分類群と ukulactone 類縁化合物の生産との関連について調べた。

[方法]保有している *Talaromyces* 属菌は塩基配列にも続く系統解析を行い、既報の分類群へ分類した。その中から 24 株を選出し、コメ培地で 14 日間静置培養した。培養物をメタノールで抽出後、LC-UV で分析することにより、ukulactone 類縁ポリエン化合物の生産を調べた。既知の ukulactone 類縁ポリエン化合物と HPLC での保持時間が一致しなかったものは各種クロマトグラフィーで精製し、構造を調べた。

[結果と考察]24 株中 7 株が ukulactone 類縁ポリエン化合物を生産した。7 株のうち 3 株は上述の 3 株と同じく *Islandici* 節に属し、残り 4 株は *Bacillispori* 節に属する *Talaromyces* 属菌株であった。本結果から *Talaromyces* 属菌の *Islandici* 節と *Bacillispori* 節に属する菌株が ukulactone 類縁ポリエン化合物生産能を有することが明らかになった。さらに、*Bacillispori* 節に属する FKI-6713 株の培養物からは新規 ukulactone 類縁化合物を見出すことができた。生産菌の属内分類に着目することでこれまで報告例の少なかった ukulactone 類縁ポリエン化合物の探索が容易になり、効率よく新規類縁体を見出すことが出来ると考えられた。

1)M. Mori *et al., Tetrahedron* **67**, 6582–6586 (2011)
2)N. Yilmaz*, et al., Stud. Mycol.*,**78** 175–341 (2014)

Talaromyces, chemotaxonomy, NADH-fumarate reductase

講演番号：3E23p16
講演日時、会場：3 月 28 日 17:15～ E 校舎 23 会場

難培養性微生物、粘液細菌由来の新規二次代謝産物の探索

Search for Novel Secondary Metabolites from Culture-Resistance Bacteria, Myxobacteria

○戸村 友彦[1]、櫨山 大貴[1]、不藤 亮介[2]、飯塚 俊[2]、小鹿 一[1]([1]名大院生命農、[2]味の素（株））
○Tomohiko TOMURA[1], Daiki HAZEYAMA[1], Ryosuke FUDOU[2], Takashi IIZUKA[2], Makoto OJIKA[1] ([1]Nagoya Univ., [2]Ajinomoto Co., Inc.)

【背景・目的】

希少な難培養性微生物である粘液細菌は、環境に普遍的に存在しているにもかかわらず、その難培養性からあまり注目されてこなかった。しかし近年になり、粘液細菌が新規性と多様性に富む二次代謝産物を生産することが明らかとなってきた。またこれら二次代謝産物の多くが、抗菌、抗真菌、細胞毒性をはじめとする様々な生理活性を示すことから、医薬品シードの探索源として注目されている。今までに 100 種以上の基本骨格と 500 以上の類縁体が発見されており、これら化合物は主にポリケチドや非リボソームペプチドで構成されている。また粘液細菌のゲノム中には、PKS/NRPS 生合成遺伝子クラスターが多く含まれ、ほとんどは休眠していることがわかっている。そこで本研究では、様々な環境に生息する粘液細菌に注目し、新規二次代謝産物を探索することを目的とした。

【方法・結果】

陸性粘液細菌（2 株）、海洋性粘液細菌（2 株）および温泉性粘液細菌（1 株）の計 5 株を、寒天培地で 1 ヶ月間培養し、これを液体培地に接種後さらに 3 週間から 1 ヶ月間振盪培養した。寒天および液体培地はそれぞれの粘液細菌に適したものを使用し、液体培地については吸着樹脂、ゲルキューブおよび酢酸ナトリウムをそれぞれ加え、またこれらを組み合わせた培養も行った。培養物はアセトンで抽出後、酢酸エチル-水で分配し、酢酸エチル可溶画分を得た。得られた全ての酢酸エチルエキスに対して、B16 メラノーマ細胞を用いた細胞毒性アッセイ、植物病原菌 *Phytophthora capsici* を用いた抗疫病菌アッセイおよび *Candida rugosa* を用いた抗真菌アッセイを行った。その結果、4 つのエキス（KU-1 株+ゲルキューブ、YA-2 株+ゲルキューブ、HB-1 株+吸着樹脂+酢酸ナトリウムおよび HB-1 株+酢酸ナトリウム）が細胞毒性を示し、2 つのエキス（KU-1 株+ゲルキューブおよび KU-1 株+吸着樹脂）が抗疫病菌活性を示した。抗真菌アッセイについては、全てのエキスで活性は確認できなかった。さらに得られた全エキスを逆相 HPLC で分析したところ、培養条件によって含有成分に明瞭な違いが生じることがわかった。現在、活性が確認できたエキスについて、特に新規性の高い温泉性粘液細菌 HB-1 株の活性成分の同定や、培養条件で違いがみえたピークなどの同定を行っている。

myxobacteria, secondary metabolite, cytotoxicity

講演番号：3E23p17
講演日時、会場：3 月 28 日 17:26～ E 校舎 23 会場

土壌細菌のコロニー形成を促進する物質に関する研究

Studies on substances which promote colony formation of soil bacterium

○結城 克哉、河合 亮、山田 哲也、藤野 宣知、長澤 寛道、作田 庄平（東大院農）
○Katsuya YUKI, Ryo KAWAI, Tetsuya YAMADA, Noritomo FUJINO, Hiromichi NAGASAWA, Shohei SAKUDA (Graduate school of Agricultural and Life Science)

【背景と目的】

土壌中には様々な微生物が存在するが、環境要因や休眠状態にあることなどが原因で現在用いられる方法では培養できない難培養性の微生物が多く存在する。そのような微生物を培養可能とする方法の開発を目的として、我々は微生物が固体培地上でコロニーを形成する能力に着目し、その能力を促進する化合物は新規の微生物取得に役立つと考え、そのような化合物の探索を行っている。

当研究室では土壌放線菌の代謝産物を対象にコロニー形成促進物質の探索を行い、MF32 株と 515-5 株を活性物質生産菌として取得した。それら 2 株の放線菌からの活性物質の精製が行われ、515-5 株の生産する活性物質としては L-histidine の類縁体でベタイン構造を有する L-hercynine が同定された。本研究では L-hercynine の生理活性評価、及び MF32 株の生産する活性物質の単離同定を目的としている。

【方法と結果】

コロニー形成促進活性の評価は、サンプルを腐食酸・ビタミン培地に添加し、土壌希釈液を塗布したものを 26.5℃で 7 日間培養した後、形成されるコロニー数をカウントする方法を用いた。

L-hercynie の生理活性を詳細に調べるために、L-hercynie を添加した培地から分離した菌株をベネット液体培地で前培養した後、滅菌水により段階希釈してコントロール及び L-hercynine 含有培地に 5.0 μL スポットし、形成したコロニーの大きさを比較して L-hercynie に感受性のある株を取得した。取得した L-hercynie 感受性株の固体培地上での生育を定量的に測定するため、細胞内 ATP 量を指標とする方法と画像解析による方法を試みた。その結果、画像解析による方法で L-hercynine の添加により増加するコロニーの大きさを数値化することができ、L-hercynine を含む生育促進物質一般について本方法が利用できる可能性が示された。

MF32 株の生産する活性物質については、菌体のメタノール抽出物を活性炭カラムクロマトグラフィーに供して精製を行ったところ、粗生成物が終濃度 12μg/mL で活性を示した。現在は、陽イオン交換カラムクロマトグラフィー、逆相 HPLC により精製を進めている段階である。

soil bacterium, colony formation, L-hercynine

講演番号：3E23p18
講演日時、会場：3 月 28 日 17:37～ E 校舎 23 会場

Sphingomonas sp.の異種バクテリアに対する増殖因子の探索
Growth promoting compound for other bacterial strains produced by *Sphingomonas* sp. for other spiecies
○高井 亮吾、重冨 顕吾、Bhuiyan Mohammad Nazrul Islam、三橋 進也、鎌形 洋一、生方 信（北海道大学院農）
○RYOGO TAKAi, Kengo Shigetomi, Mohammad Nazrul Islam Bhuiyan, shinya Mitsuhashi, Youichi Kamagata, Makoto Ubukata (Hokkaido Univ.)

研究背景、目的）現在、我々の生活では多種の微生物が様々な分野で利用されている。微生物の利用及び研究を行うためには、その微生物を純粋に培養することが必要である。しかし、環境中において純粋に培養が可能な種は全体の 10%以下であるとされており[1)]、残りの 90%以上の種が実験室条件において純粋培養が不可能な難培養微生物である。よって、現在利用不可能な微生物の資源化のために、難培養微生物の培養可能にする技術の確立は重要な課題である。難培養微生物とされている種のなかには、異種微生物間の相互作用の存在下で初めて増殖可能な種が存在する[2)]。このような相互作用を媒介する物質を特定することは、難培養微生物の培養法の確立に新たな知見を提供するものと考えられる。 我々は、このような相互作用を媒介する物質を探索するために、産業技術総合研究所の生物資源情報基盤研究グループにより活性汚泥から分離された 4 種の細菌類（*Sphingomonas* 属 GF9 株、AST4 株、ASTN45 株、ASN212 株）に注目した。AST4 株、ASTN45 株および ASN212 株は、GF9 株がそれぞれに供給する異なる増殖因子を受け取ることで増殖可能になるが、いずれの増殖因子も特定されていない。我々は GF9 株が ASTN45 株に対して供給する増殖因子の単離、精製を目的とした。
実験、結果）GF9 株が ASTN45 株に供給する増殖因子を単離、精製するためにまず GF9 株培養条件の検討および GF9 株の大量培養を試みた。GF9 株が供給する増殖因子生産促進を目的として、培養時の撹拌速度、培養温度および培養時間の検討を行った。その後、検討した条件で 100 Lスケールのジャーファメンターを用いて GF9 株の大量培養を行った。結果、従来の培養条件で培養を行った上清よりも高い活性をもつ培養上清を 270 L 取得した。
次に、得られた GF9 株培養上清を用いて増殖因子の精製を行った。GF9 株の培養上清を *n*-ブタノールを用いて分液を行った後、得られた水層を濃縮し、ASTN45 株に対する増殖活性画分として得た。得られた活性画分に対し、その 100 倍体積のメタノールに滴下することで、活性画分をメタノール可溶部と不溶部に分画した。増殖活性を示したメタノール可溶部を、合成吸着剤ダイヤイオン HP20 を用いたカラムクロマトグラフィーに供し、その非吸着画分を粗精製物として得た。
予備実験により、ASTN45 株に対する増殖因子は塩基性の高極性物質であることが示唆されていた。そこで、増殖因子を脂溶性誘導体へ導き、さらなる分画を行うことを目的として、粗精製物の保護基誘導体化を検討した。
得られた粗精製物に対して TES 基、Boc 基、MOM 基、Cbz 基を用いた誘導体化および脱誘導体化実験を行い、ASTN45 株に対する活性評価を行った。その結果、Boc 化誘導体が他の 3 種の誘導体と比較して高い活性を保持していたが、その活性はいずれも低下していた。
現在、Sephadex LH20 を用いたカラムクロマトグラフィーおよび HPLC を用いた粗精製物のさらなる精製を行い、ASTN45 株に対する増殖因子の単離、構造決定に向けた条件を検討中である。
参考文献） 1) Amann. R. I. *et al.*, *Microbiol Rev.* **59**, 143-146 (1995)
2)Epstein. S. S. *et al., Nature,* **457**, 1083 (2009)

uncultured bacteria

講演番号：3E23p19
講演日時、会場：3 月 28 日 17:48～ E 校舎 23 会場

リグニン由来の芳香族化合物から *Pseudomonas* sp. ITH-SA-1 株が生産するベンゼン環構造を含まない新規有機蛍光ポリマーの生成機構について

Formation mechanism of novel non-aromatic fluorescent polymer produced from aromatic compounds related to lignin by *Pseudomonas* sp. ITH-SA-1

○松藤 寛[1]、瀧原 速仁[2]、砂入 道夫[2]、岩淵 範之[2]([1]日大生資科食生、[2]日大生資科応生)
○Hiroshi MATSUFUJI[1], Hayato TAKIHARA[2], Michio SUNAIRI[2], Noriyuki IWABUCHI[2] ([1]Dept of Food Bioscience and Biotechnology, Nihon Univ., [2]Dept of Applied Biological Science, Nihon Univ.)

【目的】
リグニンは、今日の主要な未利用バイオマスのひとつであり、効果的な有効利用法の開発が望まれている。我々は、微生物機能を利用したリグニンおよび低分子リグニンの高付加価値物質への変換に取り組んであり、これまでに、低分子リグニンの一種であるシリングアルデヒド(SYAL)を基質として、これを変換、重合して有機蛍光物質を生産する *Pseudomonas* sp. ITH-SA-1 を単離している。同菌の蛍光物質生産の代謝経路や生産条件の検討から、本蛍光物質は、SYAL の酸化、脱メチル化により 3-*O*-メチルガリック酸(3-MGA)を経て、その後重合することにより生産されることが明らかとなった。続いて、本蛍光物質の化学構造を検討したところ、構造的には平均分子量が 7.2 kDa と比較的大きく、かつ FT-IR-ATR や NMR 分析からベンゼン環由来のシグナルが全く検出されないことが判明した。

本蛍光物質は、分子内にベンゼン環構造をもたないにも係わらず、高分子量で蛍光を示すという分析化学・構造化学的に現段階では説明のつかない希少な特徴を有し、また未利用バイオマス資源のリグニンを利用した新しい規技術移転の可能性を秘める物質である。それ故、本研究では、構造決定に対する手がかりを得るため、SYAL 等のアナログ物質について検討した。

【方法と結果】
まず初めに、SYAL およびその下流の代謝産物であるシリンガ酸(SYAL)、3-MGA およびバニリン(VNL)など合計 9 種の物質を出発物質とした場合の *Pseudomonas* sp. ITH-SA-1 の蛍光物質の生産について検討した。その結果、MB(マリンブロス)培地、LB 培地に SYAL、SYAC、3-MGA を添加した場合に蛍光物質が生産された。

興味深いことに、LB 培地に 3-MGA を添加した条件では、コントロールとして用いた無菌の条件からも蛍光物質が生産された。この結果を受け、MB、LB 培地を成分ごとに濃度を変化させた系を構築し、3-MGA を添加し、蛍光物質の生産を検討したところ、1%トリプトン水溶液と 3-MGA を混合するだけで蛍光物質が生産されることが明らかとなった。この過程で得られた蛍光物質を抽出、精製し、ゲルろ過 HPLC 解析を行ったところ、その平均分子量は 4.2 kDa であった。続いて、LH-20 C.C.で精製した画分を FT-IR-ATR 及び NMR にて分析したところ、この過程で生産された蛍光物質も分子内にベンゼン環構造を有しないことが判明した。現在、その詳細を検討している。

lignin, fluorescent polymer, Pseudomonas

講演番号：3E23p20
講演日時、会場：3 月 28 日 17:59～ E 校舎 23 会場

メカノセンシティブチャネルは微生物細胞内へのストレプトマイシンのエントリーに関与するか？
Are mechanosensitive channels involved in entry of streptmycin in to the bacterial cell?
○橋本 賢一、矢部 勇、川崎 寿（東電大工）
○Kenichi HASHIMOTO, Isamu YABE, Hisashi KAWASAKI (Tokyo Denki Univ.)

【背景および目的】
結核は、結核菌が肺の中で増殖することによって発病する。世界の総人口の約 1/3 はこの高い感染性を持つ微生物に感染しており、一年あたり 860 万人が新たに発病し、130 万人が命を落としている。さらに結核の問題は HIV との重複感染や多剤耐性化により一層深刻化している。ストレプトマイシンは結核の治療に用いられた最初の抗生物質である。この抗生物質はバクテリアのタンパク質合成を阻害することで幅広い微生物種に対して抗菌活性を示すが、細胞内への侵入機構は未だ解明されていない。ストレプトマイシンの細胞内への侵入機構を解明することができれば結核の新しい治療法の確立に繋がる可能性がある。本年、メカノセンシティブチャネル(Msc)がこの抗生物質の細胞内への侵入に関与している可能性が示唆された(Iscla *et al.*, *Nat Commun.*, 2014)。本研究は培養実験とパッチクランプ法による電気生理学実験を合わせて用い、ストレプトマイシンの細胞内への侵入機構を解析することを目的とした。
【方法及び結果】
Msc の一種である MscL が欠損した *Escherichia coli* にプラスミドを用いて MscL を導入すると、ストレプトマイシンの感受性が増加すること、*E. coli* の Msc はこの物質により開口されやすくなることが先の報告で示された。我々は新たに結核菌と類似した細胞表層構造を持つ *Corynebacterium glutamicum* において MscL 欠損株は野生株と比較し高い感受性を持つ知見を得た。しかしその差は大きなものではなく、ストレプトマイシンは他の担体を通して細胞内に侵入している可能性も考えられた。我々は既に *C. glutamicum* のグルタミン酸排出担体であり、Msc の一種である MscS が圧力依存的に開口し、ATP などのエネルギーを使わず、濃度勾配のみによりグルタミン酸を通過させることを明らかにしている(Hashimoto *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2012 論文賞受賞)。この際に利用した微生物パッチクランプシステムを用い、野生型の *Bacillus subtilis* にてストレプトマイシンの Msc 活性に与える影響を解析したところ、ストレプトマイシン存在下ではより低い細胞膜張力で Msc が開口すると考えることのできるデータを取得した。この結果は *B. subtilis* においてもストレプトマイシンにより Msc がより開口しやすくなる可能性を示唆する。

Streptmycin, Mechanosensitive channel

講演番号：3D23a01
講演日時、会場：3 月 28 日 09:00～ D 校舎 23 会場

新規植物免疫制御剤の作用機構の解析

Mode of action of novel activators and suppressors of plant defense responses

○北畑 信隆[1]、大滝 幹[1]、吉川 岳史[1]、助川 夏雄[1]、吉田 亜祐美[1]、木村 貴史[1]、羽山 大介[1]、来須 孝光[2]、浅見 忠男[3]、朽津 和幸[1] ([1]東京理科大学理工学部、[2]東京工科大学応用生物学部、[3]東京大学大学院農学生命科学研究科)
○Nobutaka KITAHATA[1], Takashi Otaki[1], Takefumi Yoshikawa[1], Natsuo Sukegawa[1], Ayumi Yoshida[1], Takashi Kimura[1], Daisuke Hayama[1], Takamitsu Kurusu[2], Tadao Asami[3], kazuyuki kuchitsu[1] ([1]Tokyo Univ. of Sci., [2]Tokyo Univ. of Tech., [3]Tokyo Uni.)

卵菌由来のタンパク質性エリシターcryptogein によりタバコ培養細胞 BY-2 に誘導される一連の反応は、感染防御応答シグナル伝達系の優れたモデル系である。我々は、cryptogein により誘導される ROS 生成のパターンと遺伝子発現や過敏感細胞死等の防御応答との相関性を見出し、それに基づき ROS 生成を指標とした簡便な植物免疫制御剤のスクリーニング系を考案した(PCT 出願済)。

約 11,000 化合物からなるケミカルライブラリーを対象としてケミカルスクリーニングを行った結果、56 種の化合物を植物免疫活性化剤の候補化合物として選抜した。植物の感染防御応答の主要な経路である、サリチル酸経路とジャスモン酸/エチレン経路のマーカー遺伝子の発現に対する候補化合物の影響を解析すると共に、サリチル酸・ジャスモン酸・エチレンの生合成やシグナル伝達系の欠損変異体を用いて、化合物の作用点の解析を進めている。一方、感染防御応答に伴う ROS 生成を抑制する化合物も、植物の防御応答機構を解明するために有用なツールとなる。そこで、構築した選抜系を改変して、ROS 生成を強く抑制する化合物のスクリーニングを行い、26 化合物を選抜した。NADPH oxidase/Rboh の異種発現系(Ogasawara *et al.* JBC 2008)を用いた解析の結果、このうち 4 つの化合物が Rboh の阻害剤である可能性が示唆された。

また、既存の酵素阻害剤を対象とした選抜を行った結果、PI3K 阻害剤を植物免疫活性化剤の候補化合物として見いだした。PI3K は、複数の細胞内膜交通系の制御に関与することから、シロイヌナズナの各種膜交通系の変異体を用いて、PI3K 阻害剤の作用点の解析を行った。flg22 誘導性の ROS 生成を指標として、変異体における PI3K 阻害剤の効果を調べた結果、薬剤処理で ROS 生成が亢進しない変異体を見いだした。一方、これらの変異体では、flg22 処理時の ROS 生成は、野生型に比べ亢進していた。これらの結果から、PI3K 阻害剤による ROS 生成の亢進効果には、膜交通系の一部が関わっていることが示唆された。flg22 の受容体である FLS2 は、リガンドを受容後、エンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれ、最終的に液胞に輸送され分解される。PI3K 阻害剤の免疫亢進効果が、FLS2 の細胞内動態を変化したことによるものか検証するために、現在、PI3K 阻害剤処理時の FLS2-GFP の細胞内動態について定量的なイメージング解析を行っている。

本発表では、各候補化合物の作用機構、及び細胞内膜交通系を介した感染防御応答の制御機構について議論したい。

plant activator, salicylic acid, Rboh

講演番号：3D23a02
講演日時、会場：3 月 28 日 09:11～ D 校舎 23 会場

EPR1 過剰発現イネに認められる Xanthomonas oryzae pv. oryzae に対する病害抵抗性の分子機構
Mechanism of disease resistance to Xanthomonas oryzae pv. oryzae in EPR1 over-expression rice
○堀家 史哉[1]、平井 洋行[1]、宇野 雄太[1]、寺沢 勇治[1]、奥山 愛梨[2]、久保 健一[3]、仲下 英雄[4]、蔡 晃植[1] ([1]長浜バイオ大院バイオ、[2]長浜バイオ大バイオ、[3]奈良先端大バイオ、[4]福井県立大生物資源)
○Fumiya HORIIE[1], Hiroyuki Hirai[1], Yuta Uno[1], Yuji Terasawa[1], Eri Okuyama[2], Kenichi Kubo[3], Hideo Nakashita[4], Fang-Sik Che[1] ([1]Grad sch Nagahama bio Univ., [2]Nagahama bio Univ., [3]NAIST, [4]Fukui prefectural Univ.)

これまでに我々は、*EPR1* 過剰発現イネ（*EPR1*-ox）とその培養細胞がイネ白葉枯病菌 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*)に対して病害抵抗性を示すことを明らかにすると共に、*EPR1*-ox 培養細胞の培地上清には、*Xoo* の生育を強く阻害する生育抑制活性が存在することを示した。そこで、*EPR1*-ox における *Xoo* に対する病害抵抗性の分子機構を解明するため、*EPR1*-ox 培養細胞の培地上清に存在する *Xoo* に対して生育抑制活性を示す物質の同定を試みた。*EPR1*-ox とコントロールイネ培養細胞の培地上清に存在するタンパク質を硫安沈殿で濃縮し、それぞれ *Xoo* に処理したところ、*EPR1*-ox の培地上清から精製したタンパク質のみに *Xoo* に対する生育抑制活性が認められた。そこで、それぞれのイネ培養細胞培地上清に存在するタンパク質をプロテオーム法で解析したところ、*EPR1*-ox イネ培養細胞の培地上清中に PR5、PR7、PR8 などの Pathogenesis-related protein のいくつかが顕著に蓄積していることが明らかとなった。次に、*Xoo* の生育を抑制する活性を有する PR タンパク質を同定するため、*PR5*、*PR7*、*PR8* 遺伝子を過剰発現させたイネ（*PR5*-ox、*PR7*-ox、*PR8*-ox）を作成した。作成したイネ培養細胞の培地上清における *Xoo* に対する生育抑制活性を調べたところ、*PR7*-ox、*PR8*-ox の培地上清に *Xoo* の生育抑制活性が存在した。このことから、PR7 および PR8 が *EPR1*-ox イネにおいて認められる *Xoo* に対する生育抑制の主要な原因物質であることが示された。次に、これら *PR7* および *PR8* 遺伝子の発現を制御する転写因子を同定するため、*EPR1*-ox において発現上昇する転写因子を、マイクロアレイで解析したところ、5 個の転写因子を同定することができた。そこで、これらの転写因子が実際に *PR* 遺伝子の発現を制御しているかを調べるため、これらの転写因子を過剰発現させたイネ細胞における各 *PR* 遺伝子の発現量をそれぞれのプロモーターの下流にルシフェラーゼ遺伝子を連結したベクターを用いたプロモーターアッセイにより解析した。その結果、OsNTF1 (NAM domain-containg transcription factor) と名付けた転写因子を発現させたイネプロトプラストでは PR7 と PR8 の発現量が増加することが示され、OsNTF1 がこれら *PR* 遺伝子の発現を制御している転写因子であることが示された。

xoo, PR

講演番号：3D23a03
講演日時、会場：3 月 28 日 09:22～ D 校舎 23 会場

馬鈴薯塊茎皮における病害抵抗性関連タンパク質の探索

A search for the pathogenesis related protein in the potato tuber skin.

○三沢 翔太[1]、土肥 奈津枝[2]、御子神 玲香[2]、加藤 順[1]、田中 正起[3]、守屋 明博[3]、春見 隆文[1]、荻原 淳[1] ([1]日大院生資研究科　生資利用、[2]日大生資科　生命化、[3]ホクレン農業総合研究所)
○Shota MISAWA[1], Natue DOHI[2], Reika MIKOGAMI[2], Jun KATO[1], Masaki TANAKA[3], Akihiro MORIYA[3], Takafumi KASUMI[1], Jun OGIHARA[1] ([1]Dept. Biores. Util. Sci., Grad. Sch. Biores. Sci., Nihon Univ, [2]Dept. Chem. Life. Sci., Nihon Univ, [3]HOKUREN Agricultural Research Institute)

目的）馬鈴薯そうか病は古くから知られている重要病害であり、数種の *Streptomyces* spp.によって引き起こされる。そうか病菌は塊茎が肥大化し始めたストロン先端部に感染、塊茎表面上に瘡蓋状の病斑を生じ、商品価値を著しく低下させる。その被害は世界の馬鈴薯生産地域に広がっており、効果的な防除法、新規抵抗性品種の開発が望まれている。
植物は病原菌の侵入を感知すると、抵抗性遺伝子が活性化し、防御遺伝子に情報が伝達される。防御遺伝子が活性化することにより、植物内の代謝が変動し様々な防御反応が発現する。その中には PR タンパク質(Pathogenesis Related Protein)などの植物の抵抗性に関連するタンパク質が多く発現される。
現在までに多くの病害抵抗性品種が開発され、各品種間の抵抗性の強弱が明らかになっている。しかし、品種間における抵抗性の強弱と抵抗性関連物質との相関に関する知見は得られていない。そこで本研究では、各品種における馬鈴薯塊茎皮由来タンパク質を網羅的に解析し、発現タンパク質、その量的変化を比較することにより、病原菌感染に対する抵抗性に関与する物質の推定、さらに抵抗性メカニズムの解明を目的とした。
方法及び結果）馬鈴薯の皮を薄く剥き凍結乾燥後、ポリトロンで破砕した。破砕したサンプルに Sample Buffer を加え煮沸抽出し、アセトン沈殿後、超音波破砕によりタンパク質懸濁液を得た。BCA 法によりタンパク質量を定量し、SDS-PAGE でタンパク質を分画し、銀染色法でゲルを染色した。2 mm 四方にゲルを網羅的に切り出し、還元アルキル化、トリプシンゲル内消化した。得られたペプチド断片を nanoLC-ESI-MS/MS 装置により分析した。得られた質量情報は SEQUEST を用いて NCBI nr.fast のデータベースの内、solanum をキーワードとしてデータベース化したタンパク質アミノ酸配列情報に対して解析した。品種、熟期、既知の病害抵抗性に対する量的特異性を指標にタンパク質の検索を行った。その結果、いくつかの相関性が認められるタンパク質を確認した。

Solanum tuberosum, proteome, disease resistance

講演番号：3D23a04
講演日時、会場：3 月 28 日 09:33～ D 校舎 23 会場

オオイタドリのジャスモン酸メチル誘導的なフェニルアセトニトリル生合成に関わるシトクロム P450 について

Identification of methyl jasmonate induced phenylacetonitrile biosynthesizing cytochrome P450 in the giant knotweed

○山口 拓也[1,2]、三木 佑太[1,2]、野下 浩二[3]、浅野 泰久[1,2]([1]富山県大工・生工研セ、[2]JST, ERATO、[3]秋田県大・生資科)
○Takuya YAMAGUCHI[1,2], Yuta Miki[1,2], Koji Noge[3], Yasuhisa Asano[1,2] ([1]Toyama Pref. Univ., [2]JST, ERATO, [3]Akita Pref. Univ)

植物は昆虫食害に対する防御機構の 1 つとしてテルペン類などの揮発成分を誘導的に生成、放出する。オオイタドリ（*Fallopia sachalinensis*）はマメコガネ（*Popillia japonica*）の食害によって、揮発成分としてテルペン類のみならず、フェニルアセトニトリル（PAN）を生成する（1)。 PAN の生成は昆虫食害だけでなくジャスモン酸メチル（MeJA）処理によっても誘導され、フェニルアラニンから生合成されることが明らかにされている（2)。 オオイタドリの PAN 生合成経路はウメ（*Prunus mume*）のマンデロニトリル生合成経路（3）と類似していることから、ウメと同様にシトクロム P450 がその生合成に関わっていると考えられる。しかし、オオイタドリの PAN 生合成に関わるシトクロム P450 は明らかにされていない。そこで本研究では、MeJA 処理によって発現が誘導されるシトクロム P450 を選抜し、続いて PAN 生合成に関わるシトクロム P450 を同定した。

次世代シークエンサーを用いた発現差異解析を行った。その結果、無処理区と比較して MeJA 処理区では 350 の遺伝子において発現量の変化が認められ、154 の遺伝子の発現量の上昇が認められた。これらのうち、発現量の上昇が認められたシトクロム P450 をコードする遺伝子は 4 種であった。そこで、これら 4 種のシトクロム P450 をコードする cDNA を 5’-および 3’-RACE を行った後にクローニングした。次に、PAN 生合成に関与するシトクロム P450 を明らかにするため、オオイタドリ由来シトクロム P450 とオオイタドリ由来シトクロム P450 レダクターゼの共発現系を大腸菌において構築し、形質転換体によるフェニルアラニンおよびフェニルアセトアルドキシムの代謝能について検討した。その結果、1 種のシトクロム P450 がフェニルアセトアルドキシムを PAN に変換することが明らかとなった。本発表ではこの PAN 生合成酵素の諸性質についても併せて報告する。

(1) K. Noge, M. Abe, S. Tamogami S, *Molecules*, **16**, 6481-6488 (2011).
(2) K. Noge, S. Tamogami, *FEBS Lett.*, **587**, 1811-1817 (2013).
(3) T. Yamaguchi, K. Yamamoto, Y. Asano, *Plant Mol. Biol.*, **86**, 215-223 (2014).

Methyl jasmonate, Cytochrome P450, Phenylacetonitrile

講演番号：3D23a05
講演日時、会場：3 月 28 日 09:44～ D 校舎 23 会場

植物タンパク質機能に対するニトロ化修飾の影響

Effect of nitration on plant protein function

○花井 悠介、植木 達也、橋床 泰之、崎浜 靖子（北大院農）
○Yusuke HANAI, Tatsuya UEKI, Yasuyuki HASHIDOKO, Yasuko SAKIHAMA (Graduate School of Agriculture, Hokkaido University)

【目的】活性窒素は活性酸素と同様に反応性の高い分子であり、ストレス負荷により細胞内で過剰に生成され、細胞構成成分を酸化またはニトロ化することにより障害を引き起こすことが知られている。近年、植物においても、低・高温、塩、病原菌感染などのストレス負荷に伴うニトロ化タンパク質の増加が報告されており、これが環境ストレス応答に深く関与することが示唆されている。しかし、タンパク質のニトロ化機構に関する知見は非常に限られており、特定タンパク質のニトロ化に伴う機能性変化については不明な点が多い。我々は非ストレス条件下で栽培したヒユ科植物のホウレンソウおよびアカビート芽生えからニトロ化タンパク質を検出し、その一つとしてメチオニンシンターゼ（MS）と推察されるタンパク質を見出している。Lozano-Juste らも、シロイヌナズナから非ストレス下で検出されるニトロ化タンパク質の一つとして MS を同定しており、大腸菌で発現させた組換え MS と活性窒素発生試薬を用いてそのニトロ化部位を報告したが(1)、ニトロ化と MS 酵素活性の関係については明らかにしていない。本研究では、ニトロ化修飾が MS の機能にどのような影響を与えるのかについて、アカビート MS（BvMS）とシロイヌナズナ MS（AtMS）の組換えタンパク質を用いて検討した。

【方法及び結果】クローニングした BvMS cDNA および理研バイオリソースセンターから購入した AtMS cDNA（pda01030）を大腸菌に組み込み、大量発現させた。Ni-カラム精製した組換え酵素の活性を CH_3-H_4PteGlu を基質とした比色法で測定した結果、BvMS と AtMS はそれぞれ 0.31、0.30 nkat/mg protein と、ほぼ同等の活性値を示した。しかし、BvMS、AtMS をそれぞれ同一条件下、活性窒素の一種であるペルオキシナイトライト($ONOO^-$)でニトロ化したところ、両者のニトロ化度合（MS 分子あたりニトロ化チロシン残基数）とそれに伴う活性低下に差違が見られた。これらの MS アミノ酸配列を比較したところ、BvMS は AtMS に比べチロシン残基が 1 つ多く、またその N 末端と C 末端にそれぞれ 9 および数 10 残基分長いアミノ酸配列を有していた。$ONOO^-$に対する反応性の違いは、この一次構造の違いに起因すると推察された。現在、亜硝酸ナトリウムストレス処理したアカビート芽生えから検出されるニトロ化タンパク質の同定を進めている。

（1）Jorge Lozano-Juste *et al.*, *Journal of Experimental Botany* 62, 3501-3517（2011）

nitrosative stress, reactive nitrogen species, methionine synthase

講演番号：3D23a06
講演日時、会場：3 月 28 日 10:05～ D 校舎 23 会場

イネにおける UV 照射によるファイトアレキシン生産誘導機構へのジャスモン酸の関与
Involvement of jasmonate in UV-induced phytoalexin production in rice

○宮本 皓司[1]、遠田 勇海[1]、岡田 利樹[1]、佐藤 由実子[1]、渡辺 航平[1]、酒澤 智子[1]、湯本 絵美[1]、柴田 恭美[1]、朝比奈 雅志[1]、横田 孝雄[1]、飯野 盛利[2]、岡田 憲典[3]、山根 久和[1] ([1]帝京大バイオ、[2]大阪市大院理、[3]東大生物工学セ)
○Koji MIYAMOTO[1], Isami ENDA[1], Toshiki OKADA[1], Yumiko SATO[1], Kohei WATANABE[1], Tomoko SAKAZAWA[1], Emi YUMOTO[1], Kyomi SHIBATA[1], Masashi ASAHINA[1], Takao YOKOTA[1], Moritoshi IINO[2], Kazunori OKADA[3], Hisakazu YAMANE[1] ([1]Teikyo Univ., [2]Osaka City Univ., [3]The Univ. of Tokyo)

植物は病原菌の感染を認識すると、ファイトアレキシンの生産を含む様々な抵抗性反応を示す。イネにおいて、これらの病害抵抗性反応は塩化銅などの重金属への暴露や紫外線(UV)の照射といった非生物的なストレスによっても引き起こされる。イネにおけるファイトアレキシンはこれまでにジテルペン型のモミラクトン類とファイトカサン類、フラボノイド型のサクラネチンが主要成分として同定されている。我々はこれまでにジャスモン酸(JA)生合成変異株 *cpm2* およびジャスモノイルイソロイシン(JA-Ile)生合成変異株 *osjar1* を用いた実験から、いもち病菌接種時および塩化銅処理時において、フラボノイド型ファイトアレキシンの生産は JA 依存的なシグナル伝達経路で制御される一方で、ジテルペン型ファイトアレキシンの生産は JA 依存的および JA 非依存的なシグナル伝達経路の両方で制御されることを明らかにしてきた(Riemann et al., 2013; Shimizu et al., 2013)。しかし、UV 照射によるファイトアレキシン生産の誘導に関与するシグナル伝達経路はほとんど未解明の状態であった。そこで、本研究においては UV 誘導的なファイトアレキシン生産の誘導に JA 類が関与しているかを検討することにした。

まず、イネにおいて UV 照射により JA 類の蓄積が誘導されるかを検討した。イネ野生型株(WT)の葉身に対して UV-C を照射した後、経時的にサンプリングを行い、JA および JA-Ile の内生量を定量した。その結果、JA および JA-Ile の内生量は照射後 1-3 時間を極大とする一過的な増加を示すことが明らかになった。次に WT および *cpm2* の葉身に対して UV-C を照射し、72 時間後のファイトアレキシンの蓄積量を解析した。その結果、モミラクトン類およびファイトカサン類については *cpm2* において野生型株と同等以上の蓄積が見られたのに対し、サクラネチンについては *cpm2* においてほとんど蓄積が認められなかった。これらのことから、UV 誘導的なファイトアレキシン生産についても、フラボノイド型ファイトアレキシンの生産は JA 依存的なシグナル伝達経路のみで制御され、ジテルペン型ファイトアレキシンの生産は JA 依存的および JA 非依存的なシグナル伝達経路の両方で制御されることが明らかになった。現在は、JA-Ile 生合成変異株 *osjar1* を用いた実験を行っており、これについても報告する予定である。

Riemann M et al. Plant Journal 74: 226-38 (2013)
Shimizu T et al. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry 77: 1556-64 (2013)

UV stress, Phytoalexin, Jasmonic acid

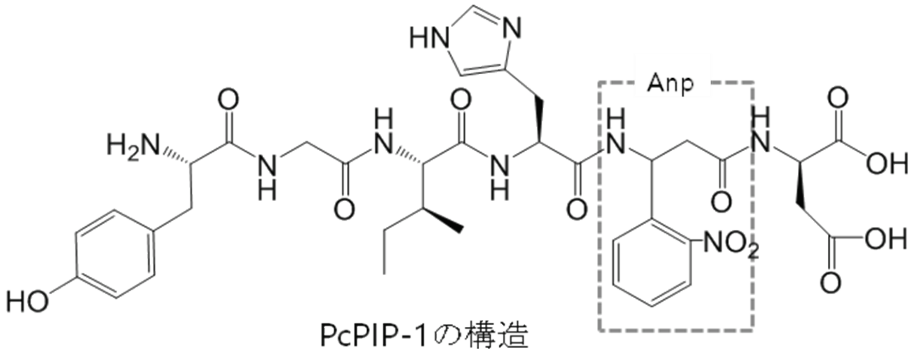
講演番号：3D23a07
講演日時、会場：3 月 28 日 10:16～ D 校舎 23 会場

UV 照射によって不活性化できる PIP-1 類縁体の合成とその防御応答誘導活性の評価

Synthesis of the photocleavable PIP-1 analog and evaluation of its effect on activation of plant immune responses

○金 容賢、宮下 正弘、宮川 恒（京都大院農）
○Yonghyun Kim, Masahiro Miyashita, Hisashi Miyagawa (Kyoto Univ.)

【目的】 PIP-1 （YGIHTH-NH_2）はランダムライブラリより見出されたペプチドエリシターであり、タバコ細胞に様々な防御応答を誘導する。昨年度大会において、PIP-1 によるファイトアレキシン生成の誘導には長時間の刺激が必要であることを報告した。この実験においては、PIP-1 による刺激時間を調節するために、一定時間後に細胞を洗浄して PIP-1 を除去する方法を用いた。しかし、この方法では細胞に物理的な刺激を与える可能性や、その時点までに分泌された二次代謝物も同時に除去されるという問題があった。そこで本研究では、PIP-1 による刺激時間を化学的に制御することを目的として、UV 照射によって不活性化できる PIP-1 類縁体を合成し、その刺激時間とファイトアレキシンの生成との関係についてより厳密に調べた。
【方法】 PIP-1 類縁体は Fmoc 固相法により合成した。エリシター活性の測定にはタバコ懸濁細胞を用い、過酸化水素の発生およびファイトアレキシンとしてカプシジオールの生成を指標にして評価した。
【結果】 PIP-1 の C 末端 His 残基を Asp に置換した類縁体（YGIHTD-OH、[Asp^6]PIP-1）は、タバコ細胞存在下で安定であることが明らかとなったため、この配列中の Thr 残基を UV 照射によって分解するアミノ酸（Anp）に置換した。得られた類縁体（YGIH[Anp]D-OH、PcPIP-1）は、タバコ細胞による分解は受けず、エリシター活性も保持していた。PcPIP-1 は 5 分間の UV 照射により速やかに分解して消失し、反応後は過酸化水素の発生や、カプシジオールの生成をほとんど誘導しなかったことから、生じた分解物はエリシター活性を示さないことが分かった。続いて、刺激時間とカプシジオール生成の関係を調べるため、PcPIP-1 を細胞に処理してから 1 時間後に UV 照射して不活性化したところ、カプシジオールの生成は見られなかった。一方、PcPIP-1 を処理してから 6 時間あるいは 9 時間後に UV 照射して不活性化したところ、UV 照射しない場合と同程度のカプシジオールの生成が見られた。細胞洗浄によるエリシター除去では、検出されるカプシジオールの量がかなり低いことから、PcPIP-1 を用いた方法は、細胞に物理的なストレスを与えずかつ速やかにエリシター活性を調節できることが分かった。



PcPIP-1の構造

Peptide elicitor, Phytoalexin, UV-cleavable amino acid

講演番号：3D23a08
講演日時、会場：3 月 28 日 10:27～ D 校舎 23 会場

イネにおいてヌクレオチドピロホスファターゼ/ホスホジエステラーゼの欠損がデンプンの蓄積と光合成に影響する

Mutation of Nucleotide Pyrophosphatase/Phosphodiesterase 1 Stimulates Accumulation of Starch and Photosynthesis in Rice

○増井 貴広[1]、猪俣 拓也[1]、涌井 翔太郎[2]、金古 堅太郎[2]、三ツ井 敏明[1,2] ([1]新潟大院・自然科学、[2]新潟大・農)
○Takahiro Masui[1], Takuya Inomata[1], Syoutaro Wakui[2], Kentaro Kaneko[2], Toshiaki Mitsui[1,2] ([1]Grad. Sch. Sci & Tech. Niigata Univ., [2]Dept. Applied Biol. Chem. Niigata Univ.)

ヌクレオチドピロホスファターゼ/ホスホジエステラーゼ（NPP）はヌクレオチド加水分解酵素に属する新規の酵素ファミリーである。我々はイネにおいて 6 つの NPP 遺伝子を同定し、そのうち NPP1 が小胞輸送を介してプラスチドに局在し、ADP-グルコースや ADP-リボース、UDP-グルコース、ATP などのヌクレオチドや糖ヌクレオチドに対して分解活性を持つことを明らかにした。我々はレトロトランスポゾンである *Tos17* による *NPP1* 遺伝子欠損変異体（*npp1*）を作成し、*npp1* において WT と比べ ADP-グルコースピロホスファターゼ活性が約 20%まで減少していることを確認した。現在我々は *NPP1* のイネにおける生理的役割の解明に向けて研究を進めている。

我々は WT と *npp1* をさまざまな温度と CO_2 濃度の環境下で一週間育成し解析を行った。その結果、高温、高 CO_2 条件において *npp1* では WT よりも FW がわすがに上昇し、デンプン含量においては高 CO_2 条件において有意に上昇していた。特に CO_2 濃度 1600ppm および 33℃/28℃（14/10h Light/Dark）においてデンプン含量の増加が顕著であった。そこで、iTRAQ を用いた定量的プロテオーム解析を行った結果、*npp1* の幼苗において高温および高 CO_2 ストレスにより糖代謝と光合成に関わるタンパク質の発現量が増えていることが判明した。また *npp1* の成熟葉において光合成を測定した結果、A-Ci カーブ（光合成速度：A、葉内 CO_2 濃度：Ci）が有意に上昇していることが判明した。このことから NPP1 がデンプン蓄積と光合成に関わっていることが示された。

rice, starch, photosynthesis

講演番号：3D23a09
講演日時、会場：3 月 28 日 10:38～ D 校舎 23 会場

強光応答遺伝子の発現に及ぼす 12-オキソフィトジエン酸の影響

Effect of 12-oxo-phytodienoic acid on the expression of high light-responsive genes

○薮田 行哲[1]、野口 淳[1]、佐々木 悠[1]、石川 孝博[2]、重岡 成[3]、渡辺 文雄[1]（[1]鳥取大農、[2]島根大生資、[3]近畿大農）
○ Yukinori YABUTA[1], Atsushi NOGUCHI[1], Yu SASAKI[1], Takahiro ISHIKAWA[2], Shigeru SHIGEOKA[3], Fumio WATANABE[1] ([1]Tottori Univ., [2]Shimane Univ., [3]Kinki Univ.)

【目的】強光ストレスは、光合成電子伝達系(PET)の過還元に伴う活性酸素種(ROS)生成の上昇を引き起こし、植物に酸化的傷害をもたらす。それに対し植物は、種々の防御遺伝子を誘導しこれに応答している。これまでに我々は、シロイヌナズナの熱ショック転写因子(Hsf)A2 は強光に迅速に応答し、種々の熱ショックタンパク質(Hsp)やアスコルビン酸ペルオキシダーゼ(Apx)2 の発現を誘導する重要な転写因子であること、その発現は HsfA1d/A1e により制御されていることを報告している。また、Hsp90 およびプロテアソーム阻害剤処理や H_2O_2 処理により HsfA2 の発現が誘導されたことから、通常条件下では Hsp90 と結合している HsfA1/A1e は不活化にあるが、ストレス下では ROS の酸化的障害により蓄積した変性タンパク質をリフォールディングするために Hsp90 が解離し、フリーとなった HsfA1/A1e が核へと移行することで、標的遺伝子の発現を誘導しているのではないかと考えた。その一方で、PET 阻害剤である DBMIB 処理は H_2O_2 の生成を伴わずに PET のレドックスの変化を引き起こし、HsfA1d を介した Apx2、HsfA2 および Hsps の発現を誘導することが報告された。このように強光応答の初期段階では PET のレドックスがこれらの遺伝子発現を制御している事が考えられたが、HsfA1d がどのような分子機構により活性化を受けるか明らかでは無い。最近、葉緑体内のリノレン酸から合成される 12-オキソフィトジエン酸(OPDA)は Apx2、HsfA2 および Hsps の発現を誘導する事が報告されている。そこで HsfA1d を介したこれらの遺伝子の強光応答に対する OPDA の関与について解析を行った。

【方法・結果】25℃、明暗 8/16 時間、100 μmol photons/m^2/s の光照射下で 2 週間栽培したシロイヌナズナ野生株（WT）に 20 μM OPDA を 1 時間処理し、種々の遺伝子の発現を qPCR により解析した。また、強光応答における OPDA の関与について解析するため、リノレン酸を含むトリエン脂肪酸の合成能を欠く *fad3-2fad7-1fad8-1* 三重変異株（*fad3/7/8*）および WT に 700 μmol photons/m^2/s の強光を 1 時間照射し、同様に qPCR により測定した。OPDA 処理により *HsfA2*, *Apx2*, *Hsps* の発現レベルは上昇することを確認した。また、強光による *HsfA2*, *Apx2*, *Hsps* の発現レベルの誘導は *fad3/7/8* においても認められた。しかしながら、WT と比較して差は認められ無かった。

Arabidopsis, heat shock transcription factor, environmental stress

講演番号：3D23a10
講演日時、会場：3 月 28 日 10:49～ D 校舎 23 会場

RNA-seq による被覆栽培したチャの被覆解除時のストレス応答の解析
Stress response of shade-grown tea leaves after removal of shading to direct sunlight revealed by RNA-seq analysis
○森田 重人[1,2]、北島 佐紀人[3]、竹本 哲行[4]、三村 裕[4]、佐野 智[1] ([1]京都府大院生命環境、[2]京都農技セ生資セ、[3]京都工繊大応用生物、[4]京都農技セ農林セ茶研)
○Shigeto MORITA[1,2], Sakihito KITAJIMA[3], Tetsuyuki TAKEMOTO[4], Yutaka MIMURA[4], Satoshi SANO[1] ([1]Kyoto Pref. Univ., [2]Biotech. Res. Dept., Kyoto Pref. Agr. Forest. Fish. Technol. Center, [3]Kyoto Inst. Technol., [4]Tea Indus. Res. Div., Agr. Forest. Technol. Dept., Kyoto Pref. Agr. Forest. Fish. Technol. Center)

【目的】玉露や抹茶などの高級茶の生産においては、新芽の生育中に茶樹を 20 日間以上遮光して栽培する被覆栽培という手法が用いられている。これにより茶葉の色が濃くなり、香りやうまみの成分が増加し、高品質な茶葉が得られる。近年の茶の価格低下や加工用抹茶の需要拡大に伴い、被覆茶をより多く収穫するために、従来は一番茶（4 月～5 月に栽培・収穫される茶）でのみ行われていた被覆栽培が、二番茶（一番茶の収穫後、6 月～8 月に栽培・収穫される茶）にも適用されている。しかし、このような長期間の被覆栽培を複数年にわたって行うことで、チャがストレスを受け、樹勢が低下するという報告がある。我々は、被覆栽培によってチャが受けているストレスとその影響を明らかにすることを目的として、圃場における被覆解除時のチャのストレス応答を解析している。これまでに我々は、クロロフィル蛍光、カルボニル化タンパク質量を測定した結果、チャは被覆解除直後に一過的にストレスによるダメージを受けるが、3～7 日間で回復することを明らかにした。本研究では、以上の先行研究に引き続き、チャの被覆解除時におけるストレス応答の詳細を理解するために、RNA-seq による網羅的な遺伝子発現解析を行った。

【方法と結果】一番茶の時期に 30 日間、さらに二番茶の時期に 20 日間被覆栽培を行った茶樹について、二番茶の被覆解除後 1 日目の新芽（展開直後の第 1 葉または第 2 葉）を採取しサンプルとした。対照として一番茶、二番茶とも被覆をかけずに栽培した茶樹の新芽を同日に採取した。各サンプルより RNA を調製し、Illumina HiSeq 2000 を用いてペアエンドシークエンスを行った。各サンプルから得られた 43M～54M リードを、既知のチャの全長 cDNA 433 本、部分長 cDNA 105 本、および NCBI に登録されている Roche 454 によるチャ RNA-seq データ（SRR496624.sra）と合わせてアセンブルを行い、49,800 個のコンティグを得た。RPKM 値により発現量の比較を行った結果、対照に比べ被覆栽培したチャで発現量が 10 倍以上であった遺伝子は 423 個、また被覆栽培したチャで発現量が 1/10 以下であった遺伝子は 14 個であった。この結果から、被覆栽培時の遮光条件から被覆解除後の強光条件への適応に、多数の遺伝子の誘導が関与していることが示唆された。

tea, shade culture, stress response

講演番号：3D23a11
講演日時、会場：3 月 28 日 11:10～ D 校舎 23 会場

一過的発現系を用いたシロイヌナズナ NADH 加水分解酵素（AtNUDX6 および 7）の生物的／非生物的ストレス応答制御機構の解析

Effect of transient expression of NADH pyrophosphohydrolases (AtNUDX6 and 7) on the regulatory mechanism of biotic and abiotic stress responses in *Arabidopsis*.

○高田 梨沙[1]、小川 貴央[2]、村本 亘平[3]、吉村 和也[3]、重岡 成[1,2]（[1]近畿大院・農・バイオ、[2]近畿大・農・バイオ、[3]中部大院・応生）
○RISA TAKADA[1], TAKAHISA OGAWA[2], KOHEI MURAMOTO[3], KAZUYA YOSHIMURA[3], SHIGERU SHIGEOKA[1,2] ([1]Dept. Adv. Biosci., Grad. Sch. Agr., Kinki Univ., [2]Dept. Adv. Biosci., Fac. Agr., Kinki Univ., [3]Biosci. Biotech. Grad. Sch. Chubu Univ.)

NAD(P)H などのピリジンヌクレオチドは、様々な代謝経路におけるレドックスキャリアーとしてだけではなく、ROS を介した細胞内シグナル伝達やタンパク質修飾に関与しているため、細胞内において厳密な濃度調節が必要である。我々はこれまでに、28 種類存在するシロイヌナズナ Nudix hydrolase の中で、NADH に対して加水分解活性を有する AtNUDX6 および 7 が、それぞれ NONEXPRESSOR OF PATHOGENESIS RELATED GENES1（NPR1）依存的生物的ストレス応答およびポリ ADP リボシル化（PAR）反応を介した非生物的ストレス応答の制御に機能することを示してきた（*Plant Physiol.* 2009; 2010）。しかしながら、このような 2 つの異なる細胞応答を両酵素がどのように制御しているのか、細胞内 NADH 量の変化がそれらに直接あるいは間接的に関与しているのかは不明なままである。そこで本研究では、エストロゲン（ES）誘導型一過的発現系を用いて、AtNUDX6 および 7 タンパク質の発現レベルおよび細胞内 NADH 量の一過的な変化が、生物的／非生物的ストレス応答に及ぼす影響について解析を試みた。

まず、AtNUDX6 および 7 の加水分解活性に必須であるアミノ酸残基を置換した変異体組換えタンパク質（E154Q）を作製し、NADH 加水分解活性が消失していることを確認した。そこで、AtNUDX6、7（IE-NUDX6, 7）およびそれらの不活性型（IE-NUDX6 E154Q, 7 E154Q）の ES 誘導型一過的発現系をシロイヌナズナの両酵素の遺伝子破壊株（KO-*nudx6* および *7*）に形質転換した。これらの形質転換株に ES 処理した結果、KO-*nudx6*/IE-NUDX6 および KO-*nudx7*/IE-NUDX7 株において経時的な NADH 量の低下、およびそれに伴う PAR 活性の増加が認められた。一方で、KO-*nudx6*/IE-NUDX6 E154Q 株および KO-*nudx7*/IE-NDUX7 E154Q 株においては、ES 処理後の NADH 量および PAR 活性に大きな変化は認められなかった。したがって、PAR 反応の制御には細胞内 NADH 量の調節が重要であることが示唆された。また、ES 処理後の NPR1 下流のサリチル酸（SA）応答性遺伝子（*PR1, TRX-h5*）の発現量は、KO-*nudx6*/IE-NUDX6 株で増加、KO-*nudx7*/IE-NUDX7 株で減少する傾向が認められた。さらに、これらの遺伝子の発現量の変化は、KO-*nudx6*/IE-NUDX6 E154Q 株および KO-*nudx7*/IE-NDUX7 E154Q 株においても同様に認められた。以上の結果から、NPR1 依存的な生物的ストレス応答の制御には、細胞内 NADH 量ではなく AtNUDX6 および 7 自身の存在、もしくは他の因子との相互作用が重要であることが示唆された。

Nudix hydrolase, NADH, biotic/abiotic stress responses

講演番号：3D23a12
講演日時、会場：3 月 28 日 11:21～ D 校舎 23 会場

Nudix hydrolase（AtNUDX6 および 7）による細胞内 NADH ステータス調節を介したストレス応答制御

Regulation of stress responses via control of the intracellular NADH status by Nudix hydrolases, AtNUDX6 and 7

○村本 亘平[1]、高田 梨沙[2]、小川 貴央[2]、重岡 成[2]、吉村 和也[1]([1]中部大院・応生、[2]近畿大院・農・バイオ)
○Kohei MURAMOTO[1], Risa TAKADA[2], Takahisa OGAWA[2], Shigeru SHIGEOKA[2], Kazuya YOSHIMURA[1] ([1]Biosci. Biotech. Grad. Sch. Chubu Univ., [2]Dept. Adv. Biosci., Grad. Sch. Agr., Kinki Univ.Dept.)

生物の主要なレドックスキャリアーである NADH のレベルやレドックス状態(NADH/NAD^+)の変化、すなわち NADH ステータスの変化は、多様な代謝反応に影響するだけでなく、シグナルとして重要な役割を果たしていると考えられる。シロイヌナズナにおいて NADH に対して加水分解活性を有する Nudix hydrolase（AtNUDX6 および 7）は、それぞれ NPR1 依存的 SA シグナリング経路および PAR 反応の制御を介して、生物的・非生物的ストレス応答に機能している（*Plant Physiol.* 2009; 2010)。しかし、それらストレス応答と両酵素による NADH ステータス制御との関係は不明であった。これまでに、AtNUDX6 および 7 による細胞内 NADH ステータス制御の直接的な役割を明らかにするために、NADH レベルが野生株と比較して増加している両酵素の遺伝子破壊株を用いたトランスクリプトーム解析を行い、細胞内 NADH レベルと正もしくは負に相関して発現量が変化する遺伝子(NADH-responsive gene: NRG^+および NRG^-）をそれぞれ 196 個および 100 個同定した。そこで本研究では、それら NRG の発現制御機構や生理的意義について解析した。

NRG の発現変化は、NAD の前駆体であるキノリン酸処理により細胞内 NADH レベルを 1.6～2.2 倍に増加させた際にも確認された。データベース解析の結果、NRG は既報のグルタチオンおよびペルオキシソーム由来 H_2O_2 に応答性を示す遺伝子群と重複していなかったが、葉緑体由来 H_2O_2 応答性遺伝子とは約 12%、一重項酸素、オゾンおよびアスコルビン酸（AsA）応答性遺伝子とは約 27～32%の重複が認められた。また、それらすべてに重複していた遺伝子は 6 個存在した(Redox responsive-gene: RRG)。そこで、NRG と既報のレドックス応答性遺伝子との重複を検証するために、L-ガラクトース処理により細胞内 AsA レベルを 1.8 倍に増加させた際の NRG の発現変化を定量的 RT-PCR により解析した。その結果、ほぼすべての RRG の発現は抑制されたが、NRG^+の発現にはほとんど変化が認められなかった。次に、パラコート処理による酸化ストレス下での NRG の発現解析を行った。その結果、正常条件下と比較して約 2.5 倍の細胞内 NADH レベルの増加に伴い、多数の NRG^+の発現が誘導された。これらのことから、NADH ステータス変化は他のレドックスシグナルとは異なる経路を構成し、ストレス応答に関与していると考えられた。

興味深いことに、キノリン酸処理による細胞内 NADH レベルの増加により、AtNUDX6 および 7 の発現がそれぞれ抑制および誘導された。このことから、AtNUDX7 が細胞内 NADH ステータス制御の主要な制御因子であると考えられた。

Nudix hydrolase, NADH, stress response

講演番号：3D23a13
講演日時、会場：3 月 28 日 11:32～ D 校舎 23 会場

シロイヌナズナ Nudix hydrolase（AtNUDX9）による GDP-D-Man 代謝制御の役割

Role of GDP-D-Man metabolic regulation by the Arabidopsis Nudix hydrolase (AtNUDX9)

○田中 裕之[1]、丸田 隆典[2]、小川 貴央[3]、田部 記章[3]、田茂井 政宏[1,3]、吉村 和也[4]、重岡 成[1,3] ([1]近畿大院・農・バイオ、[2]島根大・生資科・生命工、[3]近畿大・農・バイオ、[4]中部大・応生・食栄)
○hiroyuki tanaka[1], takanori maruta[2], takahisa ogawa[3], noriaki tanabe[3], masahiro tamoi[1,3], kazuya yoshimura[4], shigeru shigeoka[1,3] ([1]Dept. Adv. Biosci., Grad. Sch. Agr., Kinki Univ., [2]Dept. Life Sci. Biotechnol., Fac. Life Environ. Sci., Shimane Univ., [3]Dept. Adv. Biosci., Fac. Agr., Kinki Univ., [4]Dept. Food Nutr. Sci., Coll. Biosci. Biotech., Chubu Univ.)

植物において、GDP-D-mannose（GDP-D-Man）はアスコルビン酸（AsA：ビタミン C）や細胞壁多糖の前駆体であるほか、N-グリコシル化や GPI-アンカーなどタンパク質の翻訳後修飾においても必須の糖ドナーであるため、その細胞内レベルは適切に制御される必要がある。これまでに我々は、多様なヌクレオシド-2 リン酸類縁体に対して加水分解活性を有するシロイヌナズナの Nudix hydrolase（AtNUDX）ファミリーは酸化ヌクレオチド、ADP-ribose、NAD(P)H、および FAD の代謝制御を介して様々な代謝や細胞応答に関与することを明らかにしてきた。さらに最近、AtNUDX の中で細胞質局在型 AtNUDX9 は GDP-D-Man に特異的な加水分解活性（GDP-D-Man + H_2O → GMP + mannose 1-phosphate）を有することを見出した。そこで本研究では、AtNUDX9 の GDP-D-Man 代謝への関与について生理学的解析を試みた。

組織特異的発現解析の結果、AtNUDX9 の mRNA およびタンパク質の発現レベルと相関して、根において高い総 GDP-D-Man 加水分解活性が検出された。また、AtNUDX9 遺伝子破壊株（KO-*nudx9*）の GDP-D-Man 加水分解活性は野生株の約 25%に減少していたことから、AtNUDX9 は同活性の大部分を占めていると考えられた。これまでに、GDP-D-Man 合成反応を触媒する GDP-D-Man pyrophosphorylase（VTC1）の機能解析を通して、細胞内 GDP-D-Man レベルは植物のアンモニア（NH_4^+）感受性に影響することが示されている。そこで、NH_4^+を含む（+NH_4^+）もしくは含まない（-NH_4^+）培地で栽培し、AtNUDX9 の NH_4^+応答性を解析した。その結果、野生株における AtNUDX9 の発現に両培地間で変化は認められなかったが、根における総 GDP-D-Man 加水分解活性は-NH_4^+培地と比較して+NH_4^+培地で顕著に増加していた。一方、KO-*nudx9* 株における同活性に変化は認められなかった。このことから、NH_4^+に応答した翻訳後の AtNUDX9 の活性化が示唆された。またこれまでに、VTC1 機能抑制型変異体(*vtc1*)は、+NH_4^+培地において根の伸長阻害および N-結合型糖タンパク質レベルの減少を示すことが報告されていた。そこで、+NH_4^+培地で栽培した KO-*nudx9* 株の根を野生株と比較したところ、根の伸長が促進していた。さらに、両培地で栽培した KO-*nudx9* 株における AsA レベルは野生株と変化が認められなかったが、+NH_4^+培地で栽培した KO-*nudx9* 株の根において N-結合型糖タンパク質レベルの増加が認められた。以上の結果から、根において AtNUDX9 は VTC1 と共役した細胞内 GDP-D-Man レベルの制御を介して、NH_4^+感受性に影響するタンパク質の N-グリコシル化の調節に関与していると考えられた。

Nudix hydrolase, GDP-D-mannose, ammonium response

講演番号：3D23a14
講演日時、会場：3 月 28 日 11:43～ D 校舎 23 会場

葉緑体 H_2O_2 応答性転写因子群による鉄ホメオスタシスと酸化的ストレス応答のクロストーク
Crosstalk between iron homeostasis and oxidative stress response via chloroplastic H_2O_2-responsive transcription factors

○野志 昌弘[1]、岡本 泰[2]、森 大輔[1]、田茂井 政宏[1,2]、高木 優[3,4]、丸田 隆典[5]、重岡 成[1,2]（[1]近畿大・農・バイオ、[2]近畿大院・農・バイオ、[3]産総研・生物プロセス、[4]埼玉大・環境科学、[5]島根大・生資科・生命工）
○ Masahiro NOSHI[1], Yutaka OKAMOTO[2], Daisuke MORI[1], Masahiro TAMOI[1,2], Masaru TAKAGI[3,4], Takanori MARUTA[5], Shigeru SHIGEOKA[1,2] ([1]Dept. Adv. Biosci., Fac. Agr., Kinki Univ., [2]Dept. Adv. Biosci., Grad. Sch. Agr., Kinki Univ., [3]AIST, [4]IEST, Saitama Univ., [5]Dept. Appl. Biosci. and Biotech., Fac. Life and Environ. Sci., Shimane Univ.)

活性酸素種（ROS）は植物のストレス応答に不可欠なシグナルである。最近、我々は葉緑体由来の H_2O_2 に応答する遺伝子群を同定し、葉緑体特異的な H_2O_2 シグナリングの存在を提唱した。さらに、同定した遺伝子群の包括的な逆遺伝学的解析から、シグナリング経路の分子機構や生理機能が見えてきた。そこで今回は、葉緑体 H_2O_2 応答性転写因子の優勢抑制株ラインから、パラコート処理による酸化的ストレスに対して顕著なクロロシスを示す *mvs9* および *mvs11* 変異株を単離し、それらの原因遺伝子の機能解析を行ったので報告する。

MVS9 および *MVS11* の発現は葉緑体 H_2O_2 によってそれぞれ低下および上昇した。MVS9 は鉄欠乏応答との関連が報告されており、実際に *mvs9* は鉄欠乏培地上でクロロシスを示した。一方、培地中の鉄濃度を上げても長期的なパラコートおよび強光処理に対する *mvs9* の感受性は回復しなかった。また、*mvs9* の鉄含量はクロロシスが生じた条件でのみコントロール株よりも低下することが分かった。さらに、*mvs9* では短期的な強い酸化的ストレス処理下でも細胞死の増大が見られたが、このときの鉄含量にはコントロール株との差は見られなかった。したがって、MVS9 は鉄の恒常性よりも酸化的ストレス耐性に優先的に関与しており、鉄含量の低下はクロロシスの結果として生じることが示された。一方、*mvs11* の酸化的ストレス感受性は培地中の鉄濃度の増加とともに顕著に回復した。鉄欠乏条件における *mvs11* では鉄含量が著しく低下しており、鉄還元酵素活性および鉄トランスポーター発現の誘導が抑制されていた。以上より、葉緑体 H_2O_2 は MVS9 および MVS11 の発現制御を介して、鉄ホメオスタシスと酸化的ストレス応答のクロストークに関与することが分かってきた。MVS9 の下流および葉緑体 H_2O_2 応答性遺伝子群には病原菌応答性を有するものが多く含まれており、現在、両転写因子のサリチル酸やエリシター応答への関与について調べている。

Reactive oxygen species, Oxidative signaling, Stress response

講演番号：3D23a15
講演日時、会場：3 月 28 日 11:54～ D 校舎 23 会場

シロイヌナズナにおけるデヒドロアスコルビン酸還元酵素の包括的な機能解析

Comprehensive functional analysis of dehydroascorbate reductases in *Arabidopsis*

○畑中 理佐[1]、野志 昌弘[2]、田部 記章[2]、田茂井 政宏[2]、丸田 隆典[3]、重岡 成[1]([1]近畿大院・農・バイオ、[2]近畿大・農、[3]島根大・生資料・生命工)
○ Risa HATANAKA[1], Masahiro NOSHI[2], Noriaki TANABE[2], Masahiro TAMAI[2], Takanori MARUTA[3], Shigeru SHIGEOKA[1] ([1]Dept. Adv. Biosci., Grad. Sch. Agr., Kinki Univ., [2]Dept. Adv. Biosci., Fac. Agr., Kinki Univ., [3]Dept. Life Sci. Biotechnol., Fac. Life Environ. Sci., Shimane Univ.)

【目的】高等植物において、アスコルビン酸（AsA）は細胞内に最も豊富に存在する水溶性レドックス緩衝剤として機能しており、ストレスやホルモン応答に関与する。AsA は、特に酸化型で不安定であるため、その還元型への再生系が AsA の機能維持に不可欠である。シロイヌナズナには、5 つのモノデヒドロアスコルビン酸還元酵素および 3 つのデヒドロアスコルビン酸還元酵素（DHAR1~3）が存在しているが、各々の生理機能の多くは分かっていない。そこで本研究では、光酸化的ストレス応答における AsA 再生系の役割を理解することを目的とし、全 DHAR アイソザイムの機能を包括的かつ逆遺伝学的に解析した。
【結果】DHAR2 および 3 はそれぞれ細胞質および葉緑体に局在すると考えられている。そこで、GFP 融合タンパク質を用いて DHAR1 の細胞内局在性について調べた。その結果、シロイヌナズナ葉の細胞質および核の両方で nGFP-DHAR1 および DHAR1-cGFP の蛍光が観察された。次に、各アイソザイムの光酸化的ストレス応答を転写レベルで解析した。通常条件および強光照射下において、*DHAR1* の発現が最も高く、*DHAR2* の発現が最も低かった。各アイソザイムの欠損株を単離し、総 DHAR 活性を比較したところ、*dhar1* では野生株の 70%、*dhar3* では 40%にまで DHAR 活性が低下したが、DHAR2 の欠損は活性にほとんど影響しなかった。これは各アイソザイムの転写レベルを反映する結果であった。また、*dhar1* では強光による DHAR 活性の増大が顕著に抑制された。各アイソザイムの欠損は、強光下での AsA レベルの上昇を阻害したが、一方で AsA レドックス状態には大きく影響しなかった。各欠損株では強光下でのグルタチオンの酸化が抑制されており、それは特に *dhar1* で顕著に見られた。興味深いことに、各欠損株ではグルタチオン還元酵素活性が低下していた。さらに、*dhar1* および *dhar3* は強光に高感受性を示した。以上より、DHAR アイソザイムは AsA および GSH のレドックス制御を介して光酸化的ストレス応答に関与しており、特に DHAR1 と DHAR3 が重要な役割を持つことが分かった。現在、多重変異株の単離および解析を試みている。

ascorbate recycling enzymes

講演番号：3D23p01
講演日時、会場：3 月 28 日 14:00～ D 校舎 23 会場

ペルオキシソーム局在性モノデヒドロアスコルビン酸還元酵素アイソザイムによるシードリング発達およびストレス応答の制御

Regulation of growth and stress response via reroxisomal monodehydroascorbate reductases

○高橋 隆樹[1]、野志 昌弘[2]、畑中 理佐[2]、丸田 隆典[1]、澤 嘉弘[1]、石川 孝博[1]、重岡 成[2] ([1]島根大・生資科・生命工、[2]近畿大・農・バイオ)
○Ryuki Takahashi[1], Masahiro Noshi[2], Risa Hatanaka[2], Takanori Maruta[1], Yoshihiro Sawa[1], Takahiro Ishikawa[1], Shigeru Shigeoka[2] ([1]Dept. Appl. Biosci. and Biotech., Fac. Life and Environ. Sci., Shimane Univ., [2]Dept. Adv. Biosci., Fac. Agr., Kinki Univ.)

ペルオキシソームは脂肪酸の β 酸化や光呼吸によるグリコール酸酸化の場であるため、植物細胞内における活性酸素種（ROS）、特に H_2O_2 の主要な発生源である。そのため、植物ペルオキシソームはカタラーゼを高蓄積し、効果的に H_2O_2 を無毒化している。一方、モノデヒドロアスコルビン酸還元酵素（MDAR）を含むアスコルビン酸（AsA）代謝系酵素もまたペルオキシソームに存在することが明らかになってきたが、その生理学的意義はよく分かっていない。シロイヌナズナでは、MDAR3 および 4 がペルオキシソームの膜およびマトリックスにそれぞれ局在しており、MDAR3 は発芽直後の脂肪酸 β-酸化由来の H_2O_2 代謝に必須であると報告されている。そこで本研究では、ペルオキシソームにおける AsA 代謝の詳細な生理機能を明らかにすることを目的として、MDAR3 および 4 の欠損株（*mdar3* および *mdar4*）を用いて解析した。

2 週齢の野生株および欠損株から抽出した可溶性および不溶性画分における MDAR 活性を測定した。その結果、可溶性画分では MDAR4 が、不溶性画分では MDAR3 が主要な MADR であることが分かった。独立栄養条件において、*mdar4* の生育に野生株との違いは見られなかったが、*mdar3* はシードリング致死の表現型を示した。この致死性は、MDAR3 だけではなく、MDAR4 の過剰発現によっても相補された。ROS 検出用蛍光試薬 H_2DCFDA を用いて、1 および 2 日齢のシードリングにおける ROS の蓄積を観察したところ、野生株と各 MDAR 欠損株との間に顕著な違いは認められなかった。一方、カタラーゼの欠損（*cat2*）は同条件下での ROS 蓄積を促進したにも関わらず、シードリング発達には影響しなかった。次に、DAF-2 を用いて一酸化窒素（NO）の蓄積について調べたところ、1 日齢の *mdar4* では DAF-2 に由来する蛍光が増加し、それは NO 消去剤処理によって抑制された。これらの結果から、MDAR3 はシードリング発達に必要不可欠であるが、細胞内 ROS および NO レベルには大きく関わっていないこと、そして MDAR4 は NO 代謝に関与する可能性が示唆された。興味深いことに、両 MDAR の二重欠損は独立および従属の条件に関わらず発芽不全を示した。現在、*mdar3* および *mdar4* がそれぞれ塩および乾燥ストレスに高感受性を示す傾向が見られており、各条件下における表現型や AsA レドックス状態について調べている。

Reactive oxygen species, oxidative stress, ascorbate recycling

講演番号：3D23p02
講演日時、会場：3 月 28 日 14:11～ D 校舎 23 会場

レドックス応答性ホメオドメインロイシンジッパー転写因子は酸化的ストレス下での成長制御に関与する

A redox-responsive homeodomain-leucine zipper transcription factor is involved in the regulation of plant growth under oxidative stress

○大和 開[1]、野志 昌弘[2]、高木 優[3,4]、吉村 和也[5]、丸田 隆典[1]、澤 嘉弘[1]、石川 孝博[1]、重岡 成[2]（[1]島根大・生資科・生命工、[2]近畿大・農・バイオ、[3]産総研、[4]埼玉大・環境科学、[5]中部大・応生・食栄）

○Kai Yamato[1], Masahiro Noshi[2], Masaru Takagi[3,4], Kazuya Yoshimura[5], Takanori Maruta[1], Yoshihiro Sawa[1], Takahiro Ishikawa[1], Shigeru Shigeoka[2] ([1]Dept. Life Sci. Biotechnol., Fac. Life Environ. Sci., Shimane Univ., [2]Dept. Adv. Biosci., Grad. Sch. Agr., Kinki Univ., [3]AIST, [4]IEST, Saitama Univ., [5]Dept. Food Nutr. Sci., Coll. Biosci. Biotech.)

植物のストレス応答において、活性酸素種の生成部位や種類に依存した複数の経路のクロストークが重要であることが分かってきた。これまでに我々は、シロイヌナズナにおけるチラコイド膜結合型アスコルビン酸ペルオキシダーゼ（tAPX）の誘導抑制系を用いたマイクロアレイ解析などにより、葉緑体由来の H_2O_2 がシグナリング因子としてストレスおよびホルモン応答に重要であることを明らかにしてきた。最近、葉緑体 H_2O_2 に応答性を持つ遺伝子群の包括的な逆遺伝学的解析により、H_2O_2 シグナリングのレギュレーター候補としてホメオドメインロイシンジッパー転写因子（HAT1）を同定した。興味深いことに、ヒマワリにおける HAT1 ホモログの DNA 結合能や四次構造は自身の Cys 残基を介してレドックス制御を受ける可能性が報告されていた。そこで本研究では、レドックスシグナリングにおける HAT1 の生理機能について解析した。

HAT1 欠損株（KO-HAT1）はパラコート処理による酸化的ストレスに高感受性を示した。対照的に、HAT1 に転写抑制ドメインを連結し、過剰発現させた形質転換株（HAT1-SRDX）は同処理に非感受性を示し、この結果は HAT1 の転写抑制因子としての機能を裏付けた。また、これらの変異株における酸化損傷の度合いに野生株との違いは認められなかった。HAT1 の発現は tAPX の誘導抑制に加え、パラコート処理および強光照射によって抑制された。GFP 融合タンパク質を用いて長ネギ表皮細胞における HAT1 の局在性を解析したところ、通常条件下では本転写因子は主に核のみに局在したが、H_2O_2 処理下では細胞質にも局在した。この現象が HAT1 自身のレドックス状態に起因するかどうか調べるために、そのロイシンジッパー（LZ）ドメインおよび CPSCE モチーフに含まれる Cys 残基を Ser に置換した。その結果、CPSCE モチーフ内の Cys 残基の置換は通常および酸化的ストレス下の HAT1 局在性に影響しなかった。一方、LZ ドメイン内の置換は両条件下における HAT1 の細胞質局在性を著しく阻害し、同様の結果は全ての Cys 残基を置換した場合でも認められた。これらの結果から、HAT1 の細胞内局在性は LZ ドメインの Cys 残基を介してレドックス制御を受けることが示唆された。KO-HAT1 および HAT1-SRDX 株を用いたマイクロアレイ解析から、いくつかの下流候補遺伝子が同定された。以上より、HAT1 の発現および細胞内局在は細胞内レドックス状態に制御されること、そして本転写因子は酸化的ストレス下での成長制御に関与することが分かった。現在、HAT1 の細胞内局在性のレドックス制御に関して、シロイヌナズナ葉を用いて解析しているとともに、HAT1 の Cys 残基の置換が下流遺伝子の発現に及ぼす影響を調べている。

homeodomain-leucine zipper, redox regulation, Arabidopsis

講演番号：3D23p03
講演日時、会場：3 月 28 日 14:22～ D 校舎 23 会場

ユーグレナチオレドキシンレダクターゼの分子特性と生理機能
Functional characterization of thioredoxin reductases in *Euglena*
○玉木 峻[1]、丸田 隆典[1]、澤 嘉弘[1]、重岡 成[2]、石川 孝博[1]([1]島根大・生物資源・生命工、[2]近畿大・農・バイオ)
○Shun TAMAKI[1], Takanori MARUTA[1], Yoshihiro SAWA[1], Shigeru SHIGEOKA[2], Takahiro ISHIKAWA[1] ([1]Dept. Appl. Biosci. and Biotech., Fac. Life and Environ. Sci., Shimane Univ., [2]Dept. Adv. Biosci., Fac. Agr., Kinki Univ.)

【目的】我々はこれまでに真核微細藻類ユーグレナ（*Euglena gracilis*）における活性酸素種（ROS）代謝酵素としてアスコルビン酸ペルオキシダーゼ（APX）およびペルオキシレドキシン（Prx）を同定している（Ishikawa et al., 2010, Tamaki et al., 2014）。Prx の触媒サイクルはチオレドキシン（Trx）および NADPH 依存性 Trx 還元酵素（NTR）から成る Trx システムに依存している。Trx システムは遺伝子発現や代謝経路のレドックス制御において重要な役割を果たすことが知られているが、真核微細藻類における Trx システムに関する知見は乏しく、ユーグレナにおいて Trx システム構成酵素群は未同定である。そこで本研究では、ユーグレナにおける Trx を介したレドックス制御の解明を目的として、ユーグレナ NTR の酵素学的性質および生理機能を検討した。

【結果】ユーグレナ発現遺伝子情報の相同性検索より、3 つの *NTR*（*EgNTR1*, *-NTR2*, *-NTRC*）遺伝子の完全長 cDNA 配列を決定した。系統解析より、EgNTR1 および EgNTR2 はそれぞれ NTR ファミリーの Small および Large 型に属することが示された。興味深いことに、EgNTR2 は真核微細藻類に見られるセレン含有 NTR よりも、マラリア原虫に見られる非セレン含有 NTR に進化的に近いことが示された。EgNTRC は、光合成生物に特異的な N 末端側に NTR ドメインを、C 末端側に Trx ドメインを持つ融合酵素であった。TMHMM および TargetP プログラムを用いた解析から、EgNTR1、-NTR2、-NTRC はそれぞれミトコンドリア、細胞質、葉緑体への局在が予測された。EgNTR の組換え体タンパク質を大腸菌内で発現させ、HisTag アフィニティレジンを用いて精製酵素を得た。NTR 活性は代替基質 DTNB の還元を指標に評価した。活性測定から、いずれの組換え体 EgNTR も有意な活性を示した。カイネティクス解析から、EgNTR2 の NADPH に対する触媒効率（k_{cat}/K_m）は EgNTR1 や EgNTRC と比較して約 40 倍高かった。これは Small 型（EgNTR1, -NTRC）と Large 型（EgNTR2）とのサブファミリー間での分子構造および触媒機構の差異に起因すると考えられる。ユーグレナ細胞における NTR の生理機能を明らかにするために、二本鎖 RNA をエレクトロポレーションによりユーグレナ細胞に導入し、各 NTR 発現抑制細胞を作製した。NTR2 発現抑制細胞では、生育速度が低下し、細胞体積が増加したことから、細胞質型 Trx システムは正常な細胞生育および分裂に重要な役割を果たすことが示唆された。

Euglena, thioredoxin, redox regulation

講演番号：3D23p04
講演日時、会場：3 月 28 日 14:33～ D 校舎 23 会場

プラスチド局在スーパーオキシドジスムターゼはイネ登熟期における高温被害米の発生を低減する
Plastid localized Superoxide Dismutase Was Acquired High temperature Stress Tolerance during Grain Filling of Rice

○金古 堅太郎[1]、佐々木 麻衣子[2]、白矢 武士[3]、高松 壮[2]、及川 和聡[1]、古川 豊和[1]、三ツ井 敏明[1]（[1]新潟大農・応生化、[2]新潟大院・自然科学、[3]新潟県農業総合研究所）
○Kentaro Kaneko[1], Maiko Sasaki[2], Takeshi Shiraya[3], Takeshi Takamatsu[2], Kazusato Oikawa[1], Toyokazu Furukawa[1], Toshiaki Mitsui[1] ([1]Dept, Applied Biol. Chem., Niigata Univ., [2]Grad. Sch. Sci. & Tech., Niigata Univ., [3]Niigata Agricultural Research Institute)

イネは登熟期に高温に曝されると、コメが白濁する高温被害米が発生することでコメの品質、商品価値の低下が起こる。近年問題となっている地球温暖化によって、より高温被害米の発生が顕在してくことが懸念されている。そのため、イネの登熟期における高温被害の克服が求められている。我々は以前の研究より高温登熟性の異なるイネ品種を用いたこれまでのプロテオミクス解析によって、マンガン型スーパーオキシドジスムターゼ（MSD1）が高温登熟耐性の原因候補であることが明らかとしてきた。また、この MSD1 と黄色蛍光タンパク質（YFP）の融合タンパク質は、タマネギ表皮細胞においてゴルジ体及びプラスチドに局在していたことが分かった。一方で、*MSD1* 強発現体では野生型と比較して高温登熟性の著しい改善が見られたのに対し、RNAi による *MSD1* 発現抑制体では高温登熟性が低下した。そこで、高温登熟耐性における MSD1 の機能を探るため iTRAQ を用いた定量的プロテオミクス解析を行ったところ、*MSD1* 強発現体で活性酸素種消去系、分子シャペロン、タンパク質品質制御システム関連タンパク質の発現が上昇しており、高温ストレス下でのイネプラスチドの機能を維持したことが示された。これらの結果から、細胞内膜系プラスチドターゲティング酵素タンパク質 MSD1 は高温ストレスに適応するための重要な役割を担っていることが明らかになった。

Mn-SOD, High temperature Stress Toleranc

講演番号：3D23p05
講演日時、会場：3 月 28 日 14:44～ D 校舎 23 会場

Characterization of manganese superoxide dismutase genes of a halophyte *Suaeda maritima* in Japan and Egypt

○Elsayed mohamed[1,2], Ahmed A El-khatib[3], Katsuaki Takechi[1], Hiroyoshi Takano[1], Susumu Takio[1] ([1]Kumamoto Univ., [2]Al-Azhar Univ., [3]Sohag Univ.)

Global loss of agricultural production from salt-affected land is increasing. *Suaeda maritima* habituates in worldwide seashore and European and Indian materials are used to study in mechanism of stress tolerances. Although *S. maritima* is known to have important role for conservation of tidal flat, physiological property of *S. maritima* in East Asia including Japan was not analyzed. To address physiological and genetic properties of Japanese *S. maritima*, we compared growth of seedlings and stress response of superoxide dismutase (SOD) genes between Egyptian and Japanese *S. maritima*.Seeds were collected at the coast of Mediterranean sea, Damietta (Egypt) and Kamiamakusa, Kumamoto (Japan). Seeds were germinated on agar with 1/5 MS medium. Egyptian seeds germinated after one week cooling, while Japanese seeds germinated without cooling. Seedlings were transferred on vermiculite with Hoagland medium and small plants in about 5 cm height were used for analysis. Total DNA was isolated from the leaves of both materials, and ribosomal ITS sequences were amplified by PCR. Phylrogenetic tree of ITS sequences suggested that Egyptian *S. maritima* belongs to European group, while Japanese *S. maritima* stands at different clade. Total RNA was isolated from leaves of two plants, transcript abundance of copper-zinc superoxide dismutase (CuZn-SOD) and manganese SOD (Mn-SOD) were analyzed by RT-PCR. Both genes were expressed in the same level at the different concentration of NaCl, while the expression of choline monooxigenase gene involved in the biosynthesis of glycine betaine was promoted by supply of 400 mM NaCl, suggesting that these SOD genes are constitutively expressed in seedlings of *S. maritima*. In-gel SOD activity staining revealed that the activities of three CuZn-SODs and a Fe-SOD were detected in both materials under unstressed conditions and that band patterns were not changed by addition of 400 mM NaCl. Presence of Mn-SOD transcript but lack of its activity evokes a possibility that Mn-SOD apoprotein in *S. maritima* uses iron as prosthetic metal. Since Fe-SOD gene is not reported in *Suaeda* species, we analyzed cDNA of Mn-SOD gene and its genomic region. Nucleotide sequences of Mn-SOD cDNA of Egyptian and Japanese *S. maritima* showed 99.7% and 98% identity to that of *S. salsa*, respectively. Mn-SOD gene in genome consisted of 6 exons and 5 introns at same positions as observed in Mn-SOD genes of *Arabidopsis* and rice. Therefore, *S. maritima* from two origins possesses typical Mn-SOD genes. To characterize Mn-SOD in *S. maritima*, recombinant Mn-SOD proteins are under study.

halophytes, superoxide dismutase, stress tolerance

講演番号：3D23p06
講演日時、会場：3 月 28 日 15:05～ D 校舎 23 会場

冠水抵抗性イネ由来 *Sub1A* を導入したダイズ芽生えの冠水条件下の比較プロテオーム解析

Analysis of proteins affected by introduction of rice *Sub1A* in submerged seedlings of transgenic soybean

○西澤 けいと、南條 洋平、小松 節子（農研機構　作物研究所）
○Keito Nishizawa, Yohei Nanjo, Setsuko Komatsu (NARO Institute of Crop Science)

【背景と目的】　播種後の大雨等により冠水下に置かれた出芽期のダイズでは、幼根の損傷や子葉の腐敗といった様々な冠水障害が発生する。我々は、冠水障害の軽減を目指して、冠水ストレス応答の分子生物学的解析等を行っているが、冠水ストレス応答の制御機構や冠水抵抗性の向上に寄与する可能性のある重要な候補遺伝子の解明には至っていない。一方、イネにおいては 2 週間程度の完全冠水に耐える品種が見つかっており、原因遺伝子や機構が解明されている。このため、これらの知見の活用により研究を加速できる可能性がある。本研究では、冠水抵抗性を示すインド型イネ(FR13A)の冠水抵抗性遺伝子であり、AP2/ERF 転写因子をコードする *Sub1A*［D.J. Mackill 博士、S. Heuer 博士（国際稲研究所、当時）より分譲］をダイズへ導入し、*Sub1A* が冠水下のダイズ芽生えのタンパク質組成や冠水抵抗性に与える影響を解析した。
【方法および結果】　カリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーターと連結した *Sub1A* を、アグロバクテリウム法によりダイズ（スズユタカ）に導入して作製した形質転換系統を用いて解析を行った。播種 2 日後の芽生えに冠水処理を行い、冠水障害の一つと考えられる根端細胞死の発生程度をエバンスブルー染色により調査したところ、非形質転換体に比べてわずかに高い傾向を示す系統が存在した。また、シードリングケースを用いた暗所での冠水抵抗性試験において、*Sub1A* 導入系統は非形質転換体と同程度の障害を受けていた。一方、冠水処理を行った芽生えの胚軸および根のタンパク質組成について、非形質転換体と *Sub1A* 導入系統との比較定量プロテオーム解析を行ったところ、解糖系に関わるタンパク質に差異が認められた。これらのことから、*Sub1A* の導入によりダイズ芽生えの解糖系の一部が影響を受けるものの、冠水抵抗性の向上には至らないと考えられた。

Glycine max, submergence, transcription factor

講演番号：3D23p07
講演日時、会場：3 月 28 日 15:16～ D 校舎 23 会場

生分解性プラスチック分解酵素を処理した植物における葉面の構造変化とストレス応答

The analysis of stress response and structual change of phyllosphere treated by biodegradable plastic-degrading enzyme from *Pseudozyma antarctica*.

○植田 浩一[1]、釘宮 聡一[1]、渡部 貴志[1]、光原 一朗[2]、田端 純[1]、吉田 重信[1]、北本 宏子[1]([1]農環研、[2]生物研)
○HIROKAZU UEDA[1], SOUICH KUGIMIYA[1], TAKASHI WATANABE[1], ICHIRO MITSUHARA[2], JUN TABATA[1], SHIGENOBU YOSHIDA[1], HIROKO KITAMOTO[1] ([1]NIAES, [2]NIAS)

植物葉面には様々な非病原性の微生物が存在しているが、それらが葉面上でどのような活動をしているのかについて多くはわかっていない。これまで我々は、葉面常在菌の酵母や糸状菌が生産する加水分解酵素から、生分解性プラスチック分解活性を持つエステラーゼ（生プラ分解酵素）を単離している。また、イネ常在性の酵母 *Pseudozyma antarctica* の強力な生プラ分解酵素（PaE）を、高濃度で分泌生産させる培養条件も見つけている。しかし、これら酵素が実際に分泌されている植物表面への作用の詳細は、明らかとなっていない。そこで、本研究では PaE を含む *P. antarctica* の培養濾液が植物体に対して、どのような影響を与えるのかを検証した。

生プラ分解活性が認められる濃度の培養濾液を、トマトやシロイヌナズナの植物体に散布した後、給水制限下に置くと、約 7 日後に葉が萎れ、枯死することを以前の大会で報告した。この現象をより詳細に解析するために、切り葉を用いた。切り葉では、培養濾液処理後、短時間のうちに葉の重量が対照よりも有意に減少した。この萎れは、葉重量の大半を占める水分含量が減少し、乾燥したことによって生じたと考えられた。このことを植物側の応答で確認するため、乾燥ストレス特異的な遺伝子発現を解析した。その結果、培養濾液を処理した切り葉では、乾燥ストレス応答遺伝子の *9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase* 等の発現量が増大していた。それに伴って、乾燥に応答する植物ホルモンである、アブシジン酸の蓄積も確認できた。培養濾液を散布した植物の表面を走査型電子顕微鏡で観察したところ、細胞表面が荒れ、細胞間に間隙が拡がっていることを確認した。また、 SudanIII で脂肪染色した葉の断面を光学顕微鏡で観察したところ、表皮細胞を覆う赤色に染色された層が薄くなっていることが確認できた。

以上の結果は、常在菌 *P. antarctica* が分泌物する酵素が、植物表面のクチクラ層に作用したことを強く示唆している。クチクラ層は、水分の蒸散を抑える役割を持つことから、酵素の作用を受けることで、植物表層保護機能に影響を受け、水分が失われやすくなり、植物はその影響を、乾燥ストレスとして感知、応答したと推測された。

phyllosphere, stress response, biodegradable plastic-degrading enzyme

講演番号：3D23p08
講演日時、会場：3 月 28 日 15:27～ D 校舎 23 会場

シロイヌナズナにおけるイソチオシアネートによる熱耐性向上効果

Thermotolerance improving effects by isothiocyanates in Arabidopsis

○松原 匠[1]、高橋 郁夫[2]、原 正和[1,2] ([1]静岡大農、[2]静岡大グリーン研)
○Takumi Matsubara[1], Ikuo Takahashi[2], Masakazu Hara[1,2] ([1]Shizuoka Univ. Agr., [2]Shizuoka Univ. RIGST)

【目的】
気象変動に伴い、熱波に見舞われる地域が増え、農作物の減収と品質不良が問題となっている。そこで、植物の熱耐性を向上させる技術が求められている。当研究室では、植物の辛味成分フェネチルイソチオシアネート（PEITC）が、シロイヌナズナの熱ショック応答（HSR）を誘導し、耐熱性を高めることを見出した。PEITC は、植物熱耐性向上剤の良い候補であるが、PEITC を超える HSR 誘導活性を示すイソチオシアネートが存在するのかは不明であった。本研究では、植物に存在するイソチオシアネート 16 種（脂肪族 ITC 11 種、芳香族 ITC 5 種）と、合成イソチオシアネート 1 種、合計 17 種類に関し、HSR 誘導活性を測定し、PEITC の活性を超えるイソチオシアネートを見出したので報告する。
【方法】
熱ショック蛋白質（HSP）プロモーターアッセイ：当研究室では、PEITC のほか、既知の植物熱耐性向上物質であるゲルダナマイシン、サンギナリンに共通して発現が誘導するシロイヌナズナの HSP 遺伝子を同定した。本遺伝子の上流 1 kb に β-グルクロニダーゼ（GUS）を連結したコンストラクトを導入したシロイヌナズナを作出した。幼植物を各種イソチオシアネート溶液に浸漬させた一定時間後に GUS 活性を蛍光法によって測定した。*シロイヌナズナ熱耐性試験*：6 日齢のシロイヌナズナ野生株をイソチオシアネート処理し、翌日熱ショック（46℃、1 h）を与えた。その後 3 日間栽培して新鮮重量を測定した。
【結果・考察】
シロイヌナズナに 17 種のイソチオシアネートを投与し、HSR 誘導活性を測定したところ、総じて、脂肪族イソチオシアネートの方が、芳香族イソチオシアネートより、高い熱ショック応答誘導活性を示した。特に、2 種類の脂肪族イソチオシアネートの活性は顕著であり、PEITC よりも明らかに高い活性を示した。これらの高活性脂肪族イソチオシアネートは、シロイヌナズナ熱耐性試験でも、高温ストレス傷害の緩和作用を示した。以前の結果より、PEITC の植物熱耐性向上効果には、イソチオシアネート基が必要であることが示されたが、今回、イソチオシアネートの側鎖の構造が HSR 誘導活性に影響を与えることが分かった。以上、脂肪族イソチオシアネートは、有効な植物熱耐性向上物質となりうることが示された。現在、高活性脂肪族イソチオシアネートの HSR 誘導パターンを詳細に調査している。

heat shock response, heat shock protein, isothiocyanate

講演番号：3D23p09
講演日時、会場：3 月 28 日 15:38～ D 校舎 23 会場

シャペロン阻害剤によるシロイヌナズナにおける熱ショック応答の誘導

Induction of heat shock response by chaperone inhibitors in Arabidopsis

○村野 宏樹[1]、高橋 郁夫[2]、松原 匠[1]、原 正和[1,2] ([1]静岡大農、[2]静岡大グリーン研)
○ Hiroki MURANO[1], Ikuo TAKAHASHI[2], Takumi MATSUBARA[1], Masakazu HARA[1,2] ([1]Shizuoka Univ. Agr, [2]Shizuoka Univ. RIGST)

【目的】
近年、夏季の異常高温により、農作物の生産減少、生態系の破壊などが国際的な問題になっている。これらの問題を解決するための一手段として、熱耐性向上剤の開発が期待されている。しかし、サンギナリン剤以外では、実用化の例はほとんどない。ところで、抗がん剤のリード化合物に、ゲルダナマイシン（GDA）がある。GDA は、シャペロン（熱ショック蛋白質 90、HSP90）阻害剤であり、HSP90 が結合・不活化している熱ショックファクターを、遊離・活性化し、熱ショック応答を誘発する。GDA をシロイヌナズナに投与すると、HSP90 遺伝子群が活性化し、熱耐性が向上する。しかし、熱耐性の向上が GDA に限った活性なのか、HSP90 を阻害した場合に起こる一般的な現象なのかは不明である。最近、GDA 以外に、多くの HSP90 阻害剤が抗がん剤として開発されてきた。そこで、GDA を含めた 11 種の HSP90 阻害剤をシロイヌナズナに与え、熱ショック応答及び熱耐性を比較調査した。

【材料と方法】
HSP90 阻害剤 11 種は、薬品会社から購入した。*熱ショック応答*：GDA によって活性化するシロイヌナズナの HSP 遺伝子の上流 1 kb を、レポーター遺伝子（β－グルクロニダーゼ）に連結したコンストラクトを組換えたシロイヌナズナを使った。6 日間育てた遺伝子組換えシロイヌナズナの芽生えを、10 段階の濃度に割り振った HSP90 阻害剤を含む試験液へ漬けこみ、植物体内における HSP 発現量を GUS の蛍光により調査した。*植物熱耐性試験*：6 日間無菌培養したシロイヌナズナの芽生えを、5 つの濃度に割り振った HSP90 阻害剤を含む培地に移し替え、翌日に高温処理（47 ℃、1 時間）、その 3 日後の植物体内におけるクロロフィル残存量を調査した。*シャペロン阻害試験*：HSP90 阻害剤のシャペロン阻害活性(IC_{50})を小麦胚芽抽出物の変性ルシフェラーゼ回復試験で調査した。

【結果と考察】
今回用いたすべての HSP90 阻害剤は、シロイヌナズナの熱ショック応答を誘発し、小麦胚芽抽出物のシャペロン活性を阻害した。しかし、その程度は阻害剤によって異なっていた。各 HSP90 阻害剤に関し、熱ショック応答誘導活性、熱耐性向上活性、シャペロン阻害活性の強さの相関性を評価したところ、熱ショック応答誘導活性が高いものほど熱耐性向上活性が高く、シャペロン阻害活性が高いほど熱ショック応答誘導活性が高い傾向にあることがわかった。以上の結果から、シロイヌナズナでは、HSP90 阻害剤が HSP90 を効率よく阻害すると、熱ショック応答が強く惹起され、結果として熱耐性が向上する可能性が示唆された。今回、特に、活性が高かったものは、GDA の誘導体ではなかった。以上の結果、植物熱耐性向上剤の開発には、HSP90 を標的にすることが望ましいことが分かった。現在、最も強力にシロイヌナズナの熱ショック応答を誘導した HSP90 阻害剤について、熱ショック応答パターンを詳しく調査している。

chaperone inhibitors, heat shock proteins, HSP90 inhibitors

講演番号：3D23p10
講演日時、会場：3 月 28 日 15:49～ D 校舎 23 会場

スクロースを指標にしたイネ幼苗の低温順化処理方法の検討

Investigation of methodology for cold acclimation of rice using sucrose as a biomarker

○提箸 祥幸、佐藤 裕（農研機構・北農研）
○Yoshiyuki SAGEHASHI, Yutaka SATO (HARC, NARO)

【目的】熱帯起源作物であるイネは、これまで低温順化機構を持つと考えられてこなかった。しかし、近年、イネにおいても低温順化により低温耐性を獲得する機構が存在することが明らかになってきた。すなわち、低温順化処理をしたイネは、通常であれば枯死してしまうような強い低温ストレス環境下でも生き延びることができる。このような特性は、移植後に厳しい気象条件にさらされる寒地で重要な形質になると考えられる。本研究では、イネの低温順化時に特異的に増加する物質をバイオマーカーとして選抜し、これを指標として水稲苗に最適な低温順化処理を行うことで、移植後の苗の低温耐性強化法を開発することを目的とする。

【材料と方法】北海道のイネ品種として「おぼろづき」の播種後 10 日のイネの幼苗を供試した。低温順化条件については、グロースチャンバーを用いて処理温度と処理日数について検討した。低温順化の効果については、低温順化処理後、4℃（暗）処理を行い、常温に戻してから 10 日後の個体生存率で評価した。イネの代謝産物の解析には、植物体の地上部を採取して凍結させた試料を供した。試料は抽出後、GC-TOF-MS 測定に供した。可溶性糖については、イネ幼苗の地上部を粉砕し、試料の 10 倍量の超純水にて 2 時間煮沸し抽出した試料を高速液体クロマトグラフィーで分析した。

【結果および考察】「おぼろづき」の幼苗が枯死に至るまでの 4℃の処理期間は、12℃5 日間の低温順化処理により、無処理区に対して 6 日程度の延長が見られた。このことはイネ幼苗の低温順化処理がその後の低温耐性を向上させたことを示す。代謝産物の網羅的解析から、低温順化処理により多くの糖類とアミノ酸類が増加すること、可溶性糖の分析から、糖類のなかでもスクロースの蓄積量が低温順化処理中に著しく増加することが判明した。そこで、スクロースを指標として順化処理の最適条件を検討した結果について報告する。

本研究の一部は文部科学省科学研究費（26850012）ならびにタカノ財団研究助成の支援を受けて実施した。

cold acclimation, sucrose, rice

講演番号：3D23p11
講演日時、会場：3 月 28 日 16:10～ D 校舎 23 会場

ジャガイモ腋芽がストロンに分化する際に発現する遺伝子の網羅的な解析

Transcriptome analysis of axillary buds of potato during stolon differentiaion

○加藤 彰[1]、重岡 成[2]、横田 明穂[1] ([1]奈良先端大先端科技セ、[2]近畿大農)
○Akira KATOH[1], Shigeru SHIGEOKA[2], Akiho Yokota[1] ([1]NAIST, [2]Kinki Univ.)

ジャガイモのデンプン貯蔵組織、いわゆるイモは、特殊な形に発達した茎組織で塊茎と呼ばれる。この塊茎は主茎の地下部から伸長するほふく枝（ストロン）上の腋芽から分化する。このようにストロンの発達は塊茎分化に先立つ現象で、デンプン貯蔵組織形成の重要な第一ステップである。我々は、ジャガイモ主茎腋芽のストロンへの分化メカニズムの分子機構を研究してきた。これまで、塊茎に分化するプロセスに強い関心が持たれ、様々な研究がなされてきた。その結果として、遺伝子発現プロファイルやタンパク質蓄積プロファイルのデータベース（DB）が公開されているが、ストロン分化プロセスに関する報告はほとんど無い。そこで、マイクロアレイを用いて、ストロン分化プロセスにおける転写物レベルの網羅的な解析を、昨年度の発表に引き続き、さらに詳細に行った。頂芽を切除した植物片を暗黒条件下で in vitro 培養すると腋芽からストロンが発達する（この条件を D 条件とする)。明条件下では小植物体へ発達する（L 条件)。頂芽を切除せずに植物片を暗黒条件下で培養すると腋芽は発達しない（AD 条件)。我々は RAN-GTPase（RAN)遺伝子がストロンの発達に深く関与すると考えているので、RAN 遺伝子量のレベル上昇を指標にして、培養開始後、24h（22℃)の時点で植物片上の腋芽のサンプリングを行った。これら 3 条件に加えて、実験開始時（0h)の腋芽（B 条件）を加えた 4 条件のサンプルを得た。腋芽サンプルから RNA を抽出し、ジャガイモ転写物の公開 DB を基にして設計したスライドを用いて、マイクロアレイ解析を行った。得られた転写物レベルの情報に対して主成分分析（PCA)を行い、ローディング値を基にしてサンプルのグループ分けの傾向を調べた。その結果、第 1 主成分（PC1)だけで寄与率が 93%を示し、ほとんどの傾向を説明しており、この PC1 でサンプルは L、D 条件と AD、B 条件の 2 グループに分かれる傾向を示すことが判った。スコア値を基に、グループ分けの傾向を説明する発現遺伝子を調べたところ、L、D グループを説明するような発現レベルを示す遺伝子群に RAN 遺伝子が含まれていた。さらに、シュートの分化に関与する遺伝子群が含まれていた。本発表では、この 2 グループのサンプル間で発現に差がある遺伝子の詳細を報告する。(謝辞：この研究は JST, CREST の助成を受けている。)

stolon, RANGTPase, microarray

講演番号：3D23p12
講演日時、会場：3 月 28 日 16:21～ D 校舎 23 会場

窒素固定能を持つシアノバクテリア *Nostoc* sp.に対する銀杏抽出物のホルモゴニア分化誘導因子の探索

Search of hormogonia inducing factor in *ginkgo biloba* extract acquiring mobility of nitrogen fixing cyanobacteria *Nostoc* sp.

○西塚 紘明、橋床 泰之（北大院農）
○Hiroaki NISHIZUKA, Yasuyuki HASHIDOKO (Hokkaido Univ.)

研究背景）窒素固定能を持つ *Nostoc* 属シアノバクテリアはソテツやオニブキなど複数の光合成植物と相利的な共生関係を構築することが知られている。*Nostoc* sp.の宿主植物との共生構築への初期段階においては、1）宿主の認識および、2）宿主の共生部位への誘引が必須であると考えられている。*Nostoc* sp.はこれらの過程の際に、ホルモゴニア（hormogonia）と呼ばれる運動性を有する形態へと分化する。この分化は、宿主植物から放出されるホルモゴニア分化誘導因子（hormogonia inducing factor, HIF）によって引き起こされると考えられており、HIF の一つとしてソテツサンゴ状根から 1-palmitoyl-2-linoleoyl-*sn*-glycerol が単離同定されている。ジアシルグリセロールにはプロテインキナーゼ C（PKC）を賦活化させる機能が知られているため、ホルモゴニア分化には PKC 賦活化を含む細胞内シグナル伝達機構が関与していることが予想される。本研究では、果実（ギンナン）に皮膚炎を引き起こすアナカルド酸類を含むイチョウ（*Ginkgo biloba*）に着目し、HIF の探索を試みた。
方法）2014 年 11 月にギンナン 2.42 kg を北海道大学構内で採取し、MeOH（6 L）で 10 日間抽出を行った。この抽出液を減圧濃縮し、得られた粗抽出液を水で再懸濁して、等量の EtOAc で液液分配を行った。この EtOAc 可溶画分に対し *n*-hexane-EtOAc 系で順相シリカゲルカラムクロマトグラフィーを行い、各画分のギンナン 1 g 新鮮重相当量をバイオアッセイに用いた。被験菌にはソテツサンゴ状根から分離した *Nostoc* sp.屋久島株を用いた。BG-11_0無窒素寒天平板培地継代培養した *Nostoc* sp.のコロニーを滅菌金属メッシュ（70 mesh/inch）で濾過し、得られた長径 0.2 mm 以下の凝集体をさらに 2 週間同培地で静置培養し、生育した凝集体コロニーに各分画物を含ませたペーパーディスクを乗せる HIF 検定試験を行った。それぞれの分画物に対する *Nostoc* sp.凝集体の応答と形態を 25℃、16 時間明所条件で蛍光顕微鏡により経時観察し、*Nostoc* sp.菌体の分散およびホルモゴニアへの形状分化を追跡した。HIF 活性が示された画分は各種クロマトグラフィーに供し、活性本体の単離精製を試みた。
結果と考察）バイオアッセイ開始 12 時間後から、EtOAc75%溶出画分 46 µg（1 g 新鮮重相当量）で *Nostoc* sp.凝集体が徐々にホルモゴニアに分化し、周辺へ拡散していく様子が示された。活性本体と予想される化合物は、UV365 nm 照射下で青白色蛍光を発することが確認された。この新規活性成分は、2.42 kg のギンナン抽出物から約 1 mg 単離され、本研究室で HIF と同定してきたジアシルグリセロール類よりも格段に強い活性を示した。現在この化合物の構造決定に取り組んでいる。

hormogonia inducing factor, *ginkgyo biloba*, cyanobacteria

講演番号：3D23p13
講演日時、会場：3 月 28 日 16:32～ D 校舎 23 会場

紅藻スサビノリの無機栄養欠乏での遺伝子発現と栄養状態評価
Gene expression under nutritional deficiency and nutritional assessment of *P. yezoensis*
○吉村 航、井村 祐己、鈴木 道生、吉村 悦郎（東大院・農生科・応生化）
○Ko YOSHIMURA, Yuki IMURA, Michio SUZUKI, Etsuro YOSHIMURA (The Univ. of Tokyo)

[背景と目的]
スサビノリ(*Pyropia yezoensis*)は、海洋性の大型の紅藻で、日本では主に乾ノリに加工され、食用とされている。比較的培養が簡単であり、実験室中で小スケールでの継代培養が可能なことから、紅藻のモデル生物としてゲノムプロジェクトが進められてきた。近年、スサビノリの核ゲノムのドラフト配列が公開され、約 1 万個の遺伝子がコードされていることが明らかになった。商業的に重要な水産物であるスサビノリは日本各地で養殖が行われているが、ノリ養殖においては「色落ち」と呼ばれる、ノリの色素含量が低下する現象が問題になっている。「色落ち」の原因として、必須栄養素の欠乏が有力視されていることから、養殖ノリの栄養状態を把握することは重要な課題になっている。本研究では、スサビノリの栄養状態の指標となる遺伝子の特定と、それらの遺伝子の発現量を実際に養殖されたノリで調べ、養殖ノリの栄養状態を評価することを目的としている。

[方法と結果]
実験室で継代培養したスサビノリを葉長 3 cm 程度に生育させ、ESS_2 強化人工海水および、窒素、リン、鉄を含まない ESS_2 強化人工海水にそれぞれ移し、3 日間培養した。回収したノリ葉体から total RNA を調製し、それを鋳型に cDNA を合成した。スサビノリのゲノムデータベースから、窒素、リン、鉄の欠乏で発現が誘導されると考えられる候補遺伝子を選定し、それぞれのサンプルでの遺伝子発現量を real-time PCR により定量した。また、特異的な誘導を示した遺伝子については、現場の養殖ノリを用いて同様に遺伝子発現量の定量を行った。
スサビノリにおいては必須栄養素の欠乏に対して、トランスポーターの発現誘導による取り込みの強化など、陸上植物と同様の応答が見られることがわかった。また、現場の養殖ノリにおいて、それらの遺伝子の発現量を指標に用いて、養殖ノリの栄養状態を評価することが可能になった。

P. yezoensis, red alga, nutritional deficiency

講演番号：3D23p14
講演日時、会場：3 月 28 日 16:43～ D 校舎 23 会場

ヤナギ（*Salix* spp.）樹皮におけるストロンチウム（Sr）含有結晶の生成機構
Production of strontium (Sr) -containing crystals in willow (*Salix* spp.) bark.
○原田 英美子[1]、庄 美冴子[1]、木村 ひろみ[1]、森 卓弥[1]、稲田 和幸[1]、竹中 千里[2]、富岡 利恵[2]、保倉 明子[3]、寺田 靖子[4]、水野 隆文[5]（[1]滋賀県大環境科学、[2]名古屋大農、[3]東京電機大工、[4]SPring-8/JASRI、[5]三重大生物資源）
○Emiko HARADA[1], Misako Sho[1], Hiromi Kimura[1], Takuya Mori[1], Kazuyuki Inada[1], Chisato Takenaka[2], Rie Tomioka[2], Akiko Hokura[3], Yasuko Terada[4], Takafumi Mizuno[5] ([1]The Univ. of Shiga Pref., [2]Nagoya Univ., [3]Tokyo Denki Univ., [4]SPring-8/JASRI, [5]Mie Univ.)

2011年3月に発生した福島第一原子力発電所の事故により、環境中に大量の放射性物質が飛散した。放射性ストロンチウム（Sr）は同族であるカルシウム（Ca）と生理的に似ているため、歯や骨に蓄積し、長期にわたり健康被害をもたらす。森林樹木における Sr 集積は、環境中での放射性元素の挙動に大きく影響を与える。本研究では Sr の高集積植物とされるヤナギ属（*Salix* sp.）、ウコギ科のタカノツメ(*Eleutherococcus innovans*)およびコシアブラ(*Chengiopanax sciadophylloides*)を用い、Sr の集積機構の解明を試みた。

植物体内での局在部位を調べるため、野外で植物体を採集し、安定同位体 Sr の分析を行った。特に枝の樹皮と木部における金属の元素の分配に着目した。誘導結合プラズマ発光分光分析(Inductively Coupled Plasma－Optical Emission Spectrometry、ICP-OES)法で Sr、Ca、Fe、Mn、Zn、Cu の部位別の定量分析を行ったところ、いずれの金属も木部より樹皮に高濃度で含まれていた。枝の凍結切片（厚さ 50 μm）を作成し、放射光蛍光X線分析（μ-X-ray fluorescence、XRF）による元素イメージングを行った（SPring-8 課題番号 2012B1550)。いずれの木本植物の樹皮中にも Ca と Sr を含んだ結晶状の物質が観察された。エネルギー分散型 X 線元素分析装置を装着した走査型電子顕微鏡(SEM－EDX ： Scanning Electron Microscope - Energy Dispersive X-ray Spectroscopy)で分析したところ、結晶状物質は金平糖状の集晶で、Ca が高濃度で含まれていることが判明した。木本植物に吸収された Sr は、Ca と共に樹皮中で不溶性の結晶状物質を形成し、植物体内に長く留まる可能性があることが示唆された。

結晶状物質の生成に関与すると考えられる遺伝子の探索を目的として、樹皮特異的に発現する遺伝子の RNA-seq 法による解析を行った。枝の木化に伴い樹皮内での結晶生成が進行することから、樹皮に特異的に発現し、木化した枝と若い枝で発現量が異なる遺伝子に着目した。カワヤナギ（*S. miyabeana* subsp. *gymnolepis,* synonym *S. gilgiana*）を水耕栽培で栽培し、木化した枝と若い枝から樹皮を採集、組織特異的 RNA を抽出した。それぞれの RNA からライブラリを構築し、次世代シークエンサーIon Proton（Life Technologies）で配列解析を行った。既にゲノムが解読されているポプラ（*Populus trichocarpa*）の配列を利用しアラインメントを行ったところ、高品質であると判断されたリードのうち 80%のアラインメントを行うことができた。得られた約 41,000 遺伝子から Ca 結合性タンパク質などの候補を抽出し、RT-PCR などによる発現解析を行っている。

willow, strontium, RNA-seq

講演番号：3D23p15
講演日時、会場：3 月 28 日 16:54～ D 校舎 23 会場

His 型金属結合ペプチドデハイドリンによる植物金属ストレス緩和作用

Amelioration of metal stress in plant by dehydrin which is a His type metal binding peptide

○原 正和[1,2]、門奈 修平[2]、村田 尊英[2]、中野 太陽[2]([1]静岡大グリーン研、[2]静岡大農学研究科)
○Masakazu Hara[1,2], Shuhei Monna[2], Takae Murata[2], Taiyo Nakano[2] ([1]Shizuoka Univ. RIGST, [2]Shizuoka Univ. Agric)

【はじめに】デハイドリンは、植物が水ストレスを受けた時に発現する、主要な蛋白質の 1 つである。酵素の安定化、水やイオンの結合、活性酸素種の発生抑制を通じて、細胞を保護すると考えられているが、機能の全容は解明されていない。以前、当研究室では、デハイドリンが、His 残基によって重金属と結合することを示した。植物では、メタロチオネインやファイトキレーチンなどの SH 型金属結合ペプチドが、重金属傷害を緩和する。一方、デハイドリンは、システイン残基をもたず His に富むことから、植物には、His 型金属結合ペプチド（HMBP）というグループが存在すると考えた。しかし、HMBP が、重金属障害の緩和に貢献するかは不明である。本研究では、HMBP であるシロイヌナズナのデハイドリン AtHIRD11 の銅ストレスに対する効果を、インビトロ及びインビボで調査した。
【材料と方法】AtHIRD11 及び各種変異蛋白質は、大腸菌発現系によって調製した。酵素は市販のものを用いた。AtHIRD11 及び各種変異蛋白質遺伝子を恒常的に発現する遺伝子組換えシロイヌナズナを作出し、銅による成長阻害を新鮮重量で評価した。
【結果と考察】銅による生理障害のインビトロモデルとして、酵素活性の阻害を調査した。市販の酵素 5 種類を試験したところ、乳酸脱水素酵素（LDH）が、銅によって最も顕著に阻害されることが分かった。銅イオンで活性を阻害した LDH に対し、AtHIRD11、牛血清アルブミン、リゾチームを作用させたところ、AtHIRD11 が最も効果的に LDH の活性を回復させた。AtHIRD11 の His 残基の含有率を変化させた変異蛋白質を調製し、LDH の銅阻害に対する作用を比較したところ、AtHIRD11 のすべての His を Ala に変換した蛋白質は、銅の結合力と失うとともに、LDH の銅阻害を緩和する活性が著しく低下した。さらに、AtHIRD11 及び His 含量を変化させた変異 AtHIRD11 を過剰発現させたシロイヌナズナを銅培地で培養したところ、AtHIRD11 及び His を有する変異 AtHIRD11 を発現させた株は、野生株に比べて銅による成長阻害が緩和されたが、His を Ala に変換して His を無くした変異 AtHIRD11 は、野生株と同等の成長阻害を示した。

以上、酵素を使ったインビトロモデル試験、組換え植物を使ったインビボ試験の結果から、AtHIRD11 は、植物における銅ストレスを緩和し、その効果には His 残基が必要であることが分かった。今回、HMBP であるデハイドリンが、乾燥及び低温ストレスのほか、重金属ストレスの緩和にも関与する、多機能性蛋白質であることが示唆された。

dehydrin, histidine, metal stress

講演番号：3D23p16
講演日時、会場：3 月 28 日 17:15～ D 校舎 23 会場

イネにおけるポリアミン酸化酵素の多様性
Diversity of polyamine oxidases in *Oryza sativa*
○草野 友延[1]、キン ドンウク[1]、劉 太波[1]、井澤 翔[1]、新津 勝[2]、ベルベリッヒ トーマス[3]、児島 征司[1] ([1]東北大生命、[2]城西大薬、[3]BiK-F)
○Tomonobu Kusano[1], Dong Wook Kim[1], Taibo Liu[1], Sho Izawa[1], Masaru Niitsu[2], Thomas Berberich[3], Seiji Kojima[1] ([1]Tohoku Univ., [2]Josai Univ., [3]BiK-F)

【背景】ポリアミンは、植物の生長や環境ストレスに対する生体防御反応において重要な役割を果たすことが知られている。ポリアミンの細胞内濃度は、生合成と分解との動的な均衡によって保たれている。イネには、ポリアミン分解に関与する 7 種のポリアミン酸化酵素遺伝子、*OsPA01*～*OsPA07* が存在している。演者らは、これまでに OsPA01、OsPA03～OsPA05、そして OsPA07 の 5 種の c DNA を単離した。
【目的】イネにおける 7 種のポリアミン酸化酵素遺伝子およびそれらの遺伝子産物につき、統括的な解析を行うことを目的とした。
【方法】*OsPA01*～*OsPA07* の生育に伴う発現、および非生物的ストレスに対する発現の有無については、(q)RT-PCR 法にて調べた。*OsPA01*、*OsPA05* そして *OsPA07* については各プロモーター::GFP コンストラクトを導入した形質転換したイネを作出して解析を行った。
さらに大腸菌産生系で得られた組換え酵素を用いて、分解様式、基質特異性そして反応速度論的解析を行った。
【結果】*OsPA01* は、スペルミンやサーモスペルミン処理した根部でのみ誘導的に発現すること、OsPA01 酵素は細胞質に存在し、スペルミンおよびサーモスペルミンをスペルミジンに逆変換する活性を持つこと、を示した。従って、OsPA01 は根部でのテトラアミン濃度の恒常性に関与すると推測した。
OsPA03～*OsPA05* は、いずれもイネのほぼ全ての組織で普遍的に発現していた。これら 3 種の酵素はいずれもパーオキシゾームに局在し、OsPA03 はスペルミンをプトレシンまで、OsPA04 と OsPA05 はスペルミンおよびサーモスペルミンをスペルミジンへ逆変換する活性を持っていた。OsPA03、OsPA04 そして OsPA05 は、いずれも遺伝子発現レベルが高いことからイネの遊離ポリアミンの濃度維持に中心的役割を果たしていると推測している。*OsPA07* は、これまでのところ花器官でのみ特異的に発現している。雌性器官では発現がなく、雄性器官である葯や花粉粒で発現していた。OsPA07 酵素は細胞間隙に分泌されること、スペルミンとスペルミジンを末端分解経路で分解すること、k_{cat}/K_m 値が他の PAO 酵素の値に比べて 100 倍以上大きいことが特徴であった。
　上記の結果を踏まえ、イネポリアミン酸化酵素の多様性を論議する。

Oryza sativa, polyamine, polyamine catabolism

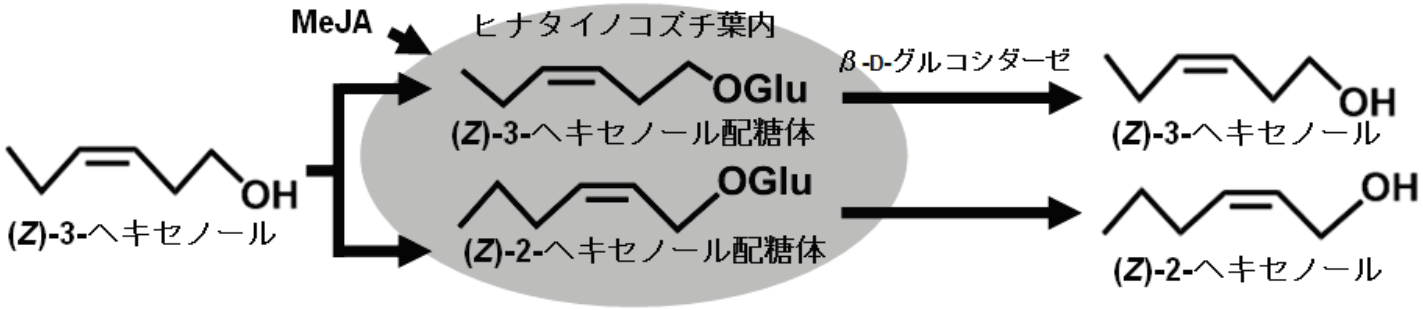
講演番号：3D23p17
講演日時、会場：3 月 28 日 17:26～ D 校舎 23 会場

ヒナタイノコズチでの(Z)-3-ヘキセノールの代謝と異性化

Metabolism and isomerization of (*Z*)-3-hexenol in *Achyranthes bidentata* .

○清水 理未、野下 浩二、阿部 誠、田母神 繁（秋田県立大生物資源）
○Satomi SHIMIZU, Koji NOGE, Makoto ABE, Shigeru TAMOGAMI (Akita Pref. Univ.)

研究背景) 「緑の香り」として知られる(*Z*)-3-ヘキセナールや(*Z*)-3-ヘキセノールは茶葉を実験材料として盛んに研究が行われ、α-リノレン酸が酸化的に代謝されることで生成することがわかっている。小林ら (1993) の研究で、茶葉中にグルコースと(*Z*)-3-ヘキセノールが結合した(*Z*)-3-ヘキセニル-β-D-グルコピラノシドが存在することが明らかとなり、配糖体を前駆体とする「緑の香り」の生合成経路の存在が示唆された。また、杉本ら (2014)は、トマト葉が空中伝搬で吸収した(*Z*)-3-ヘキセノールを配糖体として葉に貯蔵することを報告した。一方、我々はヒナタイノコズチがヘキセン酸メチルを放出することを確認しており、(*Z*)-3-ヘキセナールや(*Z*)-3-ヘキセノールの代謝に興味を持っている。そこで、ヒナタイノコズチを実験材料として、(*Z*)-3-ヘキセノールの配糖体への代謝を検討した。
方法) 重水素標識した(*Z*)-3-ヘキセノールを投与したヒナタイノコズチ生葉をメタノール抽出した。得られた抽出物を酢酸エチルに溶解後、水で抽出し減圧濃縮によって乾固した。得られた固形物を配糖体を含む画分とした。この固形物を 0.1M クエン酸/クエン酸ナトリウムバッファー (pH 5.0) に溶かし、ポリクラール VT を加えて 37℃で 10 分間振盪後、β-D-グルコシダーゼを加え 30 分間反応させた。反応バイアル瓶のヘッドスペース中に放出された揮発性代謝物を捕集し、GC-MS で分析した。
結果と考察) 分析の結果、配糖体由来の代謝物と予想される 2 本のピークを得た。これらのピークを MS 分析により(*Z*)-3-ヘキセノール及び(*Z*)-2-ヘキセノールと同定した。(*Z*)-3-ヘキセノールのピークは天然及び重水素化代謝物を含んでいた。また、(*Z*)-2-ヘキセノールのピークも天然及び重水素化代謝物を含んでいた。従って、重水素標識された(*Z*)-3-ヘキセノールは、(*Z*)-2-ヘキセノールへ異性化されたと考えた。また、(*Z*)-2-ヘキセノールへの異性化はメチルジャスモン酸(MeJA)により促進された。



ヒナタイノコズチ葉における(*Z*)-3-ヘキセノールの代謝

glycoside, methyl jasmonate, (*Z*)-3-hexenol

講演番号：3D23p18
講演日時、会場：3 月 28 日 17:37～ D 校舎 23 会場

シロイヌナズナの緑化を抑制する動物神経系 CRIPT 相同タンパク質の機能

Functions of an animal nervous CRIPT homolog in *Arabidopsis* for suppression of greening

○青木 亮裕[1]、清水 正則[2]、小林 京子[1]、細谷 孝博[1]、熊澤 茂則[1]、小林 裕和[1]（[1]静県大院・食品栄養環境・薬食生命、[2]常葉大・健康プロデュース）
○ Akihiro Aoki[1], Masanori Shimizu[2], Kyoko Kobayashi[1], Takahiro Hosoya[1], Shigenori Kumazawa[1], Hirokazu Kobayashi[1] ([1]Grad. Sch. Nutr. Envir. Sci., Grad. Sch. Integrated Pharmaceut. Nutr. Sci., Univ. Shizuoka, [2]Sch. Health Promot. Sci., Tokoha Univ.)

【目的】葉緑体の機能分化の制御機構を解明する目的で、シロイヌナズナにアクティベーション･タギングを適用し、サイトカイニン含有緑化カルス誘導培地においても緑化しない ***s**uppressed **g**reening of **c**alli* (*sug*) を 4 系統選抜した (特許出願: 2009-061335)。分化した植物個体のクロロフィル含量を測定したところ、*SUG* 遺伝子強制発現系統では野生系統に対して、クロロフィル含量が低下していた（植物生理学会年会, 2011）。その中でも、SUG102 タンパク質は動物神経系に存在する **C**ys-**r**ich **i**nteractor of **P**DZ**3** (CRIPT) タンパク質に類似しており興味深い。そこで、本研究では SUG102 に焦点を当て、解析することとした。
【方法】MS 培地上で育成した野生系統および *SUG102* 強制発現系統の根を緑化カルス誘導培地に置き、カルスの表現型を評価した。メタボローム解析は、Q Exactive MS (Thermo) により実施した。また、シロイヌナズナのデータベースから PDZ [post-synaptic density protein (**P**SD-95), *Drosophila* disc large tumor suppressor (**D**LG), and zonula occludens-1 protein (**Z**O-1)] ドメインを持つタンパク質を検索した。ヒト CRIPT あるいは SUG102 を pEU-GST ベクター (CellFree Sciences) にクローニングし、コムギ無細胞タンパク質発現系 (CellFree Sciences) により、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) 融合タンパク質を合成した。さらに、SUG102 に変異を導入した sug102(V99A) コンストラクトを作製した。シロイヌナズナ PDZ ドメイン･タンパク質は、pCold1 ベクターにクローニングし、大腸菌 Rosetta DE3 (Novagen) に形質転換し、His-タグ･タンパク質として合成した。これらのタンパク質を用い、SUG102 とシロイヌナズナ PDZ ドメイン･タンパク質との相互作用を解析した。
【結果および考察】緑化カルス誘導培地および通常カルス誘導培地において、*SUG102* 強制発現カルスで黄色色素の蓄積が見られた。したがって、メタボローム解析によりこれら系統の代謝産物を比較した。また、動物神経系において、CRIPT タンパク質は PDZ ドメインに相互作用し、様々なシグナル伝達に関与している。相互作用解析により、SUG102 とシロイヌナズナ PDZ10 との相互作用が示唆された。さらに、CRIPT タンパク質は、PDZ ドメイン認識のためのアミノ酸配列 QTSV を有する。この配列の有効性を検証した。他の PDZ ドメインタンパク質との相互作用についても合わせて報告する。

suppressed greening of calli (sug), nervous CRIPT, *Arabidopsis*

講演番号：3D23p19
講演日時、会場：3 月 28 日 17:48～ D 校舎 23 会場

食虫植物 S-like リボヌクレアーゼの構造と機能

S-like ribonucleases of carnivorous plants: structural and functional characteristics

○荒井 直樹[1]、西村 恵美[1]、寿命 伸哉[1]、劉 天暉[2]、大山 隆[1,2] ([1]早大院・先進理工、[2]早大・教育・総合科学・生物)

○Naoki ARAI[1], Emi NISHIMURA[1], Shinya JUMYO[1], Tianhui LIU[2], Takashi OHYAMA[1,2] ([1]Grad. Sch. of Adv. Sci. and Eng., Waseda Univ., [2]Dept. Biol., Fac. of Educ. and Integrated Arts and Sci., Waseda Univ.)

S-like リボヌクレアーゼ（RNase）は、通常、リン酸飢餓や老化、病原菌感染等のストレス下で初めて発現する、植物と藻類に固有の RNA 分解酵素である。これまでに我々は、食虫植物は通常の植物とは異なり、S-like RNase を食虫のための酵素として利用していることを報告していた（Nishimura *et al*., *Planta* 238, 955-967, 2013）。さらに最近、*Drosera adelae*（ツルギバモウセンゴケ）、*Dionaea muscipula*（ハエトリソウ）、*Cephalotus follicularis*（フクロユキノシタ）、*Aldrovanda vesiculosa*（ムジナモ）、*Sarracenia leucophylla*（アミメヘイシソウ）、*Nepenthes bicalcarata*（ウツボカズラの一種）の 6 種の食虫植物の S-like RNase と食虫植物以外の植物（以下、非食虫植物と略す）の S-like RNase 13 種を対象として、アミノ酸配列に基づく系統解析を行ない、食虫植物の S-like RNase は、植物間の類縁関係とは無関係に 1 つのグループを形成することを明らかにした（Nishimura *et al*., *Planta* 240, 147-159, 2014）。加えて、上記 19 種の植物のアミノ酸配列を比較すると、食虫植物の酵素だけにアミノ酸残基の共通性が高い部位が 10 箇所存在することと、その内の 4 箇所ではそれぞれ完全に同じアミノ酸残基が使用されていることが明らかになった。本研究では、食虫植物に保存されたアミノ酸残基の機能を明らかにするために、*D. adelae* の S-like RNase を用いて、当該部位に変異を導入した組換えタンパク質を作製し、酵素的性質を解析した。その結果、保存された 4 アミノ酸残基は酵素活性に重要な役割を果たしていることが判明した。本大会では、これらの研究結果について報告する。

carnivorous plants, S-like ribonucleases, *Drosera adelae*

講演番号：3D23p20
講演日時、会場：3 月 28 日 17:59～ D 校舎 23 会場

イネの転写因子 DPF によるジテルペン型ファイトアレキシン生合成遺伝子の転写制御機構の解析
Transcriptional regulation of biosynthesis genes of diterpenoid phytoalexins by a rice transcription factor DPF

○山村 千紘[1,2]、水谷 恵美[1,2]、福島 説子[1]、鎌倉 高志[2]、岡田 憲典[3]、山根 久和[4]、高辻 博志[1]、森 昌樹[1]([1]生物研、[2]東理大・理工、[3]東大・生物工学セ、[4]帝京大・バイオ)
○Chihiro YAMAMURA[1,2], Emi MIZUTANI[1,2], Setsuko FUKUSHIMA[1], Takashi KAMAKURA[2], Kazunori OKADA[3], Hisakazu YAMANE[4], Hiroshi TAKATSUJI[1], Masaki MORI[1] ([1]NIAS, [2]Fac. Science and Tech., Tokyo Univ. of Science, [3]Biotechnology Research Center, The Univ. of Tokyo, [4]Department of Biosciences, Teikyo Univ.)

【目的】我々は、イネのジテルペン型ファイトアレキシン（DP）生合成を制御する、bHLH 型転写因子 DPF(Diterpenoid Phytoalexin Factor)について、その遺伝子の発現がいもち病感染や塩化銅処理により誘導されること、過剰発現イネでは DP 生合成酵素遺伝子群の転写レベルが上昇するとともに、モミラクトン及びファイトカサンの蓄積量が増大することを報告している。また生合成遺伝子 CPS2 の上流 2kb 領域を用いた一過的転写活性化実験の結果、活性化に関わるシス配列は動物の bHLH 型転写因子の結合配列として知られている N-box であることを昨年度大会で報告した。一方でモミラクトンの生合成への関与が示唆されている CYP99A2 の転写活性化には N-box 以外のシス配列も関わると考えられた。本年度は CYP99A2 の上流領域の解析結果の詳細について報告する。併せて DPF のノックダウン(KD)イネを用いて DPF の役割を詳細に解析した。

【方法・結果】

イネ葉鞘での一過的発現系を用いた転写活性化実験において、段階的に欠失した CYP99A2 の上流領域を連結したルシフェラーゼ・レポーター遺伝子を DPF が活性化するかどうかを調べたところ、活性化レベルは段階的に減少した。よって、CYP99A2 の上流領域の場合は N-box を含む複数のシス配列の集積により転写活性化が行われていると考えられた。DPF の発現をリアルタイム PCR により播種後 10 日目の根と葉で比較したところ、根において葉の 300 倍近く高発現していた。RNAi 法により作製した DPF-KD イネでは、播種後 10 日目の根において DPF の発現量が半減していることを確認した。DPF-KD 系統では WT と比較して、DP 生合成遺伝子 12 種の発現量も全て低下しており、DP の根や籾での蓄積量も激減していた。これらのことから、DPF は DP 生合成遺伝子 12 種全ての転写を制御していることが示された。またいもち病菌の感染や塩化銅処理による DP の蓄積に加え、根や籾における DP の蓄積も DPF を介していると考えられた。

phytoalexin, rice, transcription factor

講演番号：3D25a01
講演日時、会場：3 月 28 日 09:00～ D 校舎 25 会場

モモの果皮着色に関わる MYB 転写因子

A MYB transcription factor involved in coloration of fruit skin in peach

○小田 賢司[1]、田村 隆行[2]、日原 誠介[2] ([1]岡山生物研、[2]岡山県農総センター農業研)
○Kenji Oda[1], Takayuki Tamura[2], Seisuke Hihara[2] ([1]RIBS Okayama, [2]Res Inst for Agric, Okayama)

果実の果皮色は、消費者の購買意欲を左右する重要な農業形質である。モモの果皮は、アントシアニンが蓄積して赤く着色する。しかし、中には全く赤くならない品種や、着色が弱い品種も少なからず存在している。この違いがどのような遺伝的差異に起因するのか、これまで明らかにされていない。興味深いことに、果皮が着色しない「華清水」品種も、花弁は若干薄いながらもアントシアニンにより着色する。このことは、「華清水」もアントシアニン合成系は正常に保有しており、果皮が着色しないのは制御系の異常によるのではないかと推察された。アントシアニン合成は転写レベルで制御されることが様々な植物で知られているが、実際、非着色品種の合成酵素遺伝子の発現量を調べると、いずれの遺伝子もあまり発現していなかった。これまでに、リンゴやブドウの果皮着色の有無は MYB 転写因子の変異により生じることが知られている。そこで、リンゴの果皮着色に関わる MYB 遺伝子の相同遺伝子をモモゲノム中より探索したところ、3 つの候補遺伝子が得られた。発現解析により、モモの果皮で転写されているのはそのうちの一つ（*MYB10.1*）であることが明らかとなった。この遺伝子の構造を着色品種の「白鳳」と非着色品種の「華清水」で比較したところ、構造領域には 4 か所の変異しかないものの、それ以外の領域には多くの変異があり、特にプロモーター領域には大きな構造変化が認められた。着色品種の遺伝子（*MYB10.1-1*）と非着色品種の遺伝子（*MYB10.1-2*）で発現量を比較したところ、後者の発現は低く抑制されていた。「華清水」の果皮では、*MYB10.1-2* が発現しないためにアントシアニン合成酵素遺伝子が誘導されず、その結果、着色しないのではないかと考えられる。*MYB10.1-1* と *MYB10.1-2* をヘテロに持つ「清水白桃」品種の解析から、低発現の原因は *MYB10.1-2* 自身にあると推察された。そこで、24 の栽培品種について、*MYB10.1* の遺伝子型と果皮色の関係を調査した。「華清水」を含む非着色品種はいずれも非発現型の *MYB10.1-2* をホモに持ち、「白鳳」を含む着色品種はいずれも発現型の *MYB10.1-1* をホモに持っていた。また、「清水白桃」を含む着色が弱い品種は、*MYB10.1-1* と *MYB10.1-2* をヘテロに持つものと、*MYB10.1-1* をホモに持つものがあった。以上のように、*MYB10.1* の遺伝子型と果皮色に強い相関があり、*MYB10.1* が果皮色の決定の主要因子であることが示唆された。育種用に栽培されている 178 本の交配樹について、同様の調査を行ったところ、やはり *MYB10.1* の遺伝子型と果皮色に相関が認められた。しかし、*MYB10.1-1* をホモに持つ品種の中には着色が弱いものも相当数含まれ、着色程度の決定には *MYB10.1* 以外の因子も関わる可能性が考えられる。

peach, anthocyanin, MYB transcription factor

講演番号：3D25a02
講演日時、会場：3 月 28 日 09:11～ D 校舎 25 会場

キュウリ （*Cucumis sativus*）におけるフラボノイド *C*-配糖化酵素遺伝子の探索と解析

Isolation and analysis of a flavonoid *C*-glycosyltransferase gene in cucumber (*Cucumis sativus*)

○藤本 俊介、伊藤 崇充、下坂 誠、田口 悟朗 (信州大学)
○Shunsuke FUJIMOTO, Takamitsu ITO, Makoto SHIMOSAKA, Goro TAGUCHI (Shinshu Univ.)

【背景】

フラボノイドは紫外線や害虫などから植物体を防御する物質として重要な役割を果たすと考えられている。一般に、フラボノイドは *O*-配糖体として植物中に蓄積されるが、糖のアノマー炭素がフラボノイドの炭素原子と直接結合した *C*-配糖体も報告されている。*C*-配糖体は、その結合様式のため酸やグリコシダーゼによる加水分解に対して安定であり、抗酸化作用などの健康増進機能を持つ有用な物質である。これまでに *O*-配糖化酵素遺伝子は様々な植物から報告されているが、*C*-配糖化酵素 (CGT) 遺伝子はイネ、トウモロコシおよびソバから報告されたのみであり、その知見が不足している。

本研究では、フィトアレキシンとしてフラボノイド *C*-配糖体を蓄積することが報告されているキュウリから *C*-配糖化酵素候補遺伝子を単離し、その機能解析を行うことを目的とした。

【方法】

NCBI のデータベースに対し、本研究室で単離したソバの *C*-配糖化酵素（FeCGTa）のアミノ酸配列を用いて相同性検索を行ってキュウリの *C*-配糖化酵素候補遺伝子を探索した。キュウリ葉由来の cDNA に対して PCR を行って候補遺伝子（*CusCGT*）を獲得し、pET28a に導入して大腸菌で異種宿主発現させた。得られた組換え酵素を用い、種々のフラボノイド関連基質に対する酵素反応性を検証した。

【結果および考察】

CusCGT の推定アミノ酸配列は、既知の CGT と 36～44%のアミノ酸同一性を示した。組換え CusCGT 酵素は、CGT の基質である 2-ヒドロキシフラバノン類や、それら基質と構造が類似した化合物に対して *C*-配糖化活性を示し、ソバ CGT と同様に、特に 2-ヒドロキシフラバノン類への活性が高かった。

現在、キュウリ植物体への病原菌感染実験を行っており、その結果とあわせて報告したい。

Flavonoid, Glycosyltransferase, Cucumber (*Cucumis sativus*)

講演番号：3D25a03
講演日時、会場：3 月 28 日 09:22～ D 校舎 25 会場

ウンシュウミカン果皮におけるヘスペリジン結晶の細胞内検出および同定
In situ detection and identification of hesperidin crystals in Satsuma mandarin (*Citrus unshiu*) peel cells
○井上 剛史[1]、吉永 新[1]、高部 圭司[1]、吉岡 照高[2]、小川 一紀[2]、坂本 正弘[1]、東 順一[3]、本田 与一[1] ([1]京都大院農、[2]果樹研、[3]大阪大院工)
○Tsuyoshi INOUE[1], Arata YOSHINAGA[1], Keiji TAKABE[1], Terutaka YOSHIOKA[2], Kazunori OGAWA[2], Masahiro SAKAMOTO[1], Jun-ichi AZUMA[3], Yoichi HONDA[1] ([1]Kyoto Univ., [2]NIFTS, [3]Osaka Univ.)

ヘスペリジンはウンシュウミカン(*Citrus unshiu*)の果皮に特に蓄積が確認される様々な薬理作用および生理活性を有するフラボノイドの一種である。組織化学的研究により、その蓄積形態の特徴としてミカン科やセリ科植物細胞内においてヘスペリジンが結晶化して存在することは示唆されてきたが、その細胞内検出および同定はこれまで行われていない。我々は、ウンシュウミカン果皮にて確認された結晶を構成する化学成分の検出および同定を目的として実験を行った。

果皮切片を作成し、顕微鏡により結晶の分布と形態観察を行うと共に、顕微ラマン分光法を用いて、結晶成分の同定を試みた。その結果、結晶は未成熟果皮切片の維管束組織周辺、フラベド（外果皮）とアルベド（内果皮）の境界領域、そして表皮細胞直下に特に分布が確認された。また、SEM による形態観察から、針状結晶が凝集し球状形態を作り多数存在することが分かった。これらの細胞内結晶から得られたラマンスペクトルは、ヘスペリジン標品と一致し、その主要構成成分がヘスペリジンであることを示した。

我々は、顕微ラマン分光法を用いた細胞内ヘスペリジン結晶の同定を初めて報告する。

Citrus unshiu, hesperidin, Raman microscopy

講演番号：3D25a04
講演日時、会場：3 月 28 日 09:33～ D 校舎 25 会場

ゼニゴケのリコペン生合成遺伝子群の単離と機能解析
Functional analysis of the lycopene biosynthesis genes in the liverwort
○竹村 美保[1]、眞岡 孝至[1,2]、三沢 典彦[1] ([1]石川県大、[2]生産開発研)
○Miho TAKEMURA[1], Takashi MAOKA[1,2], Norihiko MISAWA[1] ([1]Ishikawa Pref. Univ., [2]Inst. Prod. Dev.)

カロテノイドは炭素数 40 の基本骨格を持つ天然色素で、植物や細菌などによって作られている。自然界からは 750 種以上のカロテノイドが単離されており、一般的によく知られているものとしては、リコペンやβカロテンなどがある。カロテノイドの多くは、ヒトに対する様々な生理活性を有するため、健康食品などとして注目を集めている。そのため、様々な生物からのカロテノイドの単離や生合成経路の解明がなされてきた。

高等植物のカロテノイド合成経路はよく研究されていて、それに関与する遺伝子も多数単離・解析されている。一方、コケ植物のカロテノイド合成経路についての研究は進んでいない。本研究では、コケ植物のカロテノイド合成経路を解明し、植物のカロテノイド生合成系の進化について考察することを目的としている。そのために、基部陸上植物と言われているゼニゴケのカロテノイド合成系遺伝子の単離と機能解析を行った。

カロテノイド生合成経路の中の Phytoene から lycopene への反応には、不飽和化と異性化が必要である。カロテノイド産生細菌はこの不飽和化と異性化を一つの酵素 CrtI が触媒する。一方、高等植物やシアノバクテリアでは、2 つの不飽和化酵素(PDS, Phytoene desaturase と ZDS, ζ-carotene desaturase)と 2 つの異性化酵素(Z-ISO, 15-cis-ζ-carotene isomerase と CRTISO, carotenoid isomerase)が触媒する。

本研究においては、ゼニゴケの cDNA/EST およびゲノム配列から *PDS*, *ZDS*, *Z-ISO*, *CRTISO* に相同な遺伝子を 1 つずつ見つけ、それぞれ *MpPDS*, *MpZDS*, *MpZ-ISO*, *MpCRTISO* と命名した。次に、これらの遺伝子を、細菌由来の *crtE* (Geranylgeranyl pyrophosphate synthase)および *crtB* (Phytoene synthase)遺伝子を発現し phytoene を生産する大腸菌に導入・発現させた。4 つ全ての遺伝子を発現させた場合、phytoene から lycopene が生産された。このことから、これら 4 つの遺伝子がゼニゴケにおいても phytoene から lycopene を生合成するのに働いていることが示唆された。また、*MpZ-ISO* が存在せず、*MpPDS*, *MpZDS*, *MpCRTISO* の 3 つのみが存在する場合でも、lycopene がわずかではあるが生産された。このことは、MpZ-ISO が触媒する異性化反応が、酵素がなくても起こりうることを示唆している。

現在、各反応段階の中間産物の同定を行っており、phytoene から lycopene への詳細な合成経路について報告する。

Marchantia polymorpha, carotene isomerase, carotene desaturase

講演番号：3D25a05
講演日時、会場：3 月 28 日 09:44～ D 校舎 25 会場

ハマナスの香気放散機構について

Mechanism of release of phenyl ethyl alcohol from the petal of Rosa rugosa

○野中 なつみ、松原 創、中澤 洋三、妙田 貴生、藤森 嶺、西澤 信、戸枝 一喜（東京農業大学大学院）
○ Natsumi NONAKA, hazime MATSUBARA, yozo NAKAZAWA, takao MYODA, takane FUZIMORI, makoto NISHIZAWA, kazuki TOEDA (Tokyo university of agriculture)

ハマナス(*Rosa rugosa*)は北海道に多く自生するバラ科の植物である。海岸の砂地に多く群生するハマナスは、耐寒、耐塩性に優れ、枝先に深紫紅色をした花弁をいくつか付ける。マイルドで暖かい甘さを持ったダマスク特有の香りにローズリーフのグリーン、クローブ様のやや強いスパーシーな香りが加わった香りを放つ。その香りからオホーツク地域ではかつて香料を得るために香料作物として栽培されていた。しかし品質のばらつきやコスト面の問題から、現在天然香料の量産がされていない。従って北海道の有用な香料資源として産業利用の推進を計るため、香気生成機構に関する詳細な研究を行う必要がある。そこで本研究では、香気放散に関する花弁中の主要香気、phenylethyl alcohol(PEA)の前駆体である配糖体蓄積量及び β-glucosidase 遺伝子の発現を解析した。

【実験方法】

2014 年 7~9 月に東京農業大学オホーツクキャンパス内にて採取したハマナス花弁を用いた。なお配糖体蓄積量及び β-glucosidase 遺伝子の定量には、開花段階を 7 段階に分け-80℃で保管したサンプルを用いた。香気採取は Dynamic Head-space 法を用いてハマナス 1 花弁の香気を 1 時間ごとに Tenax-TA に捕集し、GC-MS にて分析した。配糖体蓄積量はハマナス 1 花弁から配糖体を抽出し非酵素的加水分解後、内部標準法を用いて PEA の定量を行った。PEA 配糖体の加水分解活性測定は花弁より調製した粗酵素液を用いた。β-glucosidase 遺伝子の定量にはサンプルから合成した cDNA を使用した。

【結果および考察】

香気放散推移と配糖体蓄積量を比較した結果、つぼみの段階で蓄積された配糖体が開花と共に加水分解され放散されることが明らかになった。PEA 配糖体の結合糖を解明するために酵素標品を用いて配糖体を加水分解したところ、PEA 配糖体は β-glucoside が主であることが明らかになった。また、花弁中の PEA 配糖体加水分解活性を調べた結果、β-glucosidase 活性が認められた。花弁中の β-glucosidase 活性は開花直後から満開にかけて認められ、β-glucosidase 遺伝子の発現量と相関性があることが認められた。香気放散量も開花直後から増加することから、β-glucosidase 遺伝子の発現量と酵素活性は相関すること示唆された。

Rosa rugosa, release, Mechanism

講演番号：3D25a06
講演日時、会場：3 月 28 日 10:05～ D 校舎 25 会場

Scopoletin 生合成に関わる *Populus trichocarpa* 遺伝子の機能解析
Cloning and functional analysis of genes encoding *ortho*-hydroxylases involved in scopoletin biosynthesis in *Populus trichocarpa*.
○稲葉 暁佳里、清水 文一（東洋大院生命）
○Akari Inaba, Bun-ichi Shimizu (Toyo Univ.)

【背景】

クマリン化合物は、植物の二次代謝産物で植物の生体防御に関わっている。クマリン化合物の一つである scopoletin は Arabidopsis で蓄積が見られる。その生合成の鍵段階である feruloyl CoA の 6’(オルト)位水酸化は 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase (2OGD)ファミリーに属する酵素（AtF6’H1)によって進行することが知られている。AtF6’H1 の基質である feruloyl CoA は木質を形成する lignin 生合成中間体の一つでフェニルプロパノイド経路から lignin へクマリン骨格形成の分岐点に存在している。

一方、クマリン化合物生合成に関わるオルト位水酸化酵素は Arabidopsis の他に数種の植物からクローニングされているが、lignin を中心とした木質を多く含む木本でのクローニング例は報告されていない。

Populus trichocarpa は全ゲノム DNA 配列が解読されている木本植物で、scopoletin を蓄積する。また成長が早くパルプの原料として工業的に利用される。

本研究では、*P. trichocarpa* におけるクマリン化合物生合成鍵酵素のクローニングを目的とした。

【結果】

tBLASTx で *AtF6’H1* に高い類似性を示すタンパク質をコードする配列を *P. trichocarpa* のゲノム DNA に見出した。これらのうち最も高い相同性（60-62%)を示した 3 つの配列をそれぞれ、*PtC2H1, 2* および *3* とした。これらの配列はそれぞれ 1 つのイントロンをもち、エキソンは 2OGD をコードしていた。一方、*P. trichocarpa* 組織のメタノール抽出物の HPLC 分析を行ったところ、scopoletin を検出した。

そこで、*P. trichocarpa* から抽出したゲノム DNA を鋳型に PCR 反応を行い、*PtC2H1, 2* および *3* 配列の増幅を行った。得られた PCR 産物にあるイントロンをデザインしたプライマーを用いた PCR 反応により除去し、目的配列のコード領域を取得した。これらを大腸菌にてタンパク質として発現させ組換え酵素の活性測定を行った。

Populus trichocarpa, *Ortho*-hydroxylases, Scopoletin

講演番号：3D25a07
講演日時、会場：3 月 28 日 10:16～ D 校舎 25 会場

点変異導入によるサツマイモ桂皮酸オルト位水酸化酵素の基質認識アミノ酸残基の探索―C 末端領域の検討

Exploration of substrate recognition mechanism of the *ortho*-hydroxylases from sweet potato by point mutational analysis

○阿部 秀俊[1]、大河原 眞平[1]、永野 真吾[2]、水谷 正治[3]、清水 文一[1]（[1]東洋大生命、[2]鳥取大工、[3]神戸大農）
○Hidetoshi Abe[1], Sinpei Okawara[1], Shingo Nagano[2], Masaharu Mizutani[3], Bun-ichi Shimizu[1]
([1]Toyo Univ., [2]Tottori Univ., [3]Kobe Univ.)

【目的】

サツマイモ組織にはクマリン化合物である umbelliferone と scopoletin が蓄積する。これらのクマリン化合物はそれぞれ *p*-coumaroyl-CoA と feruloyl-CoA を基質として、これらのベンゼン環のオルト位水酸化、シス-トランス異性化、ラクトン化を経て生合成される。オルト位水酸化は不可逆反応でクマリン骨格形成の鍵段階であると考えられる。サツマイモの根には 2 つのオルト位水酸化酵素が同定されている（Ib1, Ib2）。Ib1 は feruloyl-CoA のみを基質とするのに対して、Ib2 は feruloyl-CoA だけでなく *p*-coumaroyl-CoA も基質とする。Feruloyl-CoA と *p*-coumaroyl-CoA の構造上の異なる点はベンゼン環 3’位のメトキシ基で、Ib1 と Ib2 はそれぞれ基質特異性に明確な違いがみられる。われわれのグループは C 末端領域の約 40 アミノ酸残基が基質認識に重要であることを示した（2013 年農芸化学会大会発表）が、これらの酵素の基質認識メカニズムの詳細は解明されていない。

Ib1 および Ib2 と同じ 2-オキソグルタル酸依存性ジオキシゲナーゼファミリーに属し、基質認識部位が予測されるシロイヌナズナ由来のアントシアニジンシンターゼを参考にすることで、Ib1 と Ib2 の基質認識に関わるアミノ酸残基の候補を選んだところ、130 番目チロシンから約 20 アミノ酸残基と 220 番目プロリンから約 20 アミノ酸残基からなる領域が基質認識に関わっていると推定された。

本研究では、Ib1 における基質認識に関わっていると推定される候補アミノ酸残基を Ib2 のアミノ酸配列に入れ換えたものおよびアラニンに入れ替えた組換え酵素をそれぞれ作成し、その酵素活性を測定し、基質認識に関わるアミノ酸残基を検討した。

【結果】

Ib1 の C-末端領域にある 338 番目バリンをアラニンに変換した組換え酵素（Ib1-V338A）と 342 番目フェニルアラニンをアラニンに変換した組換え酵素（Ib1-F342A）は、feruloyl-CoA を基質とした時、野生株に比べて著しく活性が低下した。このことから Ib1 における 338 番目バリンと 342 番目フェニルアラニンは feruloyl-CoA に対する基質認識に関わっていることが示唆された。

これらの他の候補アミノ酸残基についても点変異を導入した組換え酵素の活性について報告する。

Coumarin biosynthesis, *Ortho*-hydroxylation, Substrate specificity

講演番号：3D25a08
講演日時、会場：3 月 28 日 10:27～ D 校舎 25 会場

ラクトン形成を触媒するカルボキシルエステラーゼ（1）：チューリップ花粉からのチューリッポシド B 変換酵素の精製および性状解析

Lactone-forming carboxylesterase (1): Purification and characterization of tuliposide B-converting enzyme from the pollen of tulip

野村 泰治、村瀬 達紀、荻田 信二郎、○加藤 康夫（富山県大・生工研セ）
Taiji NOMURA, Tatsunori MURASE, Shinjiro OGITA, ○Yasuo KATO (Biotechnol. Res. Center, Toyama Pref. Univ.)

【目的】チューリップ組織中にはグルコースエステルであるチューリッポシド（Pos）類（PosA、PosB）が二次代謝産物として著量含まれており、これらはチューリップ組織内在の PosA 変換酵素（tuliposide A-converting enzyme; TCEA）および PosB 変換酵素（TCEB）によって、アグリコンのラクトン化体であるチューリッパリン（Pa）A および PaB へとそれぞれ変換される。Pa 類は抗菌、殺虫等の活性を示すことから、この変換反応はチューリップの化学防御において重要な役割を担っていると考えられる。これまでの TCEA の精製と酵素遺伝子（*TgTCEA1*）の同定の結果、TCEA は分子内エステル転移によるラクトン形成反応のみを触媒するユニークなカルボキシルエステラーゼであることが分かっている。今回、我々は Pos－Pa 酵素変換系の全体像の解明を目的として、TCEB の同定と機能解析を行った。本発表では、TCEB の精製と酵素学的諸性質について報告する。
【方法と結果】チューリップ組織のうち比較的高い TCEB 活性がみられる雄しべに注目し、その構成部位別に酵素活性の局在を調べたところ、雄しべでみられる TCEB 活性の大半は、葯に付着している花粉に由来することが分かった。そこで、開花期の雄しべ 1 kg から回収した花粉を破砕後得た粗酵素液より、各種カラムクロマトグラフィーを経て、TCEB の isoform 3 種を均一に精製した。いずれの isoform も SDS-PAGE 上で 47 kDa のバンドを与え、一方、ゲルろ過分析によって isoform 1、2 および 3 の native 分子質量はそれぞれ 99、92 および 93 kDa と見積もられた。この結果から、TCEB は先に同定された TCEA と同じく 2 量体酵素であることが分かったが、サブユニットおよび native 分子質量はいずれも TCEA とは異なっていた。精製酵素の至適温度は 30～40℃、至適 pH は 7.0～7.5、安定温度は 15～45/50℃、安定 pH は 4.5～10 であった。種々の添加剤が酵素活性に及ぼす影響を調べたところ、いずれの isoform の活性も PMSF によって著しく阻害され、isoform 間で若干の感受性の違いはあるものの、いくつかの金属イオンによっても強く阻害された。反応速度論解析の結果、いずれの isoform も PosB よりもむしろ PosA に対して低い K_m 値を示したが、V_{max} 値は PosB に対して著しく高く、PosB に対する反応効率（V_{max}/K_m）は PosA に対する値の 140～150 倍であった。以上の結果から、TCEB が TCEA とは逆に、PosB に対して高い選択性を有する酵素であることが確認された。また、本酵素はグルコースエステルである PosB やラクトンである PaB の加水分解反応は一切触媒せず、PosB から PaB への変換反応のみを触媒した。このことから、TCEB も TCEA と同様に分子内エステル転移によるラクトン形成反応のみを触媒するカルボキシルエステラーゼであることが強く示唆された。

lactone-forming carboxylesterase, tuliposide, tulipalin

講演番号：3D25a09
講演日時、会場：3 月 28 日 10:38～ D 校舎 25 会場

ラクトン形成を触媒するカルボキシルエステラーゼ（2）：チューリップ花粉からのチューリッポシド B 変換酵素遺伝子の単離および機能解析

Lactone-forming carboxylesterase (2): Molecular identification of tuliposide B-converting enzyme from the pollen of tulip

○野村 泰治、村瀬 達紀、荻田 信二郎、加藤 康夫（富山県大・生工研セ）
○Taiji NOMURA, Tatsunori MURASE, Shinjiro OGITA, Yasuo KATO (Biotechnol. Res. Center, Toyama Pref. Univ.)

【目的】チューリップ組織中にはグルコースエステルであるチューリッポシド（Pos）類（PosA、PosB）が二次代謝産物として著量含まれており、これらはチューリップ組織内在の PosA 変換酵素（tuliposide A-converting enzyme; TCEA）および PosB 変換酵素（TCEB）によって、アグリコンのラクトン化体であるチューリッパリン（Pa）A および PaB へとそれぞれ変換される。Pa 類は抗菌、殺虫等の活性を示すことから、この変換反応はチューリップの化学防御において重要な役割を担っていると考えられる。これまでの TCEA の精製と酵素遺伝子（*TgTCEA1*）の同定の結果、TCEA は分子内エステル転移によるラクトン形成反応のみを触媒するユニークなカルボキシルエステラーゼであることが分かっている。今回、我々は Pos－Pa 酵素変換系の全体像の解明を目的として、TCEB の同定と機能解析を行った。本発表では、TCEB 酵素遺伝子の単離と機能解析について報告する。
【方法と結果】チューリップの花粉から精製された TCEB isoform 3 種の部分アミノ酸配列解析の後、定法に従って、花粉 mRNA から新たに *TgTCEB1* cDNA を単離した。TgTCEB1 の一次配列は TgTCEA1 と約 50%の identity を有しており、TgTCEA1 と同様にカルボキシルエステラーゼファミリーに属することが明らかとなった。大腸菌で発現させた組換え TgTCEB1 酵素は天然型酵素と同様に PosB から PaB への変換反応のみを触媒し、PosB や PaB の加水分解反応は一切触媒しなかった。さらに、反応速度論解析の結果、TgTCEB1 酵素が天然型酵素と同様に PosA よりも PosB に対して高い反応効率を示すことが確認され、*TgTCEB1* 遺伝子が TCEB をコードしていることが示された。以上の結果より、PosA から PaA、PosB から PaB への酵素変換は、いずれも TCEA、TCEB というラクトン形成反応触媒型のカルボキシルエステラーゼによって触媒されることが明らかになった。チューリップ各組織における *TgTCEB1* 遺伝子の発現を調べたところ、TCEB 活性の局在と同様に花粉における発現レベルが高かったが、比較的高い TCEB 活性が検出される根や葉においてはほとんど発現がみられなかった。このことから、根や葉では *TgTCEB1* 遺伝子とは異なるアイソザイム遺伝子が発現している可能性が示唆された。TgTCEB1 の N 末端に存在する transit peptide と GFP の融合タンパク質のタマネギ表皮細胞における一過的発現によって、この transit peptide はプラスチド移行シグナルとして機能していることが示され、TCEB も TCEA と同様にプラスチドに局在していることが分かった。一方、Pos/Pa 類の局在性解析の結果、花粉において PosB は花粉内部ではなく表面に蓄積していたことから、TCEB によって触媒される PosB－PaB 酵素変換系による、チューリップ花粉のユニークな化学防御機構の存在が示唆された。

lactone-forming carboxylesterase, tuliposide, tulipalin

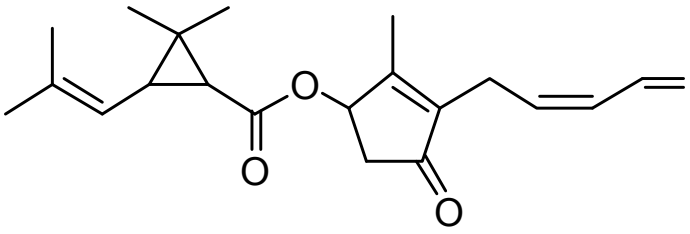
講演番号：3D25a10
講演日時、会場：3 月 28 日 10:49～ D 校舎 25 会場

ピレスリン生合成遺伝子の同定に向けた RNAseq データのバイオインフォマティックス解析

Bioinformatical analysis of RNAseq data for indentification of pyrethrin biosynthetic genes

○阪森 宏治[1]、小野 直亮[2]、鈴木 秀幸[3]、太田 大策[4]、松田 一彦[1]、金谷 重彦[2] ([1]近畿大院農、[2]奈良先端大・情報科学、[3](財)かずさ DNA 研、[4]大府大院生命環境)
○koji sakamori[1], naoaki ono[2], hideyuki suzuki[3], daisaku ohta[4], kazuhiko matsuda,[1], shigehiko kanaya[2] ([1]Kinki Univ., [2]NAIST, [3]Kazusa DNA Res.Inst., [4]Osaka Prefecture Univ.)

【目的】除虫菊 (*Tanacetum cinerariifolium*)は殺虫活性を示すエステル化合物ピレスリンを生合成する。これまでにピレスリンの酸部とアルコール部がそれぞれ非メバロン酸経路とオキシリピン経路によりつくられ、最後にそれらが GDSL リパーゼ TcGLIP によって連結されることでピレスリンが生合成されることが明らかにされている[1,2]。また、除虫菊が傷害時放出する香気成分がピレスリン生合成を促進することも見出されている[3]。



Pyrethrin I

今回われわれは、これらの知見を念頭に置いて RNA-Seq を行い、共発現解析によって未知の生合成関連遺伝子を同定しようと試みたので報告する。

【方法】組織別サンプルとして蕾、葉、葉柄および根を、分化状態の異なるサンプルとして脱分化前の葉部、葉部由来のカルスおよび再分化した植物体の葉部を用いた。さらに密封容器内で傷害誘導性の香気成分を一定時間処理した除虫菊幼苗の葉部をサンプルとして用いた。これらのサンプルについて RNA-Seq を行い、得られた FASTQ データから *de novo* アセンブルを行って contig を作成した。さらに NCBI, 及び KEGG のデータベースをもとに各遺伝子をアノーテーションした。発現頻度データは RPKM 値に変換し、独自に開発した代謝経路共発現解析法によって発現変動解析を行った。

【結果と考察】RNAseq により得られた全 2Gbp のリードデータをもとに、まず配列を Trinity[4] によりアセンブルし､およそ 42 万個の contig を得た｡これらの contig をフィルタリングしたのちにアノーテーションし、各サンプルのリードをマッピングすることによって発現頻度情報を求めた。さらに代謝経路の共発現情報をもとに、この代謝経路上で香気成分によって誘導される遺伝子を探索した。その結果、酸化酵素を中心とするピレスリン生合成遺伝子の候補を効率良く絞り込むことができた。

1. K. Matsuda, *Top. Curr. Chem*. **314**, 73-81 (2012).
2. Y. Kikuta *et al*., *Plant J*. **71**, 183-193 (2012).
3. Y. Kikuta *et al*., *Plant Cell Physiol*. **52**, 588-596 (2011).
4. M. G. Grabherr *et al*., *Nature Biotechnol.* **29**, 644–652 (2011).

pyrethrin, RNA-seq, Tanacetum cinerariifolium

講演番号：3D25a11
講演日時、会場：3 月 28 日 11:10～ D 校舎 25 会場

ドラフトゲノムデータを用いたハナビシソウアルカロイド生合成 P450 遺伝子の探索

Search for P450 genes involved in alkaloid biosynthesis in *Eschscholzia californica* based on the draft genome sequence

○堀 健太郎、山田 泰之、佐藤 文彦（京大院・生命）
○Kentaro Hori, Yasuyuki Yamada, Fumihiko Sato (Kyoto Univ.)

高等植物が産生するアルカロイドは強力な生理活性を示すことから、医薬品の原料として古くから利用されてきた。近年では、分子生物学の目覚ましい進展に伴い、植物体が持つアルカロイド生合成経路を遺伝子レベルで解明することが可能となってきている。

ケシ科植物が産生するベンゾフェナンスリジンアルカロイドの一つである sanguinarine については、これまでにケシ *Papaver somniferum* およびハナビシソウ *Eschscholzia californica* を用いた研究により、全ての生合成酵素遺伝子が単離・同定されている。しかしながら、chelirubine や macarpine については、sanguinarine から各 2 段階のシトクロム P450 ならびに *O*-メチル化酵素反応により合成されることが推測されているが、分子レベルでの詳細な解析はなされていない(Figure 1)。本発表では、我々が解読しているハナビシソウのドラフトゲノム配列情報に基づいて行っている未同定のアルカロイド生合成酵素遺伝子、特に新規 P450 遺伝子の探索について報告する。

ハナビシソウのゲノム配列については、新学術領域研究「ゲノム支援」により約 0.47Gb（15668 scaffold, N50;約 800kb)の配列情報を得た。この配列は、既に報告されている EST あるいは、RNA 配列情報の 95%以上を含むものであり、コーディング配列のほぼすべてを包含していると判断した。引き続き、既知のイソキノリンアルカロイド生合成酵素遺伝子の配列をもとに BLAST 検索を行ったところ、複数の生合成酵素遺伝子が比較的近傍に存在する scaffold があること、同種の酵素遺伝子（同一の P450 ファミリー、*O*-メチル化酵素など）が重複して分布する scaffold が存在することなどが明らかとなった。さらに、ゲノム配列情報をもとに、ハナビシソウにおける P450 遺伝子数を推定し、シロイヌナズナと比較したところ、イソキノリンアルカロイド生合成に関与することが明らかとなっている CYP80、CYP82、CYP719 ファミリーが多数存在することが分かった。これらの P450 のうち特に CYP82 ファミリーに着目し、macarpine 産生能の異なるハナビシソウ培養細胞株での発現を RT-PCR 解析した結果、macarpine の生合成に関与すると予測される候補遺伝子を複数見出すことができた。現在、酵母発現系を用いてこれら候補遺伝子の詳細な酵素活性を解析中である。

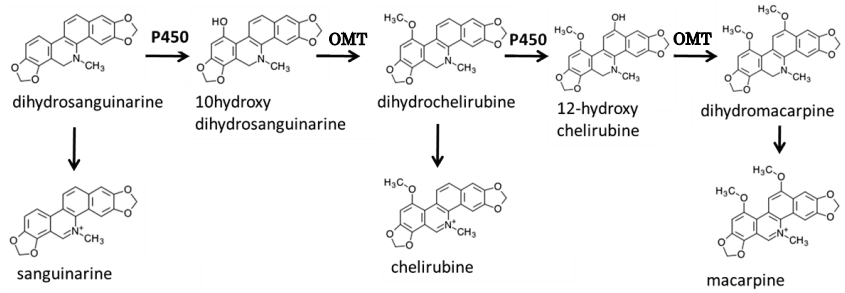


Figure 1　macarpine 生合成経路

isoquinoline alkaloid, cytochrome P450, plant genome

講演番号：3D25a12
講演日時、会場：3 月 28 日 11:21～ D 校舎 25 会場

ベルベリン生合成系の転写因子 CjWRKY1 の翻訳後制御機構の解析
Analysis of post-translational modification of CjWRKY1 in berberine biosynthesis
○山田 泰之、佐藤 文彦（京大院生命）
○Yasuyuki YAMADA, Fumihiko SATO (Kyoto Univ.)

【背景と目的】キンポウゲ科のオウレン（*Coptis japonica*)が生産するイソキノリンアルカロイド、ベルベリン生合成系では、生合成系の包括的発現制御因子として植物特異的 WRKY 型転写因子、CjWRKY1 が機能していることが明らかとなっている (1)。当研究室で生育、維持されているベルベリン高産生性オウレン培養細胞 156-S 株より単離したプロトプラストに *CjWRKY1* を過剰発現させると、ベルベリン生合成酵素遺伝子群の発現上昇が見られたことから CjWRKY1 は同生合成系の転写活性化因子として機能していると考えられた。一方、ベルベリン低生産性オウレン培養細胞 CjY 株では、*CjWRKY1* 過剰発現による生合成酵素遺伝子群の発現上昇が見られないなど、CjWRKY1 による生合成系の発現制御において何らかの転写・翻訳後制御機構が存在する可能性が示唆されていた。そこで、本研究では CjWRKY1 の相互作用因子の探索や修飾状態の解析を行うことで、ベルベリン生合成系の遺伝子発現に重要な CjWRKY1 の転写・翻訳後制御機構を解明することを目的とした。
【方法と結果】CjWRKY1 と GFP との融合タンパク質を 156-S 株プロトプラストに一過的に発現させ、抗 GFP アフィニティーカラムを用いて共免疫沈降を行い、得られた免疫沈降サンプルを LC-MS/MS 解析に供した。その結果、ベルベリン生合成系の遺伝子発現に関わる可能性のある発現制御因子の同定にはいたらなかったが、CjWRKY1 の 115 番目のチロシン残基がリン酸化されている可能性が示唆された。抗リン酸化チロシン抗体を用いたウェスタンブロット解析でも同様に、CjWRKY1 の 115 番目のチロシン残基のリン酸化が確認された。さらに、CjWRKY1 の 115 番目のチロシンをそれぞれグルタミン酸 (Y115E)、フェニルアラニン (Y115F)に置換したリン酸化、脱リン酸化模倣 CjWRKY1 を作成し、生合成酵素遺伝子 *CYP80B2* のプロモーターを含むレポーターと合わせて 156-S 株プロトプラストに共導入した一過的ルシフェラーゼ (LUC)レポーターアッセイを行った結果、Y115E 変異体で LUC の活性が著しく低下していた。一方、各変異型 CjWRKY1 の N 末端側に GAL4DNA 結合ドメインを付加し、レポーターは GAL4 標的配列を含むものに変え、同様にレポーターアッセイを行った場合、LUC の活性に変化は見られなかったこと、あるいは、CjWRKY1 の Y115E 変異体で明瞭な核局在性が失われていたことから、CjWRKY1 の 115 番目チロシン残基のリン酸化は CjWRKY1 自身が有する転写活性ではなく、CjWRKY1 の DNA への結合性や核への局在性に影響を及ぼしている可能性が明らかとなった。
1) Kato et al., *Plant and Cell Physiology*, (2007)

Isoquinoline alkaloid, WRKY, post-translational modification

講演番号：3D25a13
講演日時、会場：3 月 28 日 11:32～ D 校舎 25 会場

ムラサキにおけるシコニン代謝経路の解明に向けたプロテオーム解析
Proteome analysis toward comprehensive clarification of shikonin biosynthetic pathway in *Lithospermum erythrorhizon*

○中川 友喜美[1]、高梨 功次郎[1]、森坂 裕信[2]、油屋 駿介[2]、植田 充美[2]、矢崎 一史[1]([1]京都大 生存研、[2]京都大院 応用生命)
○Yukimi NAKAGAWA[1], Kojiro TAKANASHI[1], Hironobu MORISAKA[2], Shunsuke ABURAYA[2], Mitsuyoshi UEDA[2], Kazufumi YAZAKI[1] ([1]RISH, Kyoto Univ., [2]Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)

薬用植物のムラサキ（*Lithospermum erythrorhizon* Sieb. et Zucc.）は、日本、韓国、中国の山地に自生するムラサキ科の多年生草本であり、その根を乾燥させたものは『紫根』と呼ばれ、古くから生薬や紫根染めの染料として用いられている。根皮特異的に蓄積する赤色色素は、ナフトキノン系二次代謝産物のシコニン誘導体で、紫根の主たる薬効本体とされ、生理活性として抗菌作用、止血作用、抗腫瘍作用、抗炎症作用などが報告されている。シコニンの生合成は、暗黒下（地下部）でのみ行われ、光によって強く抑制されることを知られる。

シコニン生合成経路は、シキミ酸経路由来の *p*-hydroxybenzoic acid (PHB) とメバロン酸経路産物である geranyl diphosphate を重要前駆体とし、これらがカップリングした *m*-geranyl-*p*-hydroxybenzoic acid (GBA)を鍵中間体とする。この化合物が geranylhydroquinone に変換され、芳香環と側鎖のメチル基との間で炭素-炭素結合を形成することでナフトキノン環をもつ deoxyshikonin となり、さらに側鎖が酸化、アシル化されてシコニン誘導体となると推定されている。GBA までの前半のシコニン生合成反応に関与する酵素として、これまで光による調節酵素である HMG-CoA reductase や PHB geranyltransferase (LePGT) などの遺伝子がムラサキ培養細胞から単離されている。一方で、シコニン生合成経路後半のナフトキノン骨格形成についてはどのような酵素が関与し、どのような反応中間体を経ているのか全く明らかになっていない。

そこで本研究では、シコニン生合成経路の全容解明を目的として、シコニン生産誘導時、および非誘導時に発現しているタンパク質の比較プロテオーム解析を行った。本大会では、プロテオーム解析の結果と、そこから推測されるシコニン生合成経路について報告する。

Lithospermum erythrorhizon, Shikonin, Proteomics

講演番号：3D25a14
講演日時、会場：3 月 28 日 11:43～ D 校舎 25 会場

ムラサキのシコニン輸送・分泌に関与する遺伝子の RNA-seq 法による探索
Systematic survey of genes involved in shikonin secretion by RNA-seq analysis
○上撫 健太、高梨 功次郎、杉山 暁史、矢崎 一史（京都大学　生存圏研究所）
○kenta kaminade, Kojiro Takanashi, Akifumi Sugiyama, Kazufumi Yazaki (Research Institute for Sustainable Humanosphere, Kyoto University)

ムラサキ科の多年生草本であるムラサキ（*Lithospermum erythrorhizon* Sieb. et Zucc.）の根は「紫根」と呼ばれ、古来より染料として用いられているほか、抗炎症作用や殺菌作用を示すことから外用薬として処方される。紫根の薬効本体であるナフトキノン系二次代謝産物のシコニン誘導体は、ムラサキの根において最外層の細胞のみで生産され、大きく生長した根ではそのコルク層に多く蓄積する。シコニンの生合成研究は、色素高生産性ムラサキ培養細胞株 M18 と生産培地 M9 を用いて行われており、Cu^{2+}、methyl　jasmonate、酸性多糖等による生産促進、ならびに NH_4^+、2,4-D、及び光（特に青色光）による生産抑制が明らかにされた。さらに、光による調節酵素 PHB-geranyltransferase (LePGT) など、シコニン生合成に関与する複数の酵素遺伝子が単離されている。しかし、生合成経路の後半に関わる酵素や、シコニンの輸送・蓄積機構についてはほとんど未解明である。

本研究は、シコニン分泌及び蓄積機構の解明を目的としている。従前の化学固定法による電子顕微鏡観察において、シコニン生産時の細胞特異的に粗面小胞体に由来すると思われる膜小胞（vesicle）が観察されたことから、シコニンは細胞内膜系に内包され小胞輸送により細胞外に分泌されると考えられている。そこでシコニン分泌及び蓄積に関与する遺伝子の網羅的な探索を目的として、次世代シークエンサー HiSeq を用いて de novo RNA-seq 解析を行った。RNA はシコニンを生産するムラサキ根皮、暗黒下で培養した培養細胞および毛状根；それに対して色素非生産組織のムラサキ根芯、光照射下の培養細胞および毛状根から抽出したものを用いた。解析の結果、平均で約 7,500 万リードが得られ、シコニン生産によって発現が明確に上昇していた遺伝子の中には複数種の小胞輸送関連遺伝子が含まれていた。そのうち最も顕著なシコニン生産時特異性を示した遺伝子は、機能未知の *LeDI-2* 遺伝子であった。*LeDI-2* は培養細胞を用いた Northern 解析においてもシコニン蓄積パターンと同調した発現を示した。現在、LeDI-2 の細胞内局在性及び発現組織特異性の解析を行っている。

secondary metabolism, vesicle trafficking, herbal plant

講演番号：3D25a15
講演日時、会場：3 月 28 日 11:54～ D 校舎 25 会場

ムラサキ培養細胞におけるナフトキノン環形成機構の解明

Elucidation of the naphthoquinone ring formation mechanism in *Lithospermum erythrorhizon* cultured cells.

○塚原 美香[1]、富田 健吾[1]、矢崎 一史[2]、和田 昭盛[3]、山野 由美子[3]、柏田 祥策[1]、山本 浩文[1] ([1]東洋大生命、[2]京大生存圏研、[3]神戸薬大)
○Mika Thukahara[1], Kengo Tomita[1], Kazufumi Yazaki[2], Akimori Wada[3], Yumiko Yamano[3], Shosaku Kashiwada[1], Hirobumi Yamamoto[1] ([1]Toyo Univ., [2]Kyoto Univ., [3]Kobe Pharm. Univ.)

【研究目的】

ナフトキノン系赤色色素であるシコニンは *p*-hydroxybenzoic acid (PHB) から geranylhydroquinone, 3"-hydroxy-geranylhydroquinone (GHQ-3"-OH) を経て生合成されるが、ナフトキノン環形成過程については不明である。これまでの研究で、GHQ-3"-OH をムラサキ(*Lithospermum erythrorhizon*) 培養細胞より抽出した粗酵素画分とインキュベートすると、3'-oxonerylhydroquinone (NHQ-3'-CHO)に変換されることを明らかにした。今回、NHQ-3'-CHO 以降のプレニル側鎖の酸化・閉環過程を明らかにすることを目的として、シコニン生合成促進因子である Cu^{2+}のシコニン生産に対する影響、および生合成中間体や酸化閉環酵素の探索を行った。

【実験方法及び結果】

Cu^{2+}のシコニン生産への影響

光は PHB のゲラニル化を阻害することによってシコニン生産を完全に阻害するが、Cu^{2+}が生合成のどの過程に関与しているかは不明である。そこで、M9 培地から Cu^{2+}を除いた培地でムラサキ培養細胞を培養したところ、シコニンは生産されず、エキノフランやシコノフランが生産された。しかし、Cu^{2+}を除いた培地で培養した細胞に Cu^{2+}を投与するとシコニンの生合成が誘導された。このことから、Cu^{2+}はナフトキノン環形成過程に重要な因子であることがわかった。

中間体の探索

M9 培地から Cu^{2+}を除いた培地で培養した細胞と M9 培地で培養した細胞を比較し、M9 培地で培養した細胞中にのみ含まれる極微量の化合物を検出した。この化合物がシコニン生合成に関係するかどうかについて、現在検討中である。

粗酵素画分の NHQ-3'-CHO 変換活性

改変 LS 培地、もしくは流動パラフィンを加えた M9 培地中で培養したムラサキ培養細胞から粗酵素を抽出し、1 mM NHQ-3'-CHO とインキュベートしたところ、deoxyshikonofuran の生成が確認されたが、シコニン生合成に関係すると思われる化合物は検出されなかった。Deoxyshikonofuran の生成は、非酵素的条件下でも検出された。

粗酵素画分の GHQ-3"-OH 変換活性

流動パラフィンを加えた M9 培地中で培養したムラサキ培養細胞から粗酵素を抽出し、1 mM GHQ-3"-OH とインキュベートしたところ、複数の化合物の生成が確認された。UV スペクトルから、これらの化合物はシコニン生合成に関係すると考えられた。

Lithospermum erythrorhizon, shikonin biosynthesis, shikonofuran

講演番号：3D25p01
講演日時、会場：3 月 28 日 14:00～ D 校舎 25 会場

TC, TN および C / N 比の調整による土壌中の硝化活性への影響
Effects of total carbon (TC), total nitrogen (TN), and C/N ratio on nitrification activity in soil
○ジン ショウミン、Dinesh Adhikari、向 真樹、荒木 希和子、久保 幹 (立命館大)
○Zhaomin Jin, Adhikari Dinesh, Masaki Mukai, Kiwako Araki, Motoki Kubo (Ritsumeikan Univ.)

[目的]
植物が成長するには窒素が必要不可欠である。そして動植物に含まれた窒素は、排泄物や死体から放出され、微生物による硝化作用によってアンモニア態窒素から硝酸態窒素へ変換され再び生物に利用される。従って農作物の質と量を向上させるには土壌中の硝化作用の活性化が最も重要な要素の一つである。これまで様々な環境の土壌の窒素循環率と土壌の総炭素量 (TC)、総窒素量 (TN)の関係を解析し、土壌の、TC、TN 値が一定量以上になると窒素循環が良くなることが明らかとなっている。しかし、肥料の添加によって TC、TN と C/N のバランスを調整することにより硝化活性がどのよう変化するかは明らかではない。本研究では、有機資材を用いて土壌中の TC と TN および C/N 比を調節することで、硝化作用の変化を調べ最も硝化作用が効率良く行われる条件を検討することを目的とした。
[方法と結果]
TC、TN 及び C/N が異なる三種類の有機資材（大豆ミール、鶏糞、稲わら）を TC：13,940、TN：364 の土壌に、TC-TN (mg/kg)がそれぞれ TC:20,000-TN:1,000、TC:20,000-TN: 2,000、TC:30,000 -TN:1,000 、TC:30,000-TN:2,000 、TC:30,000-TN:3,000、TC:40000-TN:2000、TC:40000-TN:3000 になるように添加することで 8 条件の土壌サンプルを作製した。一週間ごとにそれぞれの土壌総菌数と硝化活性の分析を行った。土壌中の総菌数は slow-stirring method から得られた eDNA より算出した。硝化活性は土壌静置法から測定した。
土壌の硝化活性と土壌総菌数の分析を行った結果、土壌の硝化活性は C/N により大きく影響されることが分かった。土壌の TC が高いと硝化活性は増加し、 TC が高い時に TN が高いほど総菌数が増加する傾向が見られた。TC:40000-TN:3000 の時に硝化活性が最も活発で、総菌数も高いことが明らかになった。
このことから、硝化活性が低い土壌について有機資材を用いて TC、TN を調整することで総菌数と硝化活性が高い水準に維持され、効率の良い窒素循環が行われることが示唆される。

nitrification activity, bacterial biomass, C/N ratio

講演番号：3D25p02
講演日時、会場：3 月 28 日 14:11～ D 校舎 25 会場

Analysis of chemical and biological properties of apple orchard soils with different productivity

○Dinesh ADHIKARI, Masaki MUKAI, Kiwako S. ARAKI, Takamitsu KAI, Motoki KUBO (Fac. Life Sci., Ritsumeikan Univ.)

[Background and purpose]

Apple (*Malus domestica* Borkh.) is cultivated in most of the temperate regions of the world including Japan. Soil fertility is one of the most important factors for apple production. To improve the productivity of apple, chemical and biological properties of orchard soils showing different productivity were analyzed and compared.

[Methods and results]

Two apple orchards with different productivity (orchard A: 30 t ha^{-1} and orchard B: 20 t ha^{-1}) located in Nagano Prefecture, Japan were selected in this study. Following biochemical properties were analyzed: Total carbon (TC), total nitrogen (TN), total phosphorus (TP), total potassium (TK), NH_4^+-N, NO_3^--N, soluble P, soluble K, bacterial biomass, nitrification activity, and P mineralization activity. TC, TN, and TP were about 2 times higher in orchard B soil, while TK, bacterial biomass, nitrification, and phosphorus mineralization activities were almost at same levels in both orchards. Soluble forms of N, P and K were also higher in orchard B, even though the same chemical fertilizer application. Data suggested that controlled application of chemical fertilizer could improve the apple productivity.

apple orchard soil, chemical properties, biological properties

講演番号：3D25p03
講演日時、会場：3 月 28 日 14:22～ D 校舎 25 会場

Analysis of organic phosphorus mineralization activity in relation to bacterial biomass in soil

○PONGPAPAT KANTALA, Masaki MUKAI, Kiwako S ARAKI, Dinesh ADHIKARI, Kubo MOTOKI (Fac. Life Sci., Ritsumeikan Univ.)

[Background and purpose]

Organic phosphorus (OP) constitutes a large proportion of the total phosphorus (TP) in many soils. To enhance the phosphorus (P) availability for the plants, previously, we analyzed the relationship between OP mineralization activity and bacterial biomass in the soil. Phosphorus mineralization activity was determined based on the rate of increase in the soluble P per unit addition of OP in the soil. However, a poor relationship ($R^2 = 0.024$) was observed, probably due to the fixation of mineralized P by iron, aluminum, and calcium present in the soil. In this study, we developed a new method to analyze OP mineralization activity and compared the activity with bacterial biomass.

[Methods and results]

Soil samples were collected from various agricultural fields in Japan. The OP mineralization activity was determined by analyzing rate of reduction of OP per unit addition of OP using phytic acid as a substrate. Total and inorganic P were analyzed by molybdenum blue method followed by extraction of soil sample by Kjeldahl digestion and NOH-EDTA methods, respectively. The OP was determined by subtracting inorganic P from total P. bacterial biomass was estimated by quantification of environmental DNA (eDNA) extracted by slow-stirring method. The P mineralization activity was increased in accordance with the bacterial biomass in soil, suggesting that P availability can be enhanced by controlling the soil properties suitable for bacterial growth.

phosphorus mineralization, organic phosphorus, soil bacterial biomass

講演番号：3D25p04
講演日時、会場：3 月 28 日 14:33～ D 校舎 25 会場

カドミウムによるイネ根のアポプラスチックバイパスフローの活性化
Acceleration of apoplastic bypass flow of rice roots by cadmium

○森 泉[1]、カルロス アリアス[1]、ソバハン ムハマド[2]、中村 宜督[2]、平井 儀彦[2]、村田 芳行[2] ([1]岡山大植物研、[2]岡山大農)
○Izumi MORI[1], Carlos R. Arias-Barreiro[1], Muhammad A. Sobahan[2], Yoshimasa Nakamura[2], Yoshihiko Hirai[2], Yoshiyuki Murata[2] ([1]Okayama Univ. IPSR, [2]Okayama Univ.)

【目的】イネの可食部へのカドミウム（Cd)の蓄積は衛生上深刻な問題である．これまでに，必須元素輸送体が，オフターゲットである Cd をイネ体内に取込むことが報告されている．

一方，イネは塩ストレス条件下において，シンプラストを経由せずアポプラスト経由で，根表皮から中心柱に水を輸送する，アポプラスチックバイパスフローが促進されることが知られている．また，アポプラスチックバイパスフローが塩ストレス下においてナトリウムイオン吸収の主な経路であることも知られている．

本研究では，（１）Cd ストレスがアポプラスチックバイパスフローを促進する，（２）Cd 吸収にアポプラスチックフローが関与する，という２つの仮説を検証することを目的とした．

【方法】イネを 21 日間，水耕栽培し，水耕栽培液に Cd を添加した際のアポプラスチックバイパスフロー速度を 8-ヒドロキシ-1,3,6-ピレン三スルホン酸ナトリウム塩を用いて見積もった．また，地上部の Cd 含量は ICP-MS により定量した．カスパリー線および死細胞はそれぞれバーベリン・アニリンブルー染色およびエバンスブルー染色で可視化し，観察した．

【結果と考察】アポプラスチックバイパスフローは 50 μM 以上の非常に高濃度の Cd によって有意に促進された．この濃度の Cd ではイネの生育阻害が見られた．この生育ステージのイネの根には顕著なカスパリー線の形成は見られず，Cd によるアポプラスチックバイパスフローの促進はカスパリー線の崩壊によるものではないことが示された．一方，根の先端部の細胞が Cd により死ぬことがエバンスブルー染色により明らかとなった．アポプラスチックバイパスフローを阻害する，プロリンとポリエチレングリコールを作用させると，アポプラスチックフロー促進および地上部への Cd 輸送が阻害された．

以上の結果は非常に高濃度の Cd ストレスにより根端細胞が死ぬことで，アポプラスチックフローが促進されること，またアポプラスチックフローが Cd の中心柱への輸送に関連することを示唆した．

cadmium, apoplastic bypass flow, rice

講演番号：3D25p05
講演日時、会場：3 月 28 日 14:44～ D 校舎 25 会場

アカバセンニチコウ葉肉細胞でのベタレイン退色現象の観察とそのメカニズム解明の試み

Observation of betalain pigment discoloration in mesophyll cells of *Alternanthera dentate*, and further examination of its mechanism.

○羽馬 大輔、大井 辰哉、橋床 泰之（北大院農）
○Daisuke HABA, Tatsuya OI, Yasuyuki HASHIDOKO (Hokkaido Univ.)

研究背景）ベタレインは、植物では中心子目（ヒユ科、サボテン科等）のみに局在している水溶性含窒素植物色素である。これら中心子目植物には砂漠などの乾燥地帯や塩類集積地に生育できるものが多く存在するため、ベタレインは植物が環境ストレスに対処するために必要な機能性を備えていると考えられている。例えば、アカビートの赤色色素として知られるベタニンは *in vitro* でアントシアニンと同等かそれ以上の活性酸素消去能を示すことが報告されており、細胞内酸化ストレスに対する防御物質としての機能が示唆されている。しかしながら植物細胞では，ベタニンはほぼ全てが液胞内に隔離された状態で貯蔵されており、細胞内でこの抗酸化物質がどのように機能するかについてはほとんど分かっていない。本研究では、アカバセンニチコウ（*Alternanthera dentata*）（ヒユ科）の葉身切片を用い、これを可視光下で検鏡したところ、一部の細胞で液胞内のベタレイン色素が急速に退色する現象を見いだした。そこで葉肉細胞プロトプラストを調製し，これを酸化ストレス下に置いてベタレインを含む液胞の挙動を蛍光顕微鏡で観察することで、ベタレイン含有植物における生体内防御メカニズムの解明を試みた。

方法）最も代表的な赤色ベタレイン色素であるベタニンを含むアカバセンニチコウ葉身切片を蛍光顕微鏡下で観察し、ベタレイン含有細胞とクロロプラストの局在位置の関係を調べた。また個々の葉肉細胞内でのベタレインおよび液胞の挙動を観察するため、プロトプラストを調製した。このプロトプラストを生体膜蛍光染色試薬 FM1-43 で染色し、これに UV 照射や、終濃度 0.1%過酸化水素処理、10 mM パラコート処理、低温処理（4℃，24 h，暗所）など各種酸化ストレスを与え、ベタニン色素の消失頻度と液胞の挙動を観察した。

結果および考察）ベタニン蓄積を示す赤色の液胞をもつ葉肉細胞由来プロトプラストでは、核周辺の限られた領域に全てのクロロプラストが凝集していた。低温処理と比較して、室温（25℃，24 h，暗所）で保持したプロトプラストではこの退色の進行が亢進し、およそ 60%に達した。FM1-43 蛍光染色による液胞膜の挙動観察から、退色直前の液胞はクロロフィルが局在する方向に膨張後、膨張部分の液胞膜から崩壊し始め、液胞内色素をサイトゾルに放出することがわかった。放出された色素はサイトゾル中で速やか(10 秒以内)に退色した。0.1%過酸化水素の外部からの添加では、クロロプラストを含む細胞での退色促進効果は認められなかったことから、液胞崩壊を伴うベタニン退色現象は高度に制御された細胞内生理現象であると推察された。

betalain pigment, *Alternanthera dentate*, vacuole collapse

講演番号：3D25p06
講演日時、会場：3 月 28 日 15:05～ D 校舎 25 会場

BiFC 法による植物クラスリン輸送経路のタンパク質選別機構の解析

Analysis of protein sorting mechanism in plant clathrin-mediated trafficking pathway by BiFC assay

○西村 浩二[1]、松波 絵里香[2]、石川 翔太[2]、地阪 光生[2]、長屋 敦[2]、横田 一成[2]、中川 強[1]([1]島根大・総科研センター、[2]島根大・生資)

○Kohji Nishimura[1], Erika Matsunami[2], Syouta Ishikawa[2], Mitsuo Jisaka[2], Tutomu Nagaya[2], Kazushige Yokota[2], Tuyoshi Nakagawa[1] ([1]Int. Cen. Sci. Res., Shimane Univ., [2]Fac. Life Env. Sci., Shimane Univ.)

クラスリン被覆小胞（CCV）は、真核生物におけるトランスゴルジ網（TGN）や細胞膜（PM）の膜タンパク質を種々のエンドソームに輸送する機能をもつ。CCV の被覆タンパク質はクラスリンとアダプタータンパク質 AP 複合体の二種類の被覆タンパク質からなる。AP 複合体はヘテロ四量体から構成され、そのサブユニットのμアダプチンは CCV で運ばれる積荷タンパク質を選抜することが広く知られている。AP 複合体には 5 つのサブタイプ（AP1 から AP5）があり、タンパク質の多様な輸送経路を担っている。植物では、動物と同様に AP1 が TGN からの液胞への輸送を、AP2 は PM からのエンドサイトーシスを担うことが報告されているが、積荷タンパク質の選別機構については十分に理解されていない。そこで、本研究ではシロイヌナズナのμアダプチンと積荷タンパク質との相互作用を二分子蛍光相補（Bimolecular fluorescence complementation, BiFC）法により解析した。BiFC 法では、蛍光タンパク質を２つに分断し、蛍光を持たない２つの断片を用意し、相互作用を調べたい２つのタンパク質分子にそれぞれの断片を標識させ、それら融合タンパク質を細胞内で発現させて、蛍光顕微鏡により蛍光の回復を調べる。その結果、蛍光が検出された場合は、相互作用に基づく蛍光の回復と判断して、タンパク質間相互作用の有無や強弱を調べることが可能である。本研究では、点変異を認識できる特異性の高い定量的な BiFC 法を構築し、植物のクラスリン小胞輸送経路の積荷タンパク質の選別機構を解析したので、その結果を報告したい。

BiFC, clathrin, plant

講演番号：3D25p07
講演日時、会場：3 月 28 日 15:16～ D 校舎 25 会場

植物における ALA 膜輸送体の探索と機能解析

Search and analysis of ALA membrane transporters in plants

○金丸 研吾[1]、小西 真帆[2]、寺下 和輝[2]、段 塵[1]、三宅 みちる[3]、野村 裕也[3]、齊藤 優[4]、藤本 尚則[4]、渡邊 繁幸[4]、宇野 知秀[1]、山形 裕士[1] ([1]神戸大院農、[2]神戸大農、[3]神戸大院自然科学、[4]コスモ石油中央研)

○ Kengo KANAMARU[1], Maho KONISHI[2], Kazuki TERASHITA[2], Chen DUAN[1], Michiru MIYAKE[3], Hironari NOMURA[3], Masaru SAITO[4], Takanori FUJIMOTO[4], Shigeyuki WATANABE[4], Tomohide UNO[1], Hiroshi YAMAGATA[1] ([1]Grad. School Agr. Sci., Kobe Univ., [2]Fac. Agr., Kobe Univ., [3]Grad. School Sci. &Tech., Kobe Univ., [4]COSMO OIL Co., Ltd.)

＜背景・目的＞

5-アミノレブリン酸 (ALA)はほぼ全ての生物が合成する一次代謝産物で，ヘム，シロヘム，ビタミン B12，クロロフィル等テトラピロール合成の必須基質である。これらの化合物は細胞内で呼吸鎖，解毒，(亜)硝酸・(亜)硫酸代謝，光合成など重要な生体反応の活性中心を担っている。そのため ALA 投与は動物では肝臓賦活，貧血改善，育毛促進等に効果があり，がん細胞への ALA 集積性を利用した光動態治療(PDT)も進んでいる。一方，植物への ALA 投与でもクロロフィル量増加，果色向上など多様な生理効果が認められ，収量増加，品質向上に役立つ肥料としてすでに上市されている。さらに ALA は与え方によって耐病性や環境ストレス耐性能を向上させることができるがその分子機構は不明であり，その解明は植物基礎科学の観点からも ALA の高度活用の観点からも意義が大きい。そこで本研究では，ALA の吸収と植物体内輸送に焦点をあて，膜輸送体の同定と機能解析を目的に研究を行った。

＜方法＞

ALA は様々な正の生理効果をもたらす反面，強光下で高濃度投与すると ROS 発生による生育障害（光傷害）が惹起される。そこで，我々は従来の知見等をもとに ALA 膜輸送体についてシロイヌナズナで 20 程度の候補遺伝子を選択し，それらの遺伝子欠損変異株を確立し，この生育障害に対する緩和効果を指標に一次スクリーニングを行った。絞り込んだ遺伝子の欠損株について，さらに複数の方法，条件で ALA を投与し細胞内 ALA 量の変化を経時的に測定した。また平行して，ALA 投与で発現誘導される遺伝子群の挙動をこれらの欠損株で解析した。

＜結果＞

スクリーニングの結果，少なくとも 3 つの遺伝子の欠損株で，発芽率とその後の生存率の両方において野生株と明らかな感受性の違いが観察された。また植物体内 ALA 量と遺伝子発現においても野生株と経時的変化の違いや応答性の違いが示唆された。これらの結果から植物体における膜を介した ALA 輸送の分子機構と器官間の ALA 転流の可能性について考察する。

trasnporter, ALA, Arabidopsis

講演番号：3D25p08
講演日時、会場：3 月 28 日 15:27～ D 校舎 25 会場

葉特異的な発現をするタバコ MATE 型トランスポーターNt-JAT2 の機能解析

Involvement of the leaf-specific MATE transporter Nt-JAT2 in vacuolar sequestration of nicotine in Nicotiana tabacum

○士反 伸和[1]、南 翔太[1]、森田 匡彦[2]、林田 南帆[1]、伊藤 慎悟[2]、高梨 功次郎[2]、杉山 暁史[2]、表 弘志[3]、森山 芳則[3]、グーセンス アラン[4]、守安 正恭[1]、矢崎 一史[2] ([1]神薬大生薬、[2]京大生存研、[3]岡山大薬、[4]ゲント大)
○Nobukazu Shitan[1], Shota Minami[1], Masahiko Morita[2], Minaho Hayashida[1], Shingo Ito[2], Kojiro Takanashi[2], Akifumi Sugiyama[2], Hiroshi Omote[3], Yoshinori Moriyama[3], Alain Goossens[4], Masataka Moriyasu[1], Kazufumi Yazaki[2] ([1]Kobe Pharm. Univ., [2]Kyoto Univ., [3]Okayama Univ., [4]Ghent Univ.)

【目的】植物は環境に適応するため、多様な二次代謝産物を生産する。それら代謝産物の中には、高い生理活性を有することから、医薬品などの原料として用いられるものも多く、その安定供給を目的に、生合成酵素などの研究が行われてきた。それら研究から新たに、最終産物やその生合成中間体が、植物の器官間や組織間、細胞内オルガネラ間をダイナミックに移動することが分かってきた。しかし、その移動を担う膜輸送体に関する知見は少ない。タバコ（*Nicotiana tabacum*）のニコチンアルカロイドは、根のみで生合成され、続いて道管を通って緑葉へ転流・蓄積される。ニコチンは昆虫に対し強い毒性を示すため、地上部への転流・蓄積が植物体の防御機構に重要な役割を果たしている。演者らはこの転流に関わる輸送体の探索を行い、MATE（multidrug and toxic compound extrusion）型の輸送体として、植物体全草で発現しニコチン輸送能を有する Nt-JAT1（jasmonate-inducible alkaloid transporter1）を同定、報告してきた。また、根のみで発現しニコチンを輸送する NtMATE1 も報告されている。しかし、ニコチンが根から葉へと転流される機構の全容には未だ不明な点が多く、本研究では、Nt-JAT1 と同じく、トランスクリプトーム解析からニコチン輸送体候補として単離された Nt-JAT2 について発現特性と機能解析を行った。
【方法、結果及び考察】 Nt-JAT2 は全長約 1.8 kb、507 アミノ酸をコードしており、Nt-JAT1 や NtMATE1 と同様に MATE 型の輸送体に属していた。そのアミノ酸相同性は、Nt-JAT1 と 32%、NtMATE1 とは 38%、一方、ブドウの VvAM1 などのアントシアニン輸送の MATE 型輸送体とは比較的に高い相同性（61%）を示した。本遺伝子は、各種ホルモンの中でも、ニコチン生産を誘導するジャスモン酸処理下にのみ強く発現誘導され、またその発現は葉に特異的であることが判明した。出芽酵母を用いた細胞輸送系の実験によりニコチン輸送能を検討した結果、Nt-JAT2 発現酵母におけるニコチン含量はコントロールよりも有意に低かった。本輸送体は、出芽酵母において細胞膜などに局在しており、ニコチンを細胞外に排出する、すなわちニコチンを輸送基質とすることが示唆された。同様に酵母の細胞輸送系を用いてその基質特異性を検討したところ、アナバシンやアナタビンなどのタバコアルカロイドも輸送すると考えられた。顕微鏡観察をしたところ、Nt-JAT2-GFP は植物細胞では液胞膜に局在していた。これら結果から、Nt-JAT2 は虫害時に植物体の葉で強く発現し、ニコチンを液胞内に輸送することで転流および植物体の防御に働くと推定している。

Alkaloid, Nicotine, MATE transporter

講演番号：3D25p09
講演日時、会場：3 月 28 日 15:38～ D 校舎 25 会場

葉緑体への蛋白質輸送における膜透過中間体の単離（I）―可溶性組換え前駆体蛋白質の作製

Isolation of the translocation intermediates formed during protein translocation into chloroplasts (I) – Preparation of recombinant precursor proteins in soluble state

○秋田 充、Pohare Manoj、三好 貴子（愛媛大農）
○Mitsuru AKITA, Manoi Pohare, Takako Miyoshi (Ehime Univ.)

われわれは、葉緑体への蛋白質輸送の全体像を理解するために、輸送途上における前駆体蛋白質と蛋白質輸送装置（トランスロコン）を構成する因子間の相互作用を解析する目的で、封入体として回収される組換え前駆体蛋白質を用いた葉緑体への蛋白質輸送実験系を開発（1, 2）した。この系を用いることで、蛋白質輸送初期段階において、エネルギー制限条件下において形成される初期膜透過中間体は、エネルギーに依存して異なる中間体が存在することを明らかにした（2, 3）。しかし、前駆体蛋白質が、ひとたび初期膜透過中間体から解放されると、膜透過を途中で停止させることができないため、膜透過が完了するまでの前駆体蛋白質とトランスロコン因子間の相互作用についての知見は乏しい。そこで、われわれは、前駆体蛋白質の一部がフォールドすることで引き起こされる立体障害を導入した前駆体蛋白質を用いることで、膜透過チャンネルが目詰まりした中間体を形成させることを考えた。そのための第一歩として、大腸菌で過剰発現しても可溶化状態が保たれるように、葉緑体移行シグナルにランダムコイルをとりやすいペプチドや可溶性蛋白質を連結した人工前駆体蛋白質を発現するプラスミドを種々作製した。本大会では、これらのプラスミドから過剰発現した人工前駆体蛋白質を用いた*in vitro*葉緑体輸送実験の結果と当初目的に対する有用性について報告する。

1. Inoue *et al.*, *Plant Physiol. Biochem.* 46: 541-549, 2008.
2. Akita and Inoue, *Methods Enzymol.* 466: 43-64, 2009.
3. Inoue and Akita, *J. Biol. Chem.* 283: 7491-7502, 2008.

chloroplast, protein import, precursor protein

講演番号：3D25p10
講演日時、会場：3 月 28 日 15:49～ D 校舎 25 会場

Isolation of the translocation intermediates formed during protein translocation into chloroplasts (II) – Precursor proteins with steric hindrance to block protein translocation

○Manoj POHARE, Mitsuru AKITA (Ehime Univ.)

Background: Nuclear encoded chloroplast precursor proteins are imported into chloroplast through translocation apparatus, which are located both in the outer and inner envelope membranes of the chloroplast. Our current knowledge of the chloroplast translocation apparatus is based mainly on the biochemical analysis of protein translocation intermediates (PTIs) formed during the early stage of protein translocation *in vitro* under limited energy conditions, such as a low level of ATP. Various translocon components have already been reported to be identified by analyzing these early PTIs. However, little is known once after precursors are released from the early PTIs. This is largely because of the lack of the knowledge regarding the interactions between precursors and the translocon components due to the inability of isolating the PTIs during the translocation step.

Methods and Results: PTI at the latter stage of translocation can be generated by the precursor proteins bearing a C-terminal domain that can be transformed into a rigid or bulky structure which is sterically hindered to pass through the translocon channels. In our study we are trying to block the process of protein import into chloroplast by attaching a monovalent streptavidin (1) to the C- terminal end of precursor protein. Production of monovalent streptavidin and a soluble precursor protein has already been accomplished. Thus, our current effort of obtaining the streptavidin bound precursor and applying this complex to the in vitro protein import assay to obtain the later PTIs will be presented at the meeting.

1. Howarth *et al.*, *Nat Methods*, 3: 267-273, 2006.

chloroplast, protein import, precursor protein

講演番号：3D25p11
講演日時、会場：3 月 28 日 16:10～ D 校舎 25 会場

アメリカネムノキの就眠運動に関わる K^+チャネルの機能解析

Functional analysis of *Samanea* K^+ channel involved in nyctinasty

○及川 貴也[1]、鈴木 健史[1]、石丸 泰寛[1]、浜本 晋[2]、宗正 晋太郎[3]、村田 芳行[3]、魚住 信之[2]、上田 実[1] ([1]東北大院・理、[2]東北大院・工、[3]岡山大院・環境生命)
○Takaya OIKAWA[1], Takeshi SUZUKI[1], Yasuhiro ISHIMARU[1], Shin HAMAMOTO[2], Shintaro MUNEMASA[3], Yoshiyuki MURATA[3], Nobuyuki UOZUMI[2], Minoru UEDA[1] ([1]Grad. Sch. Sci., Tohoku Univ., [2]Grad. Sch. Eng., Tohoku Univ., [3]Grad. Sch. Envrion. Life Sci., Okayama Univ.)

アメリカネムノキは，昼に葉を開き，夜に葉を閉じる就眠運動を行う．就眠運動は，葉の付け根の部分（葉枕）に存在する運動細胞の膨張・収縮によって引き起こされており，K^+チャネルによる浸透圧調節が重要な役割を果たす．我々は，アメリカネムノキの葉枕特異的に局在する電位依存性外向き K^+チャネル SPORK2 を同定しており，この遺伝子発現は日周変動することを明らかにした．アフリカツメガエル卵母細胞を用いた二電極膜電位固定法により，SPORK2 の K^+放出活性を詳細に調べたところ，シロイヌナズナの孔辺細胞に局在する電位依存性 K^+チャネル GORK に比べ，脱分極に応答したチャネル活性化が 10 倍遅いことが分かった．また，ホールセルパッチクランプ法により，アメリカネムノキの運動細胞における K^+チャネルの電位依存性活性化速度を調べた結果，シロイヌナズナの孔辺細胞のものより 10 倍遅いことが明らかとなった．

SPORK2 のアミノ酸配列を GORK のものと比較すると，N 末端の細胞質内領域は相同でないのに対し，それ以外は 69%相同であった．そこで，SPORK2 の N 末端領域と GORK の N 末端領域をそれぞれ置換したキメラタンパク質を作製し，活性を測定した．その結果，N 末端領域を GORK に置換した SPORK2 では K^+放出活性が消失し，N 末端領域を SPORK2 に置換した GORK では電位に応答した活性化が遅くなった．このことから，SPORK2 の脱分極応答性 K^+放出活性には，N 末端領域が関与していることが示唆される．

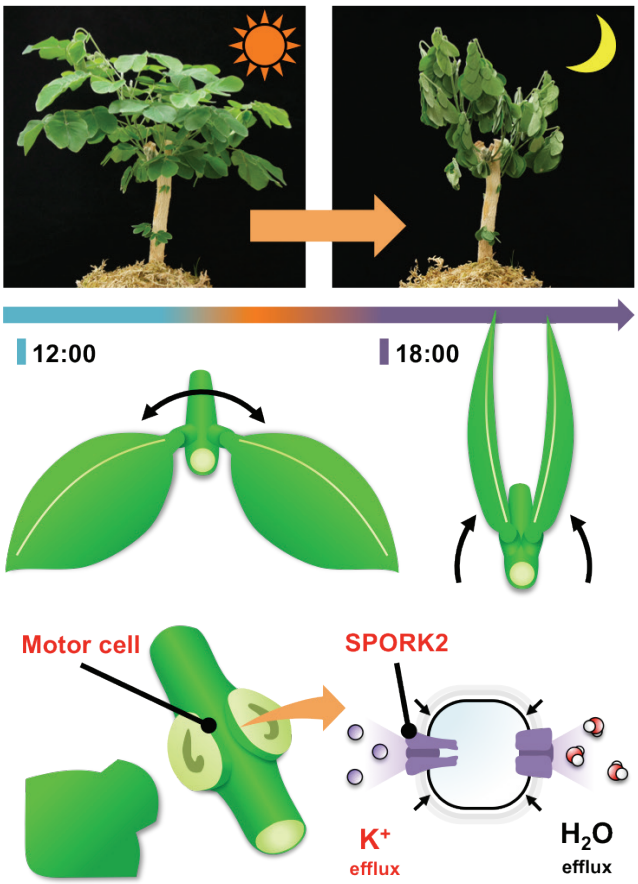


Fig. 運動細胞の収縮により，アメリカネムノキの就眠が引き起こされる．

K^+ channel, membrane transport, osmotic pressure

講演番号：3D25p12
講演日時、会場：3 月 28 日 16:21～ D 校舎 25 会場

外来性タンパク質を葉緑体で高蓄積させるための「光スイッチ」の機構と応用

Mechanism and application of "light-switch" for high accumulation of foreign proteins in chloroplasts

○柴田 考世[1]、CHUENWARIN Paweena[1]、清水 正則[2]、小林 裕和[1] ([1]静県大院・食品栄養環境・薬食生命、[2]常葉大・健康プロデュース)
○Takayo SHIBATA[1], Paweena CHUENWARIN[1], Masanori SHIMIZU[2], Hirokazu KOBAYASHI[1] ([1]Grad. Sch. Nutr. Envir. Sci., Grad. Sch. Integrated Pharmaceut. Nutr. Sci., Univ. Shizuoka, [2]Sch. Health Promot. Sci., Tokoha Univ.)

【背景･目的】植物において遺伝子操作により外来性の医薬品成分等を合成し得るが、その種の異種成分の蓄積は植物の生育を阻害することが多い。植物における外来遺伝子の発現誘導を目的として、光や温度など植物の環境応答、あるいは植物内在性遺伝子発現制御と干渉しない他生物由来のシステムの導入が試行されてきた。しかしながら、特定の遺伝子発現のみを ON−OFF し、異種成分を効率的に蓄積する上ではさらなる改良が求められる。本発表者等は、植物の光調節光傷害回避機構における光感知システムとして、光化学系 (PS) II に対して PSI をより励起する波長光が、PSI 反応中心タンパク質の遺伝子 (*psaA*) の発現を特異的に抑制することを見いだした (*PNAS*, **107**, 10760-10764, 2010)。本研究では、この機構を活用し、生育後の植物に光を照射することで、目的遺伝子のみの発現が誘導され、葉緑体での外来タンパク質を高蓄積する遺伝子発現「光スイッチ」を開発することとした。
【方法】シロイヌナズナ遺伝子破壊 (KO) 系統あるいは突然変異系統を実験に供した。電子伝達系阻害剤 3-(3’,4’-dichlorophenyl)-1,1’-dimethyl urea (DCMU) あるいは 2,5-dibromo-3-methyl-6-isopropyl-p-benzoquinone (DBMIB) への暴露下、また 700 nm の波長特性を有する発光ダイオード (LED) の照射下における *psaA* 転写産物の変動を定量した。葉緑体形質転換ベクター pLD26 にレポーター遺伝子 Chroma-Glo Luciferase (Promega) の CBR*luc* (赤色) あるいは CBG68*luc* (緑色) を In-Fusion HD Cloning Kit (Clontech) によりそれぞれ連結し、パーティクルガンにより葉緑体内に導入後、ルシフェラーゼアッセイに供した。
【結果と考察】光化学系レドックス環境に影響を与えると考えられる機能タンパク質として、proton gradient regulation 5 (PRG5)、state transition 7 (STN7)、および chloroplast sensor kinase (CSK) 等に注目し、KO あるいは突然変異系統を解析した。また、阻害剤処理や 700 nm LED 照射によりプラストキノン (PQ) の酸化還元電位を変化させた際の *psaA* 転写産物の定量に基づいた制御機構について報告する。葉緑体におけるレポーター遺伝子 Chroma-Glo Luciferase (Promega) による評価系を確立した。この光制御は「抑制」に働くため、RNAi 等を活用し、光により目的遺伝子の発現を正に制御する (特許出願: 2013-050728)。

chloroplast engineering, light switch, gene expression

講演番号：3D25p13
講演日時、会場：3 月 28 日 16:32～ D 校舎 25 会場

アスタキサンチンを高産生する遺伝子組換えレタスのメタボローム解析

Metabolome analysis of transplastomic lettuce that produces astaxanthin.

○佐々木 貴子[1]、小川 拓水[1]、岡澤 敦司[1]、三沢 典彦[2]、太田 大策[1] ([1]大阪府立大学大学院、[2]石川県立大学)
○takako sasaki[1], takumi ogawa[1], atsushi okazawa[1], norihiko misawa[2], daisaku ohta[1] ([1]Osaka Pref. Univ., [2]Ishikawa Pref. Univ.)

【背景】外来遺伝子の導入により代謝経路を改変した遺伝子組換え作物の創出が世界的に行われているが, 外来遺伝子の導入が既存の代謝経路に及ぼす影響に関する知見は限定されている. アスタキサンチン（ASX）は, 微細藻類, 植物, 細菌, 糸状菌の一部の種によって生合成されるケトカロテノイドの一種であり, 高い抗酸化活性を有することから栄養補助食品や化粧品などに広く利用されている. 高等植物では, フクジュソウ属の一部の種の花弁にのみ ASX の存在が確認されているが, 毒性の強いベンジルイソキノリンアルカロイドを含むため食用には適さない. そこで, 代謝工学的手法を用い, 様々な食用作物への ASX 生合成経路の付与が行われてきた. 本研究では, ASX 生合成経路が付与されたレタスを用いて, ASX 生合成経路の付与が既存の代謝経路に与える影響を俯瞰的に調べることを目的とし, LC-MS を用いたメタボローム解析を行った.

【材料と方法】*Lactuca sativa* L. cv. Berkeley（栽培品種レタス）の葉緑体ゲノムに, 海洋微生物 *Brevundimonas* 由来のβ,β-carotenoid 3,3'-hydroxylase (CrtZ) , β,β-carotenoid 4,4'-ketolase (CrtW) をコードする遺伝子, および, *Paracoccus* 由来の isopentenyl pyrophosphate-isomerase をコードする *idi* 遺伝子を導入して ASX 生合成経路が付与された遺伝子組換え系統 (GM)と, GM と同一条件で栽培した *L. sativa* L. cv. Berkeley (non-GM), ならびに, 市販レタス複数品種のそれぞれの可食部の凍結乾燥粉末から 80% メタノール抽出液を調製し, LC-MS 分析に供試した.

【結果と考察】今回, 同定・定量した 42 種類の代謝産物の蓄積量データに基づく主成分分析の結果, 第一主成分（寄与率 31.9%）は, GM とそれ以外のレタスの代謝プロファイルの違いを反映した. この分離には GM における核酸類の高蓄積が寄与していた. 第二主成分（寄与率 23.7%)は, 実験室栽培レタス（GM と non-GM）と市販レタスの間での明確に異なる代謝プロファイルを示した. 一般に, 各代謝物の蓄積量は, それぞれの植物品種ごとに一定の範囲内に於いて変動すると考えられる. 今回供試した実験栽培レタス（GM と non-GM）の代謝プロファイルが市販レタスの代謝変動幅から外れていた事から, 実験栽培条件が市販レタス栽培条件と異なっていたと推察される. 今後, ASX 生合成と窒素代謝の直接的な接点の解明によって, ASX 高産生 GM における核酸代謝亢進の一般化の議論が可能である.

metabolite profiling, astaxanthin, purine/pyrimidine metabolism

講演番号：3D25p14
講演日時、会場：3 月 28 日 16:43～ D 校舎 25 会場

オーストラリアシャジクモ節間細胞における細胞内窒素動態の解明

Elucidation of intracellular nitrogen dynamics in the internodal cells of Chara australis

○神成 夏未[1]、寺嶋 傑[1]、佐々木 亮介[2]、三村 徹郎[3]、及川 彰[1,2] ([1]山形大農、[2]理研 CSRS、[3]神戸大理)
○Natsumi KANNARI[1], Suguru TERASHIMA[1], Ryosuke SASAKI[2], Tetsuro MIMURA[3], Akira OIKAWA[1,2] ([1]Yamagata Univ., [2]Riken CSRS, [3]Kobe Univ.)

【目的】富栄養化は淡水生態系における世界的な脅威であり、特に淡水湖での富栄養化やそれに伴い生じる藻類の異常発生が深刻な問題として頻発している。その発生が河川への農耕地へ施肥した肥料の流亡や生活排水などの流入といった外因性窒素に起因するものであることから、全窒素(TN)と呼ばれる水質指標により、水質の栄養状態の評価が行われている。オーストラリアシャジクモ（*Chara australis*）は輪藻類の一種であり、節間細胞と呼ばれる長さ 20cm 以上に成長する細胞を持つ。節間細胞はその巨大性から細胞膜生理学や原形質流動に関する研究に広く用いられている。本種は河川の流れの緩慢な部分において巨大群落を形成することで優先していたが、富栄養化や干ばつ、土砂の堆積等により近年その多くが消失している。このため、オーストラリアシャジクモを含む輪藻類は水質の指標として認知されており、窒素濃度に対する生育応答と関連して、富栄養化条件での生育率の変化等の研究が行われている。しかし、富栄養化の原因物質とされる外因性窒素の取り込みに依存して生成するアミノ酸等の含窒素化合物が、オーストラリアシャジクモの細胞内でどのような挙動を示すかは十分に研究されているとはいえない。
【方法】まず、外部から与えた安定同位体窒素が細胞内でも検出できるかどうかを確認し、^{15}N の含窒素化合物中における標識化の状態を経時的に調べるため、オーストラリアシャジクモの細胞内代謝フラックスの予測を試みた。具体的には、^{15}N 標識化合物(0.1%,L-グルタミン酸)を含む人工池水中で培養したオーストラリアシャジクモの節間細胞を、経時的に液胞と葉緑体及び細胞壁画分に分画し、それらをメタボローム解析に供した。メタボローム解析には、イオン性化合物の分離検出に適したキャピラリー電気泳動質量分析装置を用いた。
【結果】結果、^{15}N が取り込まれたと考えられる代謝物が 25 種類検出され、その多くがアミノ酸等の含窒素化合物であった。特に窒素同化の中心代謝経路である GS/GOGAT 経路を構成するグルタミン酸は培養後の早い段階において双方の画分で窒素が ^{15}N で標識化されていたことから、取り込みが飽和していると考えられた。また、中心代謝系を経由した含窒素化合物の標識に関しては、アラニンやグルタミン等、グルタミン酸から直接アミノ基の転移を受けて生合成されるアミノ酸では経時変化に伴い、2 つの画分双方で ^{15}N の取り込みが増加していたが、一方でリシンやイソロイシンなど、多段階の反応を経て生合成されるアミノ酸では ^{15}N の取り込みがほとんど確認できない化合物も存在した。さらに、アデニンや NAD 等、核酸合成に関与する含窒素化合物に関しては ^{15}N の取り込みが 2 日間の培養では確認できなかったことから、迅速な ^{15}N の取り込みが確認されたアミノ酸などの代謝系に対し、これらの代謝速度は遅いことが示唆された。今後は富栄養環境でのオーストラリアシャジクモの培養を行うことで、今回確認された窒素代謝の動態が環境条件の変化により、どういった変動を示すのかについて明らかにしたい。

Chara australis, metabolomics, nitrogen dynamics

講演番号：3D25p15
講演日時、会場：3 月 28 日 16:54～ D 校舎 25 会場

オーストラリア・シャジクモの節間細胞における細胞内代謝フラックス解析

Intracellular metabolic flux analysis in the internodal celles of *Chara australis*

○寺嶋 傑[1]、神成 夏未[1]、佐々木 亮介[2]、三村 徹郎[3]、及川 彰[1,2]([1]山形大農、[2]理研 CSRS、[3]神戸大理)
○Suguru TERASHIMA[1], Natsumi KANNARI[1], Ryosuke SASAKI[2], Tetsuro MIMURA[3], Akira OIKAWA[1,2] ([1]Yamagata Univ., [2]Riken CSRS., [3]Kobe Univ.)

【目的】細胞内における代謝物の分布は、酵素やトランスポーター、受容体等のタンパク質局在情報から推定されているが、実際に直接確かめられた例は少ない。陸生植物に最も近い藻類とされるシャジクモ類のオーストラリアシャジクモ（*Chara australis*）がもつ巨大な節間細胞からは、液胞などの細胞内小器官を容易に単離できることが知られている。我々は、安定同位体である ^{13}C を取り込ませたオーストラリアシャジクモの節間細胞を、液胞、葉緑体、その他の 3 画分に分画して経時的に抽出し、これらをメタボローム解析に供することによって、細胞内における時間的および空間的な代謝物動態の網羅的な解明を試みた。
【方法】$NaHCO_3$ の代わりに $NaH^{13}CO_3$ を添加した人工池水で一定時間培養したオーストラリアシャジクモ節間細胞からサンプリングを行い、メタボローム解析に供することによって ^{13}C 標識される代謝物量を調べた。メタボローム解析は、イオン性化合物の分析に優れているキャピラリー電気泳動飛行時間型質量分析計（CE-TOF MS）を用いて行った。
【結果】メタボローム解析により検出された約 100 種類の代謝物のうち、いくつかの代謝物に ^{13}C の取り込みが確認された。また、液胞画分から検出された代謝物は、他画分の同一代謝物より ^{13}C を多くかつ素早く取り込んでいた。例えば、アラニン（$C_3H_7NO_2$）は液胞画分において、^{13}C 投与後 10 分の時点で 3 個すべての炭素が ^{13}C と置き換わったアラニンが検出され始めた。そして、この $^{13}C_3$ アラニンは ^{13}C 投与後 60 分で全アラニン量の約 10%を占めるまで増加した。一方、葉緑体およびその他の画分では、^{13}C 投与後 48 時間においても ^{13}C が取り込まれたアラニンはほとんど検出されなかった。他の標識が認められた代謝物は、解糖系や TCA 回路などの中心代謝系に比較的近い生合成経路をもつ糖リン酸、グリシン、セリン、アスパラギン酸などであった。
　また、光合成阻害剤である 3-（3,4-ジクロロフェニル）-1,1-ジメチル尿素（DCMU）を処理して同様の実験をおこなうことによって、^{13}C が光合成による炭素固定経路を経て取り込まれているかを確認した。その結果、DCMU 処理区ではコントロール区と同様に ^{13}C がほとんど取り込まれなかった。従って、^{13}C は確かに光合成によって取り込まれたことが確認された。これらの結果は、シャジクモ節間細胞内で光合成を起点として新たに生合成された代謝物の多くが、液胞内に素早く選択的に輸送されることを示唆しているのかもしれない。

Metabolic flux analysis, *Chara australis*, Metabolomics

講演番号：3D25p16
講演日時、会場：3 月 28 日 17:15～ D 校舎 25 会場

オオカナダモ葉緑体欠失細胞における細胞生物学的解析

Cell biological analysis of chloroplast-less idioblasts in *Egeria densa* leaves

○小林 永実[1]、金澤 美加子[1]、平野 智也[2]、阿部 知子[2]、伊藤 竜一[3]、藤原 誠[1,2] ([1]上智大学、[2]理研、[3]琉球大学)
○Emi KOBAYASHI[1], Mikako KANAZAWA[1], Tomonari HIRANO[2], Tomoko ABE[2], Ryuuichi ITOU[3], Makoto FUJIWARA[1,2] ([1]Sophia Univ., [2]RIKEN, [3]Ryukyus Univ.)

【背景と目的】水生の単子葉植物オオカナダモ（*Egeria densa*）は葉の大部分が二層から成り立ち、培養と細胞観察が容易なことから、世界的な実習生物として知られる。オオカナダモの葉身には葉緑体欠失細胞として無色透明な細胞が分化し、この細胞は異型細胞と呼ばれる。近年、オオカナダモ葉に UV を照射すると、異型細胞から青白い蛍光が生じることが当研究室で観察された。この蛍光を指標に解析することで、異型細胞の形成パターンや細胞構造の理解が進展することが期待された。オオカナダモ異型細胞の特徴は 1950 年代に光学顕微鏡を用いて調べられ、細胞核や液胞の存在、内容物の化学的性質が報告されていた。今回、蛍光染色試薬などを用いた現代的手法により異型細胞のオルガネラ（液胞・細胞核・ミトコンドリア・色素体）および内容物に関する再検証を行った。
【結果】Neutral Red 染色の結果、成熟葉の異型細胞のほぼ全体が赤く染まった。染色領域と UV による青白く光る領域が一致したため、青い蛍光物質は液胞内に蓄積されることがわかった。展開葉では前液胞の存在が示唆された。さらに Nile Blue A 染色したところ、異型細胞の液胞が青く染色された。これより液胞への酸性脂質の蓄積が示唆された。

PI 染色または SYBR Green I 染色の結果、表皮細胞の核は細胞の中央領域に存在していたが、異型細胞の核はほとんどが極側に存在していた。葉層で比較すると、表よりも裏において異型細胞核が中央領域に位置する割合が高かった。さらに、クラスターを形成している異型細胞と単独の異型細胞との間に核の分布差は認められなかった。興味深いことに、異型細胞の中には核を二つ有しているものや逆に核がないものも、稀な頻度ながら検出された。

MitoTracker Green 染色の結果、表皮細胞・異型細胞ともにミトコンドリアが検出された。いずれにおいても原形質流動が確認され、ミトコンドリアの形態に違いは認められなかった。ミトコンドリアの個数に関しては、異型細胞よりも表皮細胞の方が多かった。

SYBR Green I は DNA 結合性蛍光試薬である。SYBR Green 染色により、異型細胞に細胞核やミトコンドリアとは明らかに異なる輝点が確認された。この輝点を有する構造体は明視野では無色透明であった。これより異型細胞には色素体が存在し、それは白色体であることが示唆された。
【考察】1950 年代の解析では、細胞核の存在や異型細胞内の化学的性質が報告されたが、核の局在や色素体の存在などに関して、本研究結果とは異なるものであった。本研究により、無色のオオカナダモ異型細胞におけるユニークな物質蓄積とオルガネラ形態・分布に関する新知見が得られた。

idioblast, vacuole, water weed

講演番号：3D25p17
講演日時、会場：3 月 28 日 17:26～ D 校舎 25 会場

シロイヌナズナ花粉発生過程における色素体増殖の解析

Profiling of plastid multiplication during pollen development of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.

○石川 浩樹[1]、佐々木 駿[1]、鈴木 麻央[1]、平野 智也[2]、風間 裕介[2]、阿部 知子[2]、伊藤 竜一[3]、藤原 誠[1,2] ([1]上智大理工、[2]理研仁科セ、[3]琉球大理)
○Hiroki ISHIKAWA[1], Syun SASAKI[1], Mao SUZUKI[1], Tomonari HIRANO[2], Yusuke KAZAMA[2], Tomoko ABE[2], Ryuuichi ITOH[3], Makoto FUJIWARA[1,2] ([1]Sophia Univ., [2]RIKEN Nishina Center., [3]Ryukyus Univ.)

多くの植物の花粉は大きさ・形が均一であり、サンプリングも容易であることから、観察対象として有用である。花粉形成過程については、以下のことが知られている。(1)発達中の雄蕊の葯室内で、胞原細胞が並層分裂を経て、側膜細胞と胞子形成細胞に分化する。(2)このうち後者は直接または分裂を繰り返して花粉母細胞となる。(3)花粉母細胞はカロースを沈着させた特殊な細胞壁を形成するとともに、減数分裂をして花粉四分子となる。(4)カロース性の細胞壁から遊離した細胞は花粉小胞子となる。(5)その後、花粉小胞子は栄養細胞（花粉管細胞）と雄原細胞に不等分裂し、雄原細胞はさらに分裂して 2 個の精細胞となる。

栄養細胞の発生系譜を通じて、細胞内には植物固有のオルガネラである色素体が存在する。色素体は組織や環境に応じて、光合成を行う葉緑体、デンプンを合成・貯蔵するアミロプラストなどに分化する。葉緑体については、シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.)を用いた研究により、その分裂増殖過程の多くが明らかになっている。体細胞分裂を終えた葉肉組織の細胞内において、原色素体は葉緑体に分化しつつ３回の分裂増殖を行う。花粉においては、小胞子から成熟花粉粒になる際、色素体がアミロプラストへ分化することが明らかになっているが、花粉発生過程における色素体分裂増殖の詳細はわかっておらず、葉緑体に比べ未だ研究が進んでいないのが現状である。

これまで花粉色素体の解析は、主に固定細胞を用いて電子顕微鏡で行われてきた。電子顕微鏡法では、細胞内構造の詳細な観察は可能であるが、細胞全空間の観察や一度に多数の細胞を解析するのにはあまり向かない。花粉発達過程における色素体の数の変化を調査するためには、色素体を標識した試料を多数観察することが望ましい。本研究では、花粉発生過程で強い活性を示す *ACTIN1* プロモーター制御下で、FtsZ1 由来の色素体移行配列と YFP との融合タンパク質を発現するシロイヌナズナ野生型(Wassilewskija background)を作出した。これにより蛍光顕微鏡下、青色光励起条件で花粉色素体が可視化され、色素体の数の計測と細胞内局在の解析が可能になった。本研究では、花粉色素体の数と細胞内局在を、胞子形成細胞、花粉母細胞、花粉四分子、花粉小胞子、成熟花粉粒の各段階において調べたので報告する。

Arabidopsis thaliana, plastid, pollen

講演番号：3D25p18
講演日時、会場：3 月 28 日 17:37～ D 校舎 25 会場

シロイヌナズナ葉緑体分裂異常変異体における花粉色素体の解析

Proliferation and morphology of pollen plastids in chloroplast division mutants of *Arabidopsis thaliana*

○佐々木 駿[1]、石川 浩樹[1]、加賀谷 奨[1]、風間 裕介[2]、阿部 知子[2]、伊藤 竜一[3]、藤原 誠[1]([1]上智大理工、[2]理研、[3]琉球大理)

○Shun SASAKI[1], Hiroki ISHIKAWA[1], Shou KAGAYA[1], Yusuke KAZAMA[2], Tomoko ABE[2], Ryuuichi ITOH[3], Makoto FUJIWARA[1] ([1]Sophia Univ., [2]RIKEN., [3]Ryukyus Univ.)

色素体は光合成細菌シアノバクテリアの祖先種が宿主真核生物に細胞内共生して発生した植物オルガネラである。色素体は組織や環境に応じて葉緑体、アミロプラスト、白色体など様々な形態に分化する。その中でも葉肉細胞の葉緑体については、シロイヌナズナ（*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.）の葉緑体分裂異常変異体の単離や植物ゲノム計画による遺伝子同定により、分裂制御機構が精力的に研究されてきた。その結果、葉緑体はシアノバクテリア由来の分裂機構と細胞内共生後に後天的に獲得した分裂機構が協調することで均等に 2 分裂することが明らかにされている。葉緑体分裂制御因子の中でもバクテリア起源の FtsZ タンパク質は葉緑体分裂初期に内包膜ストロマ側の中央にリング状構造を形成することで他の分裂因子の足場となる重要な役割をもつことが知られている。FtsZ 遺伝子はシアノバクテリアでは 1 コピー遺伝子なのに対し、陸上植物では *FtsZ1*、*FtsZ2* の 2 グループに分かれて保存されている。シロイヌナズナでは *AtFtsZ1-1*、*AtFtsZ2-1*、*AtFtsZ2-2* の計 3 つの FtsZ 遺伝子が核にコードされている。FtsZ1、FtsZ2 はそれぞれ異なる機能を有しており、葉緑体分裂では FtsZ2 がより重要な因子であることが明らかにされている。上述の通り、葉緑体分裂においては詳細な研究が行われてきたが、葉緑体以外の非光合成色素体の増殖制御機構については未だ研究が進んでいないのが現状である。

本研究では、細胞の大きさ、形がほぼ均一で、大量にサンプルが得られる花粉に注目した。花粉栄養細胞中に存在する非光合成色素体、花粉色素体を蛍光タンパク質 YFP で標識し、葉緑体分裂異常変異体の成熟花粉および花粉管における色素体の形態を調べた。その結果、FtsZ は花粉色素体においても重要な増殖制御因子であり、*AtFtsZ1-1*、*AtFtsZ2-1*、*AtFtsZ2-2* 遺伝子変異の影響度は葉緑体と同様であることが分かった。一方で、FtsZ2 を完全にノックアウトすることで、色素体の凝集というこれまで報告されていない表現型をもつことが観察された。これらの結果から FtsZ は花粉色素体増殖においても葉緑体分裂と類似した機能を持つこと、一方で FtsZ2 は花粉色素体特有の役割を持つことが示唆された。

Arabidopsis thaliana, plastid, pollen

講演番号：3D25p19
講演日時、会場：3 月 28 日 17:48～ D 校舎 25 会場

光合成生物におけるタンパク質非結合フラビンが関与する鉄還元酵素反応
Ferric reductase reaction with non protein-bound flavin in photosynthetic organisms

○佐藤 純一[1]、関野 滉太[1]、田中 英資[1]、森 鉄也[1]、石井 達也[1]、武田 晃治[2]、吉村 悦郎[3]、中川 純一[4]、阿部 晃[5]、新町 文絵[6]、木俣 真弥[1]、川崎 信治[1]、新村 洋一[1]([1]東農大応生科・バイオ、[2]東農大・教職、[3]東大院農生科・応生科、[4]東農大生物産業・食香、[5]札幌医大医・眼科、[6]日大短大・生物資源)

○Junichi SATO[1], Kouta SEKINO[1], Eisuke TANAKA[1], Tetsuya MORI[1], Tatsuya ISHII[1], Koiji TAKEDA[2], Etsuro YOSHIMURA[3], Junichi NAKAGAWA[4], Akira ABE[5], Fumie SHINMACHI[6], Shinya KIMATA[1], Shinji KAWASAKI[1], Youichi NIIMURA[1] ([1]Dept. of Bioscience, Tokyo Univ. of Agric., [2]Edu. course, Tokyo Univ. of Agric., [3]Dept. of App. Biol. Chem. , The Univ. of Tokyo, [4]Dept. of Food and Cosmetic Sci., [5]Dept. of Ophthal. , Sapporo Med. Univ., [6]Dept. of Bioresource Sci., Junior College, Nihon Univ.)

【背景・目的】Flavin には riboflavin(Rf)、FMN、FAD が含まれる。細胞内で Rf はタンパク質に結合しない状態で存在するが、FAD と FMN はタンパク質に結合し、酸化還元酵素の補因子として機能する。タンパク質非結合型の FAD と FMN（遊離 FAD、遊離 FMN；遊離 flavin）が関与する種々の酵素反応が知られているが、細胞内におけるタンパク質非結合 flavin の実態は不明であった。当研究室では細菌 *Amphibacillus xylanus* 細胞内から遊離 FAD を見いだし、酸素代謝に関与する可能性を報告した(Ohnishi et al. 1994)。

遊離 flavin は鉄貯蔵タンパク質内の三価鉄還元への関与が推定されている。我々はラン藻（*Synechocystis* sp. PCC6803）から鉄還元酵素として精製した DrgA タンパク質（DrgA）、ferredoxin NADP$^+$ oxidoreductase（FNR）が、遊離 flavin 存在下で鉄貯蔵タンパク質と反応を示すことを見いだした[1)2)]。更に、DrgA や FNR は遊離 flavin 存在下で鉄還元活性を増加した[1)2)]。一部の双子葉植物を鉄欠乏条件下で栽培すると根から Rf 類が分泌され、根の鉄還元能が増加することが報告されている（新町ら, 1994）。遊離 flavin 関与の鉄還元酵素は flavin 還元活性を示すことから、光合成生物におけるタンパク質非結合 flavin の存在と、flavin 類が関与する鉄還元酵素反応に興味が持たれた。

本報告では葉緑体のモデルとしてラン藻、双子葉植物としてキュウリを用いてタンパク質非結合 flavin の存在、flavin 類が関与する鉄還元酵素反応について検討した。

【方法・結果】HPLC による分析を試みた結果、ラン藻の細胞内遊離 flavin が定量された。次に、ラン藻の無細胞抽出液を Butyl TOYOPEARL650S に供し、細胞内遊離 flavin を用いて flavin 還元活性を有する酵素の分画を試みた。その結果、flavin 還元活性を示す画分が 3 つ検出された。各画分に対してウエスタン解析を行ったところ、1 つの画分に DrgA、2 つの画分に FNR の存在が示唆された。鉄貯蔵タンパク質内の三価鉄は、還元されると二価鉄として放出される（二価鉄放出反応）。DrgA 画分、FNR 画分とも遊離 flavin に依存したラン藻由来鉄貯蔵タンパク質である bacterioferritinA からの二価鉄放出反応を示す。更に、DrgA は細胞内遊離 flavin 濃度においても二価鉄放出反応を示した。キュウリを鉄欠乏条件下で栽培し、葉、根、水耕液について HPLC を用いた flavin 分析を試みた結果、水耕液から Rf が検出された。更に既知の flavin とは異なる位置にピークが検出され、このピークは根にも存在した。現在このピークの同定、及び鉄還元酵素反応への関与を検討している。

1) Takeda, K. et al. (2007) FEBS J. 274, 1318-1327　2) Sato, J. et al. (2011) Biometals 24, 311-321

Non protein-bound flavin, ferric reductase reaction

講演番号：3D25p20
講演日時、会場：3 月 28 日 17:59～ D 校舎 25 会場

パースニップのフラノクマリン経路において膜結合型プレニル化酵素はリニア型 / アンギュラー型生合成の運命を決定する
Two membrane-bound prenyltransferases direct the synthesis of linear or angular furanocoumarins in parsnip

○棟方 涼介[1]、KARAMAT Fazeelat[2]、OLRY Alexandre[2]、VINCENT Courdavault[3]、杉山 暁史[1]、伊達 慶明[1]、KRIEGER Celia[2]、PAPON Nicolas[3]、FOURREAU Emilien[3]、GROSJEAN Jeremy[2]、矢崎 一史[1]、BOURGAUD Frederic[2]、HEHN Alain[2] ([1]京大・生存研、[2]ロレーヌ大学、[3]トゥール大学)
○Ryosuke MUNAKATA[1], Fazeelat KARAMAT[2], Alexandre OLRY[2], Courdavault VINCENT[3], Akifumi SUGIYAMA[1], Yoshiaki DATE[1], Celia KRIEGER[2], Nicolas PAPON[3], Emilien FOURREAU[3], Jeremy GROSJEAN[2], Kazufumi YAZAKI[1], Frederic BOURGAUD[2], Alain HEHN[2] ([1]RISH, Kyoto Univ., [2]Lorraine Univ., [3]Tour Univ.)

フラノクマリン類（Furanocoumarins: FC）はクマリンの一サブグループを形成する三環性のフェノール系二次代謝産物であり、フラン環の配列様式からリニア型とアンギュラー型に分類される。植物にとって FC は主に外敵に対する化学防御物質として植物のバリア機構に寄与している。特に、 FC によるチョウ目昆虫に対するセリ科植物の防御は、共進化の例として化学生態学の分野で活発に研究されてきた。この共進化説から、アンギュラー型 FC 経路は、リニア型 FC 耐性を獲得したチョウ目昆虫に対する第二防護壁として、リニア型 FC 生合成経路から進化したと考えられている。

FC 生合成経路においては、クマリン誘導体 umbelliferone のジメチルアリル化酵素（umbelliferone dimethylallyltransferase: UDT）がその初発反応を担う。同時に、この反応段階は FC 生合成の分岐点となり、 クマリンの 6 位あるいは 8 位のプレニル化により、それぞれリニア型、及びアンギュラー型 FC が最終産物として生成する。このように、UDT は FC の獲得・多様化において決定的に重要な役割を果たしている。*UDT* 遺伝子については、本研究室においてリニア型 FC のみを蓄積するセリ科のパセリから *U6DT*（*PcPT*）が単離されたが、一方でアンギュラー型 FC 特異的な *U8DT* に関しては全くの未知であった。

そこで本研究では、リニア型、アンギュラー型 FC ともに蓄積するセリ科のパースニップ（*Pastinaca sativa*）を実験材料として、*U8DT* の単離及び機能解析を行った。まず、次世代シークエンサーを用いて得られたパースニップの RNA-seq データから tblastn 検索により候補配列を探索し、2 分子の候補遺伝子全長配列（*P. sativa prenyltransferase 1*, *2*; *PsPT1, 2*）を得た。 PsPT1 及び PsPT2 はパセリの PcPT とそれぞれ 82% 及び 69% のアミノ酸配列相同性を示し、分子系統樹解析の結果、両 PT ともに PcPT と同じクレードに位置した。

これらの酵素機能解析は *Nicotiana benthamiana* 葉の agroinfiltration 法による一過的発現系を用いて行った。Umbelliferone 及び DMAPP を基質とした *in vitro* assay により、PsPT1 が PcPT と同様に強い U6DT 活性及び弱い U8DT 活性を有すること、対照的に PsPT2 は U8DT 活性を主活性とすることが示された。さらに、PsPT2 について *N. benthamiana* 葉由来プロトプラストを用いた細胞内局在解析を行い、 PsPT2 の N 末端領域がトランジットペプチドとして機能することを示した。現在、PsPT2 について詳細な酵素機能解析、遺伝子発現解析等を行っている。

参考文献：Karamat *et al*., *Plant J*., **77**, 627-638(2014)

prenyltransferase, furanocoumarin, arms race

講演番号：3D34a07
講演日時、会場：3 月 28 日 10:16～ D 校舎 34 会場

グルコ型糖供与体の 4、6 位水酸基の保護基が及ぼす反応性への影響

Study on how remote substituents influence on the reactivity of *gluco*-type glycosyl donors

○堀 綾香[1]、松本 佳央梨[1]、小西 美紅[1,2]、今村 彰宏[1]、安藤 弘宗[1,2]、石田 秀治[1]、木曽 真[1,2] ([1]岐阜大・応用生物、[2]京都大・iCeMS)
○Ayaka HORI[1], Kaori MATSUMOTO[1], Miku KONISHI[1,2], Akihiro IMAMURA[1], Hiromune ANDO[1,2], Hideharu ISHIDA[1], Makoto KISO[1,2] ([1]Gifu Univ., [2]iCeMS)

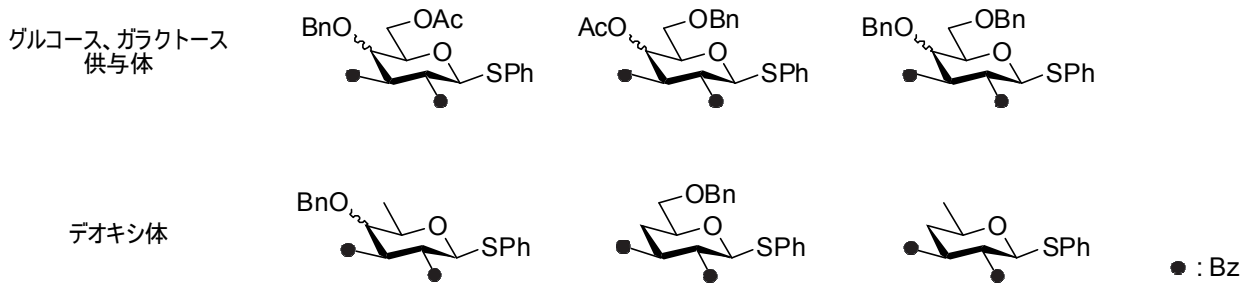
【背景・目的】

グリコシル化反応は糖鎖合成の成否を左右する鍵反応であり、反応に影響を与える要因は数多く存在する。特に、保護基の電子的特性は糖供与体 (求電子剤) 及び糖受容体 (求核剤) の反応性を大きく左右することが知られており、これまでに糖供与体の反応性において、反応点であるアノマー位に隣接する置換基の影響がよく研究されている。その一方で、遠隔位の置換基の影響を系統的に調べた研究は少なく、隣接基と比較して非常に知見は乏しい。当研究室では、グルコ型糖供与体の 4、6 位水酸基の保護基の影響に関心を持ち、種々の供与体の反応性を調べている[1]。本大会では、一昨年度の大会に引き続き、反応性検証によって得られた結果を報告する。

【方法・結果】

2、3 位水酸基を Bz 基で保護し、電子供与性の Bn 基、電子求引性の Ac 基を遠隔位の 4 位及び 6 位水酸基に導入したグルコース及びガラクトース供与体を合成し、グリコシル化反応に供することで、各供与体の反応性の違いをみることとした。この際、2 種類の供与体を用いた競合グリコシル化反応により、グルコース、ガラクトース供与体の相対的な反応性の差を検証した。その結果、4、6 位に同じ保護基を有するグルコース、ガラクトースにおいても顕著な反応性の違いが見られ、保護基の電子的特性だけでなく、立体配置も反応性に影響を与えていることが示された。さらに、4 位及び 6 位をデオキシ化したグルコ型供与体を用いて、酸素原子の影響を検証した。これら各競合グリコシル化反応の結果の詳細と反応性差に関しての考察を報告する。

[1]日本農芸化学会 2013 年度大会 3B20a13



glycosylation, glycosyl donor, remote substituent

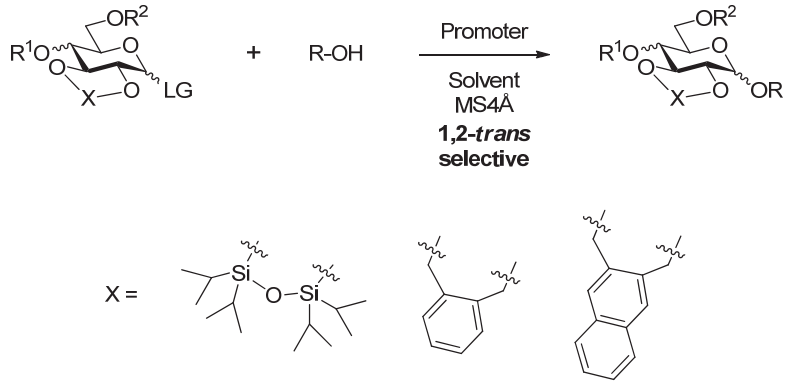
講演番号：3D34a08
講演日時、会場：3 月 28 日 10:27～ D 校舎 34 会場

2,3-環状保護糖供与体を用いた立体選択的グリコシル化の検討
Examination of stereoselective glycosylation using glycosyl donors bearing 2,3-cyclic protecting group

○八神 なほ子[1]、小西 美紅[1,2]、玉井 秀樹[1,2]、植木 章晴[1,2]、今村 彰宏[1]、安藤 弘宗[1,2]、石田 秀治[1]、木曽 真[1,2] ([1]岐阜大・応用生物、[2]京都大・iCeMS)
○Nahoko YAGAMI[1], Miku KONISHI[1,2], Hideki TAMAI[1,2], Akiharu UEKI[1,2], Akihiro IMAMURA[1], Hiromune ANDO[1,2], Hideharu ISHIDA[1], Makoto KISO[1,2] ([1]Gifu Univ., [2]iCeMS)

【背景・目的】糖鎖合成において、立体選択的なグリコシル化反応の開発は、非常に重要な課題である。現在、立体制御法としては、アノマー効果や隣接基効果、溶媒効果が一般的に用いられている。しかし、これらの効果は一定の立体選択性を発揮するものの、種々の課題を残している。効率的かつ実用的な糖鎖の合成戦略を立案する上では、立体制御法の拡充が必要である。そこで、本研究では、環状保護基を糖供与体のアノマー位近傍に配置させることで立体選択性を得ようと着想し、2,3 位に環状保護基を導入した糖供与体を用い、グリコシル化反応における立体選択性の検証を行うこととした。昨年度大会[1]において、グルコピラノースの 2,3 位水酸基に環状保護基(TIPDS、σ-Xylylene)を用いることで 1,2-*trans* 選択的にグリコシル化が進行するということを報告した。今年度は、糖鎖合成に有用な立体制御法の確立を目指し、環状保護基を有する 1,2-*trans* グリコシル化の更なる検証を試みた。

【方法・結果】グルコピラノースおよびガラクトピラノースの 2,3 位水酸基に環状保護基(TIPDS、σ-Xylylene)を導入した糖供与体をグリコシル化反応に供し、立体選択性を検証した結果、優位な 1,2-*trans* 選択性を得た。また、選択的脱保護を視野に入れ、σ-Xylylene 基のベンゼン環をナフタレンに置換した糖供与体においても同様に検証を行ったところ、高い 1,2-*trans* 選択性が得られた。更に、最も選択性が高い糖供与体に関しては NMR を用いた構造解析も試みた。本発表では、これらの詳細について報告する。



[1] 日本農芸化学会 2014 年度大会 3A02p19

cyclic protecting group, stereoselectivity, glycosylation

講演番号：3D34a09
講演日時、会場：3 月 28 日 10:38～ D 校舎 34 会場

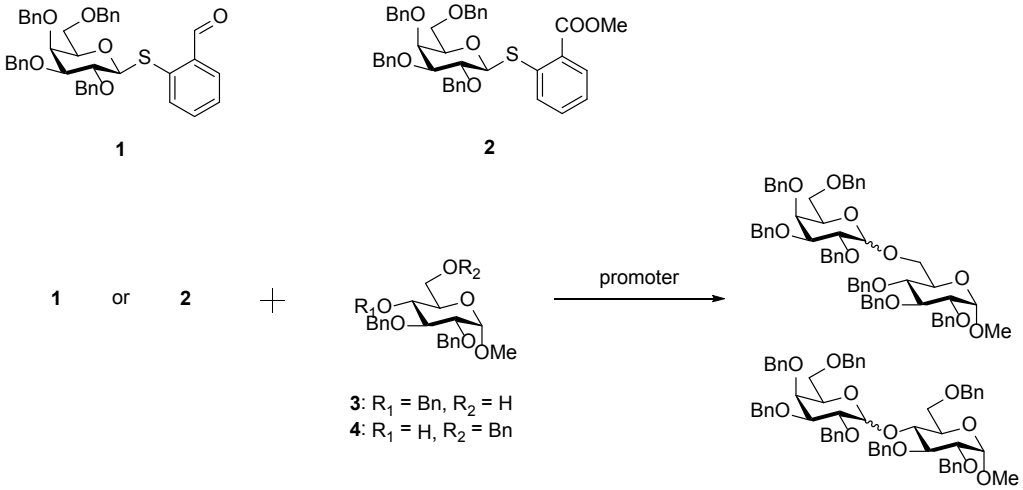
脱離基中にアルデヒドを持つチオグリコシド型糖供与体の反応挙動

Reaction behavior of thioglycoside donors having aldehyde in leaving group

○駒井 亮太、木村 智文、堺 英俊、西田 芳弘、土肥 博史（千葉大院融合）
○Ryota KOMAI, Tomofumi KIMURA, Hidetoshi SAKAI, Yoshihiro NISHIDA, Hirofumi DOHI (Chiba Univ.)

【目的】グリコシル化反応の際に特定の脱離基を化学選択的に活性化することは効率的な糖鎖合成において重要である。チオグリコシドはその高い化学的安定性から種々の糖鎖合成に用いられているが、セラミド等のオレフィン部位に影響を与えるヨードカチオンなどの活性化剤が必要となるため使用が制限される場合がある。我々は、脱離基中にアルデヒドを持つチオグリコシド **1** が通常のチオグリコシドは活性化されない TMSOTf によって活性化できることを見出した。本研究では、糖鎖合成におけるチオグリコシドの利便化および適用範囲の拡大を目的として、チオグリコシド **1** のグリコシル化における反応挙動と立体選択性について調べた。

【方法・結果】全ての水酸基がベンジル基で保護されたチオサリチル酸メチルガラクトシド **2** のエステル部分をけん化・還元した後、PCC 酸化することでアルデヒド体 **1** へと変換した。得られた **1** および **2** とグルコース由来の糖受容体 **3** および **4** を用いてグリコシル化を行い、その反応性と立体選択性を比較した。まず活性化剤を検討した結果、**2** は従来のチオグリコシドと同様に NIS/TfOH などのヨードカチオン系もしくは MeOTf などのメチルカチオン系の活性化剤で反応が進行したが、**1** はそれに加えて TMSOTf、TBDMSOTf のシリルカチオン種を生じるルイス酸によって活性化できることがわかった。続いて様々な反応温度、溶媒を用いてグリコシル化を行った結果、ほとんどの反応条件において **1** は **2** と同様の反応性および立体選択性を示した。



Glycosylation, Oligosaccharides, Stereoselectivity

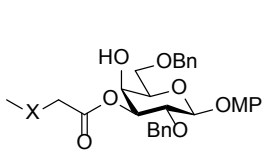
講演番号：3D34a10
講演日時、会場：3 月 28 日 10:49～ D 校舎 34 会場

糖受容体中のチオエーテルを用いた立体選択的グリコシル化

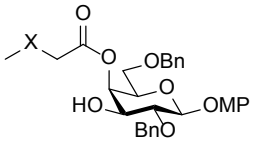
Stereoselective glycosylation using thioether groups in glycosyl acceptor

○小林 真己、田村 真奈美、江澤 あやめ、西田 芳弘、土肥 博史（千葉大院融合）
○Masaki KOBAYASHI, Manami TAMURA, Ayame EZAWA, Yoshihiro NISHIDA, Hirofumi DOHI (Chiba Univ.)

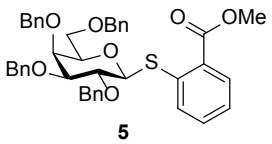
【目的】グリコシル化法の発展により種々の生理活性糖鎖の合成が可能となってきたが、生物学的に重要なグリコシド結合である 1,2−*cis* 型グリコシドの構築は依然として困難を伴う。一方で、エーテル性硫黄原子はカルボカチオンに親和性を持つため、グリコシル化の際に糖供与体由来のカルボカチオン中間体と 1,2−*trans* 型中間体を形成することで 1,2−*cis* 選択的グリコシル化を促進する効果が期待できる。本研究では新しい 1,2−*cis* 型グリコシド構築法の開発を目的として、反応点近傍にチオエーテルを有する糖受容体 **1** および **2** を合成しグリコシル化における反応性と立体選択性を検討した。
【方法・結果】4−メトキシフェニル β−D−ガラクトピラノシドを出発原料として、イソプロピリデン化、ベンジル化、脱イソプロピリデン化反応を順次施すことで 3,4-ジオール体を得た。続いてこのジオール体にメチルチオ酢酸を縮合させて 3 位もしくは 4 位がメチルチオアセチル化した糖受容体 **1** および **2** を合成した。同様にジオールの 3 位もしくは 4 位をプロピオニル化した糖受容体 **3** および **4** を調製した。得られた糖受容体 **1-4** に対してチオサリチル酸メチルを脱離基に持つ糖供与体 **5** を用いてグリコシル化反応を行い、その反応性と立体選択性を比較した。その結果、反応点近傍にチオエーテルを有する **1** と **2** はチオエーテルを持たない **3** および **4** に比べて高いα選択性を示すことがわかった。続いてチオエーテルを持たない糖受容体である **3** および **4** に対してチオエーテルを有する **6** を添加剤として加えてグリコシル化を行ったところ、反応性・α 選択性ともに低下した。以上の結果より、チオエーテルを分子内に導入することが α 選択性向上のために重要であることが示唆された。また、**1** および **2** とフェニルチオ糖 **7** およびフッ化糖 **8** とのグリコシル化の結果についても報告する。



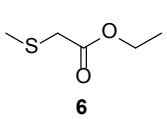
1:X=S
3:X=CH_2



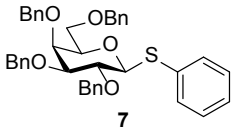
2:X=S
4:X=CH_2



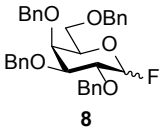
5



6



7



8

glycosylation, Oligosaccharides, Stereoselectivity

講演番号：3D34a11
講演日時、会場：3 月 28 日 11:10～ D 校舎 34 会場

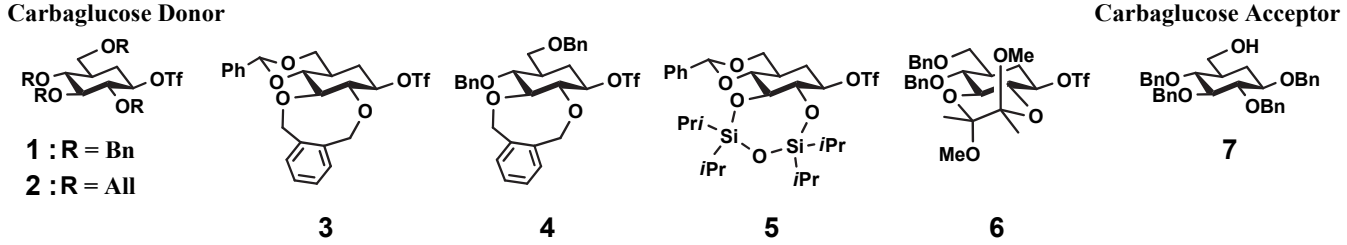
カルバグルコース同士のカップリング反応における供与体保護基の影響

Effect of the protective groups in the donor on the efficiency of the coupling reaction between the carbaglucoses

○館田 尚家、鰺坂 勝美、宮崎 達雄（新潟薬大院 応用生命科学）
○Naoya Tateda, Katsumi Ajisaka, Tatsuo Miyazaki (Grad. School of Niigata Univ. of Pharmacy and Applied Life Sciences)

カルバ糖は天然型の糖の環酸素原子がメチレン基に置換された化合物であり、糖の機能を解明するための分子ツールとして利用されてきた。また、近年では、カルバ糖を含む擬似二糖の合成が報告されている。それらはカルバ糖の導入位置により 2 つに大別され、非還元末端にカルバ糖を有するものは、相当するグルコシダーゼによる加水分解反応を起こさない特徴をもつ。一方、還元末端にカルバ糖を有するものは、アルデヒド基を有さないことよりメイラード反応などが起こりえない。ともに、アセタール構造がなくなったことが、酵素的・非酵素的反応に対する耐性に寄与していることとなる。そのため、カルバ糖のみで構成された擬似二糖は、構造安定性に優れた新規糖鎖ミミック分子として機能することが期待される。しかしながら、これまでにカルバ糖同士を効率的に繋ぐ汎用性の高い反応は見出されていない。そのため我々は、大量合成が可能なカルバ-β-D-グルコースを原料とし、カルバグルコース同士を繋ぐ反応を検討してきた。昨年度の本学会では、高濃度条件下にて、アノメリック位に種々の脱離基を有するカルバグルコース供与体 **1** と 6 位に遊離のヒドロキシ基を有するカルバグルコース受容体 **7** とのカップリング反応を検討し、中程度の収率（47%）にてカップリング生成物が得られることを報告した。本年度は、さらなるカップリング反応の収率向上を目指し、カルバグルコース供与体の保護基がカップリング反応の収率に与える影響について検討した。

まず、アリル基で保護した供与体 **2** と 2,3 位を環状保護基である *o*-xylylene 基で保護した供与体 **3** および **4** を合成した。得られた供与体と受容体 **7** に対しクラウンエーテル存在下、高濃度条件により NaH を用いてカップリング反応を行った。その結果、それぞれ 32%、42%、36%の収率にてカップリング生成物が得られた。次いで、他の環状保護基として 2,3 位に TIPDS 基を有する供与体 **5** およびブタン-2,3-ジアセタール基を有する供与体 **6** の合成を行った。現在、これらの供与体と受容体 **7** を用いたカップリング反応を検討している。



Carbaglucose, Dicarbaglucobiose, Intermolecular coupling reaction

講演番号：3D34a12
講演日時、会場：3 月 28 日 11:21～ D 校舎 34 会場

コンドロイチン硫酸 D 型オリゴ糖の化学合成

Synthesis of chondroitin sulfate D oligosaccharides

○松下 健也[1]、中田 有美[2]、田村 純一[1,2] ([1]鳥取大院工、[2]鳥取大地域環境)
○Kenya MATSUSHITA[1], Tomomi NAKATA[2], Jun-ichi TAMURA[1,2] ([1]Grad. School Eng., Tottori Univ., [2]Dep. Regional Environ., Tottori Univ.)

【目的】コンドロイチン硫酸 (CS)は、D-グルクロン酸 (GlcA)と N-アセチル-D-ガラクトサミン (GalNAc)からなる二糖単位の繰返しで構成される直鎖多糖である。CS は、この繰返し二糖の硫酸化パターンによって、CS-O、-A、-C、-D、-E などに分類されている。これら CS は、硫酸化パターンの違いによって様々な生理活性を示すことが知られている。例えば、CS-A は軸索伸長阻害作用、CS-E や CS-D はニューロン伸長促進作用のあることが報告されている。しかし、通常使用される CS は天然物由来であり、同じ型のみで構成されていない。したがって硫酸化パターンやウロン酸の 5 位の立体配置に関して構造が不均一である。そのため、実際に CS のどのような微細構造が活性発現に関与しているのかは明らかでない。これまで当研究室では、CS-O、-A、-E の合成を行ってきた。本研究では、[β-GalNAc 6S(1→4) β-GlcA 2S]を繰返し二糖単位とする CS-D の機能を明らかにするため、CS-D オリゴ糖の化学合成を行った。

【方法と結果】GalN-GlcA 二糖ユニットの合成では、隣接基関与能のないアジド基を 2 位に持つガラクトシル供与体を用いても、高収率かつ β 選択的に二糖が得られることを示した。こうして得られた二糖ユニットを用い、複数ステップを経て CS-D オリゴ糖を合成した。また、CS を合成する過程で、アセトアミドが関与する副反応を発見したのであわせて報告する。

Chondroitin Sulfate, synthesis, oligosaccharide

講演番号：3D34a13
講演日時、会場：3 月 28 日 11:32～ D 校舎 34 会場

ビオチン化ケラタン硫酸オリゴ糖の合成
Synthesis of biotinylated keratan sulfate oligosaccharides
○武田 尚子[1]、田村 純一[2] ([1]学振特研 PD、[2]鳥取大地域環境)
○Naoko TAKEDA[1], Jun-ichi TAMURA[2] ([1]JSPS Research Fellow, [2]Dep. Regional Environ., Tottori Univ.)

【目的】近年、損傷を受けた中枢神経の軸索は、損傷神経周辺のグリア瘢痕に蓄積されるプロテオグリカンなどによって再生が阻害されていることが報告されている[1)]。グリア瘢痕に蓄積されるプロテオグリカンには、ケラタン硫酸やコンドロイチン硫酸がある。さらに、脊髄損傷マウスの損傷部位をケラタナーゼで処理すると歩行機能が回復しているため、ケラタン硫酸は軸索再生阻害に密接に関与している[2)]。ケラタン硫酸は、β-D-ガラクトース(Gal)とβ-D-N-アセチルグルコサミン(GlcNAc)で構成された二糖単位の繰返し構造からなる直鎖多糖である。これら Gal と GlcNAc の 6 位はしばしば硫酸化されているため、硫酸基の有無によって複雑な硫酸化パターンをもつ多糖となる。現在研究で使用されているケラタン硫酸は天然由来である。そのため、糖鎖長や硫酸化パターンなどの分子の微細構造と軸索再生阻害の関係を議論しにくい。そこで本研究では、軸索再生阻害活性のあるケラタン硫酸の硫酸化パターンや糖鎖長を分子レベルで明らかにするため、構造が明確なケラタン硫酸オリゴ糖の合成を行うこととした。

【方法・結果】複数の硫酸化パターンをもつケラタン硫酸オリゴ糖を効率的に合成するため、本研究では二糖中間体を用いることとした。二糖中間体は、硫酸化する Gal と GlcNAc の 6 位水酸基を、それぞれ化学種選択的に除去できる保護基で保護した。この二糖中間体から誘導された供与体と受容体を縮合することによって、ケラタン硫酸オリゴ糖を位置選択的かつ立体選択的に合成した。また、糖鎖を固相担体に保持できるよう還元末端側にビオチンリンカーを導入することによって、生理活性の検証に利用可能なケラタン硫酸オリゴ糖の合成にも成功した。

References
1) McKeon R J et al., *J. Neurosci*., **11**, 3398-3411 (1991).
2) Imagama S et al., *J. Neurosci*., **31**, 17091-17102 (2011).

synthesis, oligosaccharide, Keratan sulfate

講演番号：3D34a14
講演日時、会場：3 月 28 日 11:43～ D 校舎 34 会場

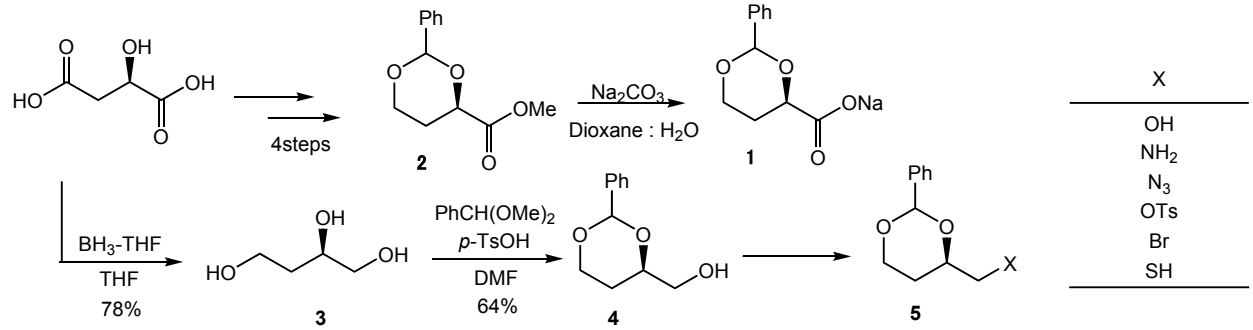
“Sugaring Tag”ライブラリーの構築
"Sugaring Tag" libary
○狐塚 哲也[1,2]、神田 由美子[1]、羽田 勝二[1]、稲津 敏行[1,2] ([1]東海大・工、[2]東海大・糖鎖研)
○Tetsuya Kitsunezuka[1,2], Yumiko Koda[1], Katsuji Haneda[1], Toshiyuki Inazu[1,2] ([1]Tokai Univ., [2]Institute of Glycoscience Tokai Univ.)

[はじめに]

Mucor hiemalis 由来の endo-β-*N*-acetylglucosaminidase(Endo-M)は天然の N 結合型糖鎖（糖鎖供与体）を GlcNAc 誘導体（糖鎖受容体）上へ転移できるため、糖鎖工学において極めて重要である。我々は、インシュリンのアミノ基を GlcNAc カルボキシメチルグリコシド誘導体（“Sugaring Tag”）で修飾し、糖鎖転移反応を行うことで人工糖タンパク質を創出できることを報告した[1)]。一方、糖鎖受容体の必須構造が GlcNAc の 4 位、6 位水酸基に相当する 1,3-ジオール構造であることを明らかにした[2)]。そこで本研究では“Sugaring Tag”のさらなる汎用性拡大のため、種々の官能基を有する 1,3-ジオール誘導体を合成し、“Sugaring Tag”ライブラリーを構築した。

[実験方法及び結果]

まず、D-リンゴ酸をハーフエステルにした後、ベンジリデン基による保護、メチルエステルの加水分解を経て、カルボン酸を有する 1,3-ジオール誘導体 **1** 得た。**1** を用いて生理活性ペプチドへの糖鎖修飾について既に報告している[3)]。同様にリンゴ酸から THF 中、三フッ化ホウ素で還元しトリオール体 **3** を得た。得られた **3** をベンジリデン基で保護し水酸基を有する 1,3-ジオール誘導体 **4** を得た。**4** から種々の官能基を有する 1,3-ジオール誘導体をそれぞれ合成し、7 種類の“Sugaring Tag”ライブラリーの構築に成功した。さらに、他の官能基を有する誘導体の合成を継続している。これら合成した“Sugaring Tag”の応用例についても現在検討中である。



1) *Carbohydr. Res.*, **2010**, *345*, 2458-2463. 2) *Carbohydr. Res.*, **2010**, *345*, 2458-2463. 3) *Tetrahedron Lett.*, **2011**, *52*, 6504-6507.

Transglycosylation reaction, Endo-M, Sugaring Tag

講演番号：3D34a15
講演日時、会場：3 月 28 日 11:54～ D 校舎 34 会場

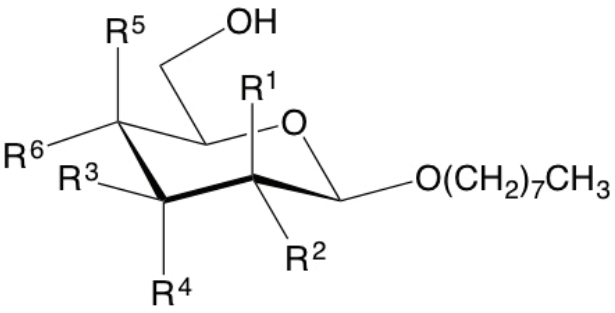
オクチルグリコシド誘導体の合成と評価

Synthesis and characterization of octyl-glycoside derivatives

長谷見 早紀、吉村 弥生、○松尾 一郎（群馬大院理工）
Saki Hasemi, Yayoi Yoshimura, ○Ichiro Matsuo (Gunma Univ.)

【目的】親水部に糖を持つ非イオン性界面活性剤は，膜タンパク質の抽出，精製，結晶化に多用されている。本研究では糖部分の水酸基の配向が異なるβ−D−オクチルグリコシド 4 種類を系統的に合成し，水酸基の配向と物性との関係を市販のβ−D−オクチルグルコシドと比較することで評価した。

【方法，結果】オクチルグルコシド（Glc），オクチルアロシド（All）およびオクチルガラクトシド（Gal）は，対応する単糖のアセチル体をイミデート体へと導いた後に，オクチルアルコールと反応，水酸基の保護基を除去することで合成した。すなわち，ペンタアセチルグルコースの 1 位のアセチル基を炭酸アンモニウムにより選択的に除去，トリクロロアセトニトリル／DBU によりイミデート化した。得られたイミデート体をジクロロメタン中，トリフルオロメタンスルホン酸を用いてオクチルアルコールと反応することで，望むβ−オクチルグルコシド体を主生成物として得た。ガラクト体も同様にアセチル体から合成した。アロ体は，ジアセトングルコースの C−３位の水酸基の立体を酸化−還元法により立体を反転，ジアセトンアロースを合成した後に，イソプロピリデン基の除去，アセチル体へと変換，1 位のイミデート化を経てオクチル体へと導いた。一方，マンノ体の合成は，ガラクト体の C−２位および C−4 位の水酸基の立体を反転することで合成した。すなわち，オクチルガラクトシドをピリジン中，塩化ピバロイルと反応することにより，C−3 位および C−6 位選択的にピバロイル基を導入した。残る遊離の水酸基をピリジン中，トリフルオロメタンスルホン酸無水物によりトリフラート化，得られたトリフラート体を酢酸セシウム／クラウンエーテル存在下，超音波処理することによりマンノ型へと変換，アセチル基を除去することでマンノ体へと導いた。得られた 4 種類のオクチルグリコシドは，糖部分の違いにより水に対する溶解度が異なること，また，等温滴定カロリメトリー（ITC）により臨界ミセル濃度（CMC）を求めた結果，CMC も糖の構造によって異なることが明らかになった。



	R1	R2	R3	R4	R5	R6
Glc	H	OH	OH	H	H	OH
Man	OH	H	OH	H	H	OH
All	H	OH	H	OH	H	OH
Gal	H	OH	OH	H	OH	H

detergent, octyl glucoside, synthesis

講演番号：3D34p01
講演日時、会場：3 月 28 日 14:00～ D 校舎 34 会場

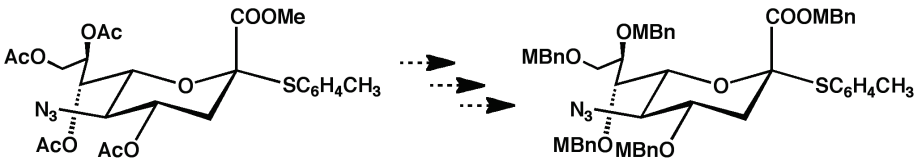
4-メチルベンジル保護シアル酸を用いたα-シアリル化の検討

Investigation of α-sialylation using 4-methylbenzyl protected sialic acid.

○武居 俊樹[1,2]、朝比奈 雄也[2]、北條 裕信[2]([1]東海大理、[2]阪大蛋白研)
○Toshiki TAKEI[1,2], Yuya ASAHINA[2], Hironobu HOJO[2] ([1]Tokai Univ., [2]Inst. Protein Res., Osaka Univ.)

我々はベンジル(Bn)保護戦略による糖アミノ酸ビルディングブロックの構築と、ペプチドライゲーション法を組み合わせた糖ペプチド(タンパク質)の合成研究を行ってきた。Bn 基を持つ糖誘導体はグリコシル化反応時に高い反応性を持つため、複雑な糖アミノ酸の構築に際して有用である。また、固相合成法によるペプチド鎖伸長後、Bn 基は低濃度 TfOH 試薬によりチオエステル結合を分解することなく脱保護することができるため、ライゲーション法における鍵物質であるペプチドチオエステルの合成に有用である。これらの長所を利用し、我々は多くの糖ペプチド、糖タンパク質の合成に成功してきた。しかしこの方法では、固相合成後にトリフルオロ酢酸によるペプチド側鎖保護基の脱保護と、続く低濃度 TfOH による糖水酸基の Bn 保護基の除去の 2 つの処理を要していた。また、糖鎖構造が複雑化するにつれて、低濃度 TfOH 試薬処理中にグリコシド結合の分解が生じ、選択的に脱 Bn 化を行うことが困難になっていた。そこで我々は、前年度大会にて、糖水酸基の保護基を Bn 基から酸感受性の高い 4-メチルベンジル(MBn)基とする新たな合成戦略を報告した。MBn 基はグリコシル化反応時に Bn 基と遜色ない反応性を有し、コア 1 型糖アミノ酸を効率よく与えた。また、最終脱保護では TFA カクテル中にてペプチド側鎖保護基の脱保護と共に、糖水酸基の MBn 保護基の脱保護も進行することが見出された。

本研究では、MBn 保護戦略の有用性をさらに検証すべく、酸感受性の高い α-シアリル結合を有する MBn 保護糖アミノ酸を調製し、グリコシド結合の分解なく、TFA カクテル中にて脱保護できるかを検証することとした。そこでまず、効率的な α-シアロシド結合の構築法を検討した。既知化合物を出発物質として MBn 保護されたシアル酸誘導体を調製した。次に、得られた糖供与体を用いて、種々の条件下で α-シアリル化の検討を行った。本発表では、グリコシル化反応の立体選択性や収率について報告する。



[1] Yuya, Asahina.; Rina, Fujimoto.; Akemi, Suzuki.; Hironobu, Hojo. *J. Carbohydr. Chem*, in press.

Sialic acid, 4-methylbenzyl, Glycosylation

講演番号：3D34p02
講演日時、会場：3 月 28 日 14:11～ D 校舎 34 会場

均一な O-結合型糖鎖を有するヒトインターロイキン-2 の全合成

Total synthesis of human interleukin-2 having homogeneous O-glycan

○朝比奈 雄也[1]、小宮 忍[2]、大萩 亜美[2]、藤本 梨奈[2]、中川 勝博[3]、佐藤 荘[3]、審良 静男[3]、石井 彰[2]、中原 義昭[2]、北條 裕信[1]（[1]阪大蛋白研、[2]東海大工生命、[3]阪大微研）

○Yuya Asahina[1], Shinobu Komiya[2], Ami Ohagi[2], Rina Fujimoto[2], Katsuhiro Nakagawa[3], Takashi Sato[3], Shizuo Akira[3], Akira Ishii[2], Yoshiaki Nakahara[2], Hironobu Hojo[1] ([1]Inst. Protein Res., Osaka Univ., [2]Appl. Biochem., Tokai Univ., [3]RIMD, Osaka Univ.)

我々は効率的な糖タンパク質の化学合成法の開発を行っており、その一環として、長年にわたりヒトインターロイキン（IL）-2 の合成に取り組んできた。しかし、C 末端側の高い疎水性領域に由来した難溶性により、その全合成の達成が阻まれていた。本研究ではこの難溶性に対して効果的な解決法を見出し、この全合成を行うことにした。

IL-2 は細胞性免疫に関わるサイトカインの一種であり、Thr[3] に *O*-結合型糖鎖を有する。セグメント縮合法によるポリペプチド鎖の構築を行うため、全長 133 残基の IL-2 を **1** (1-27)、**2** (28-65)、**3** (66-98)、**4** (99-133)の 4 つのセグメントに分け、それぞれを固相合成法により調製することにした。次に、得られたセグメント同士をチオエステル法により縮合し、目的のポリペプチド鎖を構築することにした。そこで、まず各セグメントの調製に着手した。疎水性の高いセグメント **3**、**4** の親水性を向上させるため、これらペプチドセグメント中のグルタミン酸側鎖を、HPLC 精製時の酸性条件中で高い極性と電荷を持つピコリル (Pic) エステルとして保護し、溶解性の向上を試みた。その結果、セグメント **3** では溶解性が劇的に向上し、目的とするセグメント **3** を効率的に合成することができた。より難溶性の高いセグメント **4** は Pic エステルとイソペプチド法の 2 種の可溶化法を適用することで合成に成功した。一方、糖ペプチドチオエステル **1** は前年度大会にて報告した 4-メチルベンジル (MBn) 基により保護したコア 1 型糖アミノ酸を用いることで調製された。また、プロリルチオエステル **2** は新規に設計した遊離のカルボキシ基を有する *N*-alkylcysteine を用いることで調製された。得られた 4 つのセグメントを連続的チオエステル法により縮合することで、One-pot で全長の IL-2 ポリペプチドへと導いた。ペプチド側鎖の保護基と Pic エステルを同時に除去した後、酸化還元系緩衝液中にてジスルフィド架橋の形成を行うことで、均一なコア 1 型糖鎖を有する IL-2 の合成に成功した。得られた合成糖タンパク質はリコンビナント IL-2 と同程度の T 細胞増殖活性、また、インターフェロン-γ産生活性を示したことから、正しく Folding した IL-2 が得られたことが立証された。

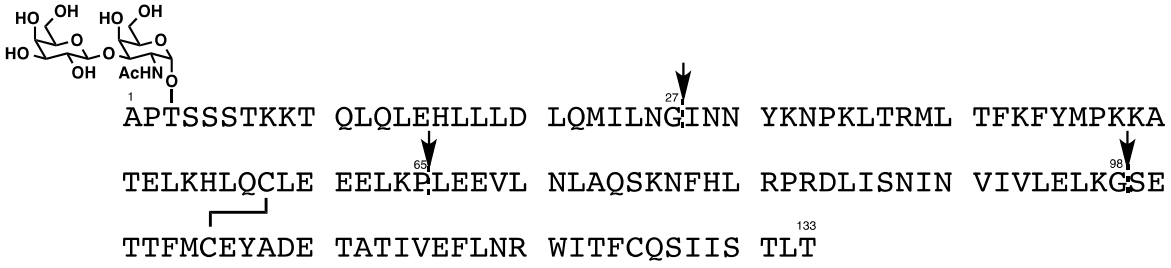


図 1　インターロイキン（IL）-2 のアミノ酸配列。矢印はライゲーションサイトを示す。

Glycoprotein, O-Glycoside, Thioester method

講演番号：3D34p03
講演日時、会場：3 月 28 日 14:22～ D 校舎 34 会場

糖ペプチド化学合成に有用な新規糖 Asn 誘導体の開発

Development of a novel glycosylated Asn derivative useful for the glycopeptide synthesis

○片山 秀和（東海大工・生命化学）
○Hidekazu KATAYAMA (Tokai Univ.)

【背景・目的】糖ペプチドの化学合成は、一般的に糖鎖修飾されたアミノ酸誘導体をペプチド固相合成に用いることによって行われる。糖アミノ酸誘導体の糖鎖部分の保護基には、アセチル基やベンジル基が広く用いられているが、これらの保護基はいずれも、ペプチド固相合成の最終脱保護に用いられるトリフルオロ酢酸(TFA)処理条件において安定であり、糖ペプチド固相合成後の脱保護には、TFA による処理とは別に糖鎖部分の脱保護反応が必要であった。そのため、TFA 処理によって脱保護可能な糖鎖保護基を有する糖アミノ酸誘導体の開発が望まれていた。TFA 感受性を示す保護基で保護された GlcNAc を付加した Asn 誘導体はこれまでに報告があるが、この誘導体の合成経路が長く、実用性に欠けるという問題点があった。本研究では、市販の GlcNAc 誘導体から TFA 感受性保護基を有する新規 Asn(GlcNAc)誘導体の簡便な合成経路を確立し、その糖ペプチド化学合成への有用性を検証することを目的とした。
【方法・結果】市販の GlcNAc 誘導体から 3 段階という短工程によって、ペプチド固相合成に用いることができる新規 Asn(GlcNAc)誘導体を得ることができた。この誘導体を用いて常法である Fmoc ペプチド固相合成法により糖ペプチドの化学合成を行った。新規誘導体を用いた合成では、期待通り TFA による脱保護のみで保護基を完全に除去することが可能であり、また従来用いられてきたベンジル基によって保護された Asn(GlcNAc)誘導体を用いた場合よりもわずかながら高い収率で目的とする糖ペプチドを得ることができた。ペプチド固相合成とその後の TFA による脱保護過程において顕著な副反応は観察されなかったことから、本研究において開発した新規糖アミノ酸誘導体は糖ペプチド化学合成に有用であると考えられる。

N-acetylglucosamine, glycopeptide, solid-phase peptide synthesis

講演番号：3D34p04
講演日時、会場：3 月 28 日 14:33～ D 校舎 34 会場

糖-タンパク質間結合を基盤とするオーガニックフレームワークの創成研究：LacNAc 含有環状ペプチドの合成研究

Investigation of organic framework based on carbohydrate-protein interactions: Synthetic study of LacNAc containing cyclic peptide

○小宮 忍[1]、中川 篤[2]、蟹江 治[1,2]（[1]東海大院 工、[2]東海大 糖鎖研）
○Shinobu Komiya[1], Atsushi Nakagawa[2], Osamu Kanie[1,2] ([1]Tokai Univ. Grad. Eng., [2]Tokai Univ., Inst. Glycosci.)

細胞表面に存在する糖鎖は、レクチンやウイルスが持つタンパク質と特異的に結合し、また、細胞間の接着やアポトーシスの制御などの重要な機能も果たしている。糖–タンパク質間の相互作用は小さいが多価性効果により結合力が増強する。生体内においては多価性の可逆反応を介して機能に応じた架橋ネットワーク構造の形成が知られている。しかし、ネットワーク構造自体がある種の機能を有する可能性については全く情報がない。当研究室では、天然に存在する糖鎖リガンドとレセプタータンパク質から形成される特異的なネットワーク構造に着目し、価数制御した糖鎖リガンドとレセプタータンパク質の特異的な分子認識を利用したオーガニックフレームワーク（Organic framework: OF）の合成研究に取り組んでいる。これまでに、価数を制御したガレクチン 3 と、スペーサーとして柔軟なヘキサエチレングリコール誘導体を用い LacNAc 構造を 2 つ有する糖リガンドにより高次構造が形成されることを AFM 観察により確認した。我々はこの糖–タンパク質間の特異的な反応を基礎として、新しい OF を構築することを目的とした。

本研究では、糖リガンドに結合したスペーサーの構造をより堅牢にすることにより OF 構造に与える影響を検討するため、糖リガンドを有する環状ペプチドの合成を行った。Fmoc CLEAR Amide Resin を用い、Fmoc 固相合成法によりペプチド鎖を伸長した。糖アミノ酸はセリン側鎖の水酸基に LacNAc を有する LacNAc-Ser 誘導体を合成し、NMP 溶媒下で HOBt-DIC 法により導入した。ペプチド鎖伸長後、MPAA とのチオエステル交換反応により目的とするペプチドチオエステルを得た。次に、HOOBt, DIEA を含む DMF に溶解、環化反応を行い、目的とする環状糖ペプチドを得ることに成功した。

organic framework, cyclic peptide, glycopeptide

講演番号：3D34p05
講演日時、会場：3 月 28 日 14:44～ D 校舎 34 会場

酵素－化学法を用いた高マンノース型糖鎖ライブラリーの合成と GlcNAc 転移酵素(GnT-I)の基質特異性解析

Construction of high-mannose-type glycan library by top-down chemo-enzymaticapproach and screening for substrate specificity of N-acetylglucosaminyltransferase-I (GnT-I)

○藤川 紘樹[1]、小泉 晶彦[1]、八須 匡和[1]、瀬古 玲[1]、武田 陽一[1]、伊藤 幸成[1,2] ([1]JST、ERATO、[2]理研、細胞制御化学)
○ Kouki FUJIKAWA[1], Akihiko KOIZUMI[1], Masakazu HACHISU[1], Akira SEKO[1], Yoichi TAKEDA[1], Yukishige ITO[1,2] ([1]JST, ERATO, [2]RIKEN, Synthetic Cellular Chemistry Lab.)

【目的】小胞体でタンパク質に付加される高マンノース型糖鎖は、カルネキシン/カルレティキュリンサイクルによるタンパク質の品質管理機構に重要な役割を果たしている。高マンノース型糖鎖の構造と機能を分子レベルで解明するためには、小胞体やゴルジ体に存在する高マンノース型糖鎖を網羅的に合成・供給する事が肝要である。

【方法及び結果】これまでに我々は、高マンノース型糖鎖の3つの分岐(A, B, C-arm)構造の末端をグルコース、ガラクトース、*N*-アセチルグルコサミンで保護した共通基質14糖を合成し、7種類の酵素でトリミングを行う「酵素－化学法による高マンノース型糖鎖のライブラリー合成」を報告してきた[1]。この研究において、中央の分岐(B-arm)末端に配置したガラクトースを加水分解する反応が、他の分岐鎖(A, C-arm)の立体障害によって、進行しにくい事が明らかとなった。そこで我々は、B-arm末端を化学的に脱保護可能なイソプロピリデン基で保護した共通基質13糖を設計し、その合成について、2013年度の大会で報告した。

この共通基質13糖のトリミング条件を検討した結果、酸加水分解反応と6種類の酵素を用いる事で、37種類の高マンノース型糖鎖のライブラリーを構築することができた。得られた高マンノース型糖鎖ライブラリーに対して、ゴルジ体に存在するGlcNAc転移酵素(GnT-I)を作用させたところ、合成した糖鎖によって、従来のGnT-Iの基質特異性が支持され、高マンノース型糖鎖のB-armとC-armの構造の違いがGnT-Iの基質特異性に影響を与えることが明らかとなった[2]。

high-mannose-type glycans, chemo-enzymatic synthesis, posttranslational modification

講演番号：3D34p06
講演日時、会場：3 月 28 日 15:05～ D 校舎 34 会場

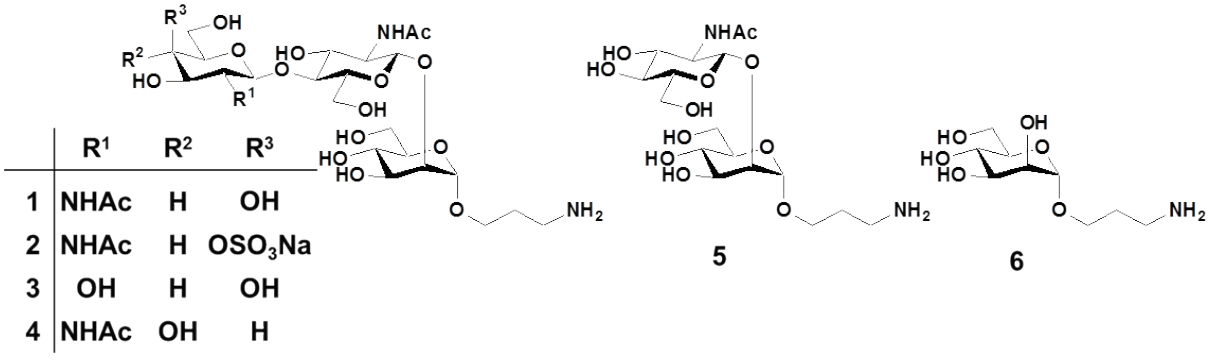
LacdiNAc 含有糖鎖の合成研究

Synthesis of LacdiNAc terminated glycans

○宇津井 隆志、濱田 真輝、石井 希実、宮沢 進平、松尾 一郎（群馬大院理工）
○Takashi Utsui, Masaki Hamada, Nozomi Ishii, Shinpei Miyazawa, Ichiro Matsuo (Gunma Univ.)

【背景】当研究室では, 有機化学的手法を用いて N-型糖鎖を中心として様々な糖鎖プローブを合成し, それを用いて，糖鎖機能の解明を行ってきた。その一環として，近年，ガン化との関連が指摘されている LacdiNAc 構造（GalNAcβ1-4GlcNAc）含有糖鎖に注目した。本構造を有する糖鎖は天然存在比が少なく, 単一な構造の糖鎖サンプルを大量に入手することは困難である。そこで, われわれは LacdiNAc 構造を有する糖鎖の機能解析に向けて，還元末端にアミノプロピル基を有する 3 糖（GalNAcβ1-4GlcNAcβ1-2Man: **1**）とその硫酸化体 **2** またラクトサミン誘導体など複合型糖鎖の部分構造（**3**～**6**）も合わせて合成した。合成した糖鎖は, アフィニティークロマトグラフィー担体の作製や, キャリアータンパク質に導入することで抗 LacdiNAc 抗体の取得など，GalNAcβ1-4GlcNAc 糖鎖の機能解明に必要なツールを提供できると考えている。

【方法・結果】目的の糖鎖を合成するにあたり，アミノプロピル基を有するマンノース受容体にグルコサミン供与体を順次カップリングさせるステップワイズ法で 3 糖骨格を構築した。非還元末端のガラクトサミン残基は，３糖の非還元末端のグルコサミン残基の 4 位水酸基の保護基を選択的に除去，トリフレート化，続く酢酸セシウム／18-crown-6 による 4 位水酸基の立体を反転することで望む LacdiNAc 構造を構築した。得られた 3 糖誘導体を脱フタロイル化，N-アセチル化，続く脱アセチル化によって，4 位に遊離の水酸基を有する LacdiNAcMan 3 糖誘導体を得た。その後，ベンジル基と Z 基を除去することで LacdiNAcMan 3 糖 **1** を合成した。硫酸化体 **2** は先に合成した 4 位に遊離の水酸基を有する LacdiNAcMan 3 糖誘導体の 4 位を硫酸化，脱保護することで合成した。複合型糖鎖の部分構造（**3**～**6**）は，LacdiNAc 糖鎖合成の際の合成中間体を脱保護することで合成した。現在，合成した糖鎖を，アフィニティーゲルや抗体作製用キャリアータンパク質等へ導入することを検討している。



	R1	R2	R3
1	NHAc	H	OH
2	NHAc	H	OSO_3Na
3	OH	H	OH
4	NHAc	OH	H

LacdiNAc, synthesis, N-glycan

講演番号：3D34p07
講演日時、会場：3 月 28 日 15:16～ D 校舎 34 会場

LPS/LOS の酸性内部コア糖鎖コンジュゲート合成
Synthesis of biotin conjugates with core oligosaccharide of LPS/LOS
○長沢 祐一[1]、蟻 瑞欽[2]、一柳 剛[3] ([1]鳥取大院・農、[2]鳥取大院・連農、[3]鳥取大・農)
○Yuichi Nagasawa[1], Ruiqin Yi[2], Tsuyoshi Ichiyanagi[3] ([1]Graduate School of Agriculture, Tottori Univ., [2]United Graduate School of Agriculture, Tottori Univ., [3]Tottori Univ.)

【背景・目的】
3-デオキシ-D-マンノ-2-オクツロン酸(Kdo)はグラム陰性細菌が産生するリポ多糖(LPS)/リポオリゴ糖(LOS)の構成糖であり、主に LPS/LOS の内部コア糖鎖の Lipid A と多糖(PS)オリゴ糖(OS)との架橋部に存在する。我々は内部コア糖鎖の機能解明に向けたプローブ合成に取り組んでおり、これまでにマンノースの C-1 または C-6 から 2 炭素伸張を行う方法で Kdo 合成法[1,2]及び Kdo を含む 2～3 糖糖鎖合成を達成してきた[3]。
本研究では合成糖鎖をビオチンおよび磁気粒子と結合させた糖鎖コンジュゲートの作成を試みた。
【方法・結果】
リンカーとしてカルボン酸ヒドラジドを選択した。これは反応条件を適切に選択することによりアミノ基、カルボキシル基のどちらの官能基にも縮合可能である。糖鎖にはアリル基を有する Kdo、Kdo2 糖、および分岐 3 糖を用いた。まず、糖鎖とチオグリコール酸メチルを水溶液中、室温で高圧水銀ランプ照射下反応させた。次にヒドラジン水溶液を作用させヒドラジンアミドを有する Kdo 糖鎖を得た。この糖鎖をスルホ-NHS-ビオチンとの縮合によりコンジュゲート体合成を達成した。現在アミノ基を有する磁気粒子に亜硝酸塩を活性化剤に用いた縮合を検討しており、これらの結果を合わせて報告する。
【まとめ】
カルボン酸ヒドラジドをリンカーとして用いて Kdo 糖鎖-ビオチン、-磁気粒子コンジュゲート体の合成に成功した。

[1] Ichiyanagi, T. *et. al. J. Carbohydr. Chem.* **2009**, *28*, 58. [2] Ichiyanagi, T. *et. al. Tetrahedron* **2011**, *67*, 5964. [3] Yi, R. *et. al. Tetrahedron* **2014**, *70*, 3675.

LPS/LOS, Kdo, Biotin conjugate

講演番号：3D34p08
講演日時、会場：3 月 28 日 15:27～ D 校舎 34 会場

分子内グリコシル化反応を利用する Kdo2 糖の合成研究

Synthesis of a 2-4 linked Kdo disaccharide by using intramolecular glycosylation

○田坂 瑞葵[1]、一柳 剛[2] ([1]鳥取大院・農、[2]鳥取大・農)
○Mizuki TASAKA[1], Tsuyoshi ICHIYANAGI[2] ([1]Graduate School of Agriculture, Tottori Univ., [2]Tottori Univ.)

【目的】

グラム陰性細菌は細胞外膜に複合糖脂質であるリポ多糖(LPS)/リポオリゴ糖(LOS)を産生する. LPS は O 抗原多糖，オリゴ糖鎖(OS)，Lipid A から成り，LOS は O 抗原多糖を欠損している．OS 内には構造変異が少ないコア糖鎖領域が存在し，酸性糖 3-deoxy-D-*manno*-oct-2-ulosonic acid (Kdo)は OS と Lipid A との架橋部に 1～3 分子の形で存在する．我々は Kdo を含むコア糖鎖合成を目指しており，これまでに Kdo 鍵中間体の合成方法を確立し，Kdo2 糖糖鎖および分岐 3 糖の合成を達成している[1]. しかし Kdo 誘導体を糖供与体に用いるグリコシル化では 3-デオキシ糖である理由から立体制御に改善の必要があった．本研究では，Kdo 糖供与体 1 位のカルボキシル基と Kdo 糖受容体 5 位をエステル化し，続いて糖受容体 4 位水酸基との分子内縮合を行うことで問題の解決を試みた.

【方法と結果】

D-マンノースから 8 段階の合成を経て Kdo 糖鎖合成に適した Kdo 鍵中間体を合成した．この化合物のアノマー水酸基をパラジウム触媒と炭酸アリルエチルによりアリル化したのち 90%トリフルオロ酢酸水溶液で 4, 5-ジオール体を得た．続いて塩化トリエチルシリルにより 4 位を選択的に保護することで糖受容体とした. 一方, アノマー水酸基を三フッ化ジメチルアミノ硫黄によりフッ素に変換し, ブチルリチウムとエタンチオールから系内調製したリチウムチオエトキシドによりメチルエステル部分のみの脱保護を行い，カルボキシル基を有する糖供与体を得た．続く糖供与体と糖受容体のエステル化において，いくつかの縮合剤で反応は進行したが 5 位水酸基の立体障害，および求核性が乏しいため，収率およびエステル結合の位置選択性に課題があった．さらに縮合剤を検討した結果，2-メチル-6-ニトロ安息香酸無水物が最適であることがわかった. 得られたエステル体を用い分子内縮合を行い，グリコシド結合を生成したものと，副生物としてグリカールを経由し 1,4-付加した 2 糖が得られた．今回はそのグリコシル化反応の詳細および反応条件の検討の結果を報告する.

[1] Ichiyanagi, T. *et. al. Tetrahedron*, **2011**, *67*, 5964-5971, Yi, R. *et. al. Tetrahedron*, **2014**, *70*, 3675-3682.

LPS, glycosylation, Kdo

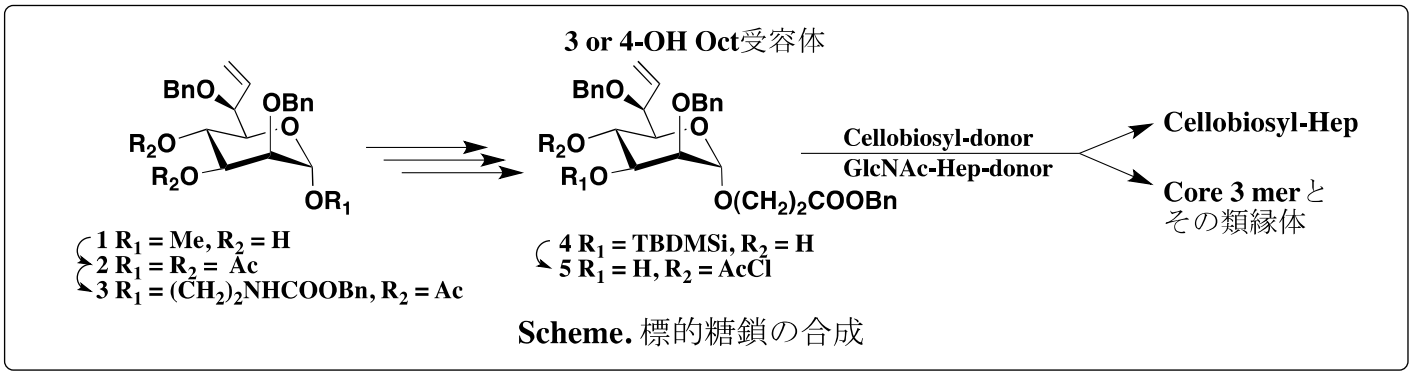
講演番号：3D34p09
講演日時、会場：3 月 28 日 15:38～ D 校舎 34 会場

髄膜炎菌の産生するリポオリゴ糖の部分糖鎖合成

Synthesis of partial oligosaccharides expressed on neisserial lipooligosaccharides

○岸本 勝也、内田 佑介、金岡 研生、山崎 良平（鳥取大・農）
○Katsuya KISHIMOTO, Yusuke UCHIDA, Kensei KANAOKA, Ryohei YAMASAKI (Tottori Univ.)

ナイセリア属病原性細菌は、オリゴ糖鎖と Lipid A が結合した、糖脂質、リポオリゴ糖 (Lipooligosaccharide, LOS) を産生する。このオリゴ糖鎖は、保存された 5 糖、GlcNAc-Hep[II]-Hep[I]-$(KDO)_2$ と Hep[I]あるいは Hep[II]に結合した短い可変糖鎖からなる。我々は、近年の免疫化学分析により、ヒト血清中の抗体は、KDO 架橋部ではなく、Hep[I]から伸長した部分糖鎖 (Lacβ1-4Hep, Lac-Hep-Hep) を認識することを報告している [1)]。しかしながら、他のどのような糖鎖構造を認識するのか明らかでない。本研究では、髄膜炎菌由来の部分糖鎖構造、セロビオース (Glcβ1-4Glc)β1-4Hep、コア 3 糖 (GlcNAcα1-2Hepα1-3Hep) とその類縁体の合成を目指した。



Scheme. 標的糖鎖の合成

部分糖鎖合成のグリコシル化受容体として Hep の前駆体であるオクトース (Oct) 中間体 **1** を用いた。化合物 **1** から 3 工程でスペーサー化した Oct 体 **3** へ変換[(2)]。この中間体 **3** を、3,4-diol、3 位の選択的 TBDMSi 化し、4-OH 受容体 **4** に変換し、この受容体と Cellobiose 供与体とをグリコシル化、ビニル基の酸化開裂/還元後、Hep とし、Cellobiosylβ1-4Hep を合成した。また、3,4-diol-Oct 体 **1** から 3-OH 受容体 **5** を合成し、GlcNAc-Hep 供与体とカップリングした。これら部分糖鎖とその類縁体の合成の結果を報告する。

1) R. Yamasaki et. al, *Infect. Immun.*, **78** (2010) 3247-3257. 2) R. Yamasaki et. al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **76** (2012) 772-777.

oligosaccharide, lipooligosaccharide, synthesis

講演番号：3D34p10
講演日時、会場：3 月 28 日 15:49～ D 校舎 34 会場

デオキシ化糖を含む蛍光標識化糖脂質の化学合成研究

Synthetic study of fluorescently tagged glycosphingolipids carrying deoxysugar.

○藤本 梨菜[1]、中川 篤[2]、蟹江 治[2,3]([1]東海大工、[2]東海大　糖鎖研、[3]東海大院工)
○Rina Fujimoto[1], Atsushi Nakagawa[2], Osamu Kanie[2,3] ([1]Tokai Univ., Dept. Eng., [2]Tokai Univ., Inst. Glycosci., [3]Tokai Univ., Grad. Eng.)

糖脂質は細胞膜に存在し、細胞間認識や細胞接着、シグナル伝達において重要な役割を果たしている。糖脂質の糖鎖修飾は糖転移酵素群の連続反応により達成されるが、その修飾機構の全容については未解明な点が多い。この問題に取組むためラクトシルセラミド（LacCer）を蛍光標識化した類縁体の細胞内動態解析がおこなわれた。すなわち、蛍光標識化 LacCer の細胞内における物質変換過程を、共焦点顕微鏡観察と nanoLC 蛍光分析–MS を用いて解析した結果、LacCerBODIPY が多数のガングリオシドや中性糖脂質へ変換されたことが明らかとなった。しかし、生体内においては複数の酵素反応が同時進行するため、合成過程を詳細に解析することは極めて困難であった。

この克服には生体内における糖転移反応を選択的に制御する事が有効であると考えられた。LacCer のガラクトース残基の 3 位、及び 4 位水酸基はそれぞれ *N*-アセチルガラクトサミン転移反応とシアル酸転移反応に関与している。すなわち、LacCer をよう起点として多様な糖脂質が形成される。そこで糖鎖伸長部位となる水酸基をデオキシ化し、細胞内における複雑な糖転移反応の一部を遮断し、選択的な反応制御が可能であると予想した。

本研究の目的は、残基の 3 位または 4 位をデオキシ化した非天然型 LacCerBODIPY の合成である。はじめに Lactose 類縁体のグリコシルドナーとなるデオキシ化糖の合成を行った。Bn 基で保護したチオ糖の 3 位、及び 4 位水酸基をチオカルボニル化し、ラジカル条件下でデオキシ化した後、フッ化糖へ導いた。アクセプターとなるグルコース誘導体は 4 位デオキシ化糖の中間体であり、一連の合成経路において効率よく得ることに成功した。さらに合成した 4 位デオキシ化糖とグルコース誘導体のグリコシル化を行った。反応温度-78℃、EtCN 溶液中で Cp_2HfCl_2 と AgOTf を用いた結果、Lactose 類縁体を収率 69%(α / β=45/55)で得た。次に N_3 基と Bn 基で保護したスフィンゴシン（Sph）誘導体を合成し、4 位デオキシ化糖を含む Lactose 類縁体とグリコシル化を行った。EtCN 溶液中 NIS-AgOTf を用いて縮合反応をおこない、目的とする β グリコシドの LacSph 類縁体を得ることに成功した。また、選択的脱保護の可能な保護基についても検討した結果を報告する。

glycosphingolipids, deoxysugar, fluorescent tag

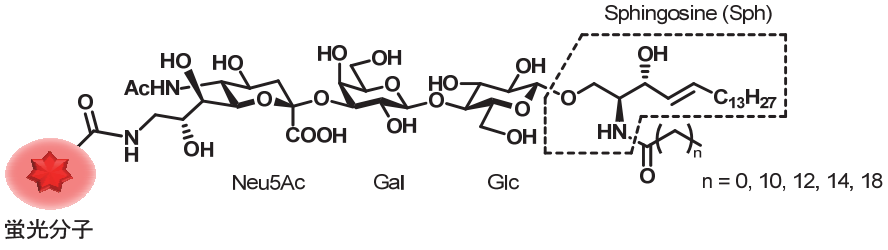
講演番号：3D34p11
講演日時、会場：3 月 28 日 16:10～ D 校舎 34 会場

脂質ラフトの一分子イメージングに向けた脂質変換型蛍光 GM3 プローブの合成

Synthesis of lipid-modified ganglioside GM3 probes for the single molecule imaging of lipid raft

○山崎 彩乃[1]、河村 奈緒子[1,2]、鈴木 健一[2]、安藤 弘宗[1,2]、今村 彰宏[1]、石田 秀治[1]、楠見 明弘[2]、木曽 真[1,2] ([1]岐阜大・応用生物、[2]京都大・iCeMS)
○Ayano YAMAZAKI[1], Naoko KOMURA[1,2], Kenichi G. N. SUZUKI[2], Hiromune ANDO[1,2], Akihiro IMAMURA[1], Hideharu ISHIDA[1], Akihiro KUSUMI[2], Makoto KISO[1,2] ([1]Gifu Univ., [2]iCeMS)

【目的】
脂質ラフトは、さまざまな脂質分子が集合したメソスケールの機能性細胞膜ドメインであり、シグナル伝達や膜輸送において重要な役割を担っている。我々は、ラフトを構成する主要なガングリオシドの一つである GM3 の挙動を一分子観察により直接観察することで、ラフトの形成機構および機能解明を目指している。この目的を達成するために、シグナル分子受容体と協奏的に機能する GM3 の蛍光プローブが必要となる。我々はこれまでに脂質部分に C18 の脂肪酸を有する GM3 プローブを合成し、ラフト分配特性及びシグナル分子受容体との親和性を調べることで、この蛍光 GM3 がラフト分子としての性質を保持した有用なプローブであることを確認した。
本研究では GM3 の脂質部分の構造がラフト分子としての特性に与える影響を明らかにするために、脂肪酸部分の炭素鎖長の異なる蛍光 GM3 プローブの合成を目的とした。
【方法・結果】
これまでの蛍光 GM3（C18）の機能評価の結果を踏まえ、標識位置をシアル酸 9 位に設定した。種々の脂質変換型 GM3 を効率的かつ系統的に合成するため、共通の鍵中間体として GM3 構造から脂肪酸を除いたアミノ体（lyso-GM3 保護体）を設計し、この分子に種々の脂肪酸の導入を行う経路を考案した。
まず、lyso-GM3 保護体の構築に向け、還元末端ユニットとして、N_3-Sph をアグリコンに有する Glc-Sph 受容体の合成を行った。Glc 供与体と Sph 受容体との縮合の際に、酸性条件下での PMB 基の脱離が問題となったが、酸補捉剤存在下での温和な条件を確立することで、収率の向上に成功した。次にこの受容体とシアル酸 9 位を TFA アミド基で置換した Neu-Gal 供与体との縮合、N_3 基の還元を経て、共通中間体となる lyso-GM3 保護体を合成した。続いて、炭素鎖長の異なる脂肪酸（C2、C12、C14、C16、C20）を収率よく導入し、GM3 骨格を得た後、保護基の除去によりアミノ GM3 へと誘導した。最後にシアル酸 9 位アミノ基に対して蛍光標識を導入し、目的化合物の合成を達成した。



脂質変換型蛍光GM3

lipid raft, single molecule imaging, lipid-modified ganglioside

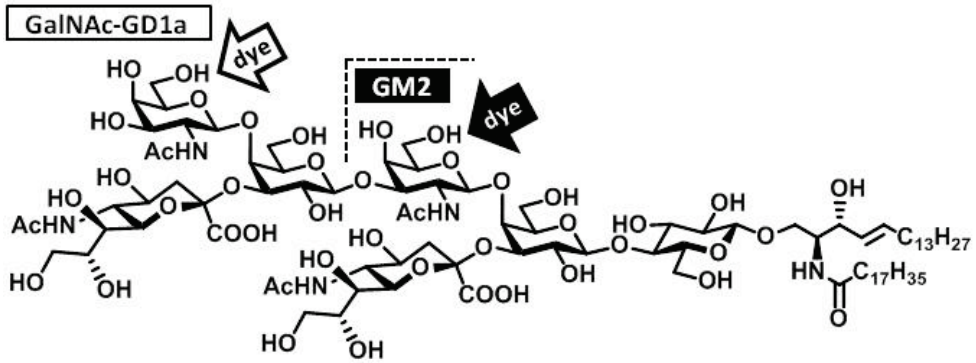
講演番号：3D34p12
講演日時、会場：3 月 28 日 16:21～ D 校舎 34 会場

脂質ラフトの一分子イメージングに向けたガラクトサミン標識ガングリオシドプローブの合成

Synthesis of fluorescent galactosamine-containing ganglioside probes for single molecule imaging of lipid raft

○小池田 真知[1]、河村 奈緒子[1,2]、鈴木 健一[2]、安藤 弘宗[1,2]、今村 彰宏[1]、石田 秀治[1]、楠見 明弘[2]、木曽 真[1,2] ([1]岐阜大・応用生物、[2]京都大・iCeMS)
○Machi KOIKEDA[1], Naoko KOMURA[1,2], Kenichi G. N. SUZUKI[2], Hiromune ANDO[1,2], Akihiro IMAMURA[1], Hideharu ISHIDA[1], Akihiro KUSUMI[2], Makoto KISO[1,2] ([1]Gifu Univ., [2]iCeMS)

【目的】脂質ラフトは機能性の細胞膜ドメインであり、シグナル伝達等の様々な生命現象に密接に関与している。我々はラフト分子の離合集散を一分子観察法により捉える事で、ラフトの機能解明を目指している。この目的の達成には、シグナル分子受容体と協奏的に機能するガングリオシドの一分子観察用プローブが必須である。我々はこれまでに糖鎖の標識位置がガングリオシドのラフト分子としての特性に影響を与え、糖鎖末端が適切な標識位置であることを示した。本研究では重要なラフト関連ガングリオシドの中でも GM2、asialo-GM2、GalNAc-GD1a を標的とし、それぞれの糖鎖末端であるガラクトサミン 6 位を標識位置とした蛍光ガングリオシドプローブの合成を目指した。
【結果】蛍光標識を位置選択的に導入するために、標的のガラクトサミン 6 位水酸基をアミノ基で置換することとした。これに向け 6 位をアジド基、2 位をトリクロロアセトアミド基で置換した新規ガラクトサミン供与体を合成した。この供与体と、シアリルガラクトース[1]及びガラクトース受容体をそれぞれ縮合反応に供する事で、GM2 及び asialo-GM2 のコア構造を構築した。これらに亜鉛と酢酸を作用させることで、ガラクトサミン 6 位のアミノ基への還元と、2 位のアセトアミド基への還元を一段階で効率的に行うことに成功した。そして 6 位をトリフルオロアセトアミド基へ変換した後に供与体へとそれぞれ誘導し、続くグルコシルセラミド受容体[2]との縮合反応により、GM2 及び asialo-GM2 骨格を構築した。その後、保護基の除去、蛍光標識の導入を経て目的とする蛍光 GM2 及び asialo-GM2 の合成を達成した。さらに合成した GM2 コア三糖供与体を用い、GalNAc-GD1a コア六糖の構築に成功し、同様に変換を行うことで蛍光 GalNAc-GD1a の合成を試みたので報告する。



[1] *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 6883－6886; [2] *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 3009－3023.

ganglioside, lipid raft, single molecule imaging

講演番号：3D34p13
講演日時、会場：3 月 28 日 16:32～ D 校舎 34 会場

脂質ラフトの一分子イメージングに向けた b 系列ガングリオシドプローブの合成研究

Development of b-series ganglioside probes useful for single molecule imaging of lipid raft

○小西 美紅[1,2]、鈴木 健一[2]、今村 彰宏[1]、安藤 弘宗[1,2]、石田 秀治[1]、楠見 明弘[2]、木曽 真[1,2] ([1]岐阜大・応用生物、[2]京都大・iCeMS)
○ Miku KONISHI[1,2], Kenichi G. N. SUZUKI[2], Akihiro IMAMURA[1], Hiromune ANDO[1,2], Hideharu ISHIDA[1], Akihiro KUSUMI[2], Makoto KISO[1,2] ([1]Gifu Univ., [2]iCeMS)

【目的】機能性細胞膜ドメインである脂質ラフトは、シグナル伝達、細菌やウイルスの感染等に密接に関わっている。我々はラフト分子の離合集散を一分子追跡法により直接観察することで、脂質ラフトの形成機構及び脂質ラフトを介したシグナル伝達の仕組みの解明を目指している。そのためには、シグナル分子受容体と協奏的に機能するカングリオシドの可視化を可能とするプローブが必須である。我々はこれまでに蛍光ガングリオシドプローブの開発に取り組み、蛍光分子の糖鎖への導入位置がガングリオシドのラフト分子としての特性に影響を与えることを示し、糖鎖末端に蛍光分子を導入した a 系列ガングリオシド GM3 及び GM1 がラフト分子として機能する可能性が高いことを報告した。本研究では中枢神経系に特異的に発現し、糖鎖末端にジシアリルガラクトース(Neuα(2→8)Neuα(2→8)Gal)配列を有する b 系列ガングリオシドに着目し、その中でも直鎖構造であるガングリオシド GD3 の蛍光プローブ合成を目指した。
【結果】これまでの結果より、糖鎖末端に位置する標的水酸基をアミノ基前駆体で置換し、合成の最終段階でアミノ中間体へ蛍光分子を導入することとした。本合成では末端シアル酸の 9 位を蛍光分子導入位置とし、9 位をアジド基で保護したシアル酸供与体とシアリルガラクトース受容体とのグリコシル化反応により、ジシアリルガラクトース骨格を構築する経路を考案した。シアル酸 8 位水酸基は、5 位アセトアミド基との水素結合により反応性が低下していると考えられるため、1 位カルボキシル基と 5 位アミノ基間でラクタムを形成し、8 位水酸基の低反応性を改善することとした[1]。出発物質として大量合成が可能な *N*-Troc シアリルガラクトースユニット[2]を用い、ラクタム型受容体へと導いた後、シアル酸供与体とのグリコシル化反応に供することにより、高収率でジシアリルガラクトース構造を得ることに成功した。続いて、末端シアル酸 9 位のアジド基をトリフルオロアセトアミド基に変換し、供与体へと導いた後、グルコシルセラミドカセットアプローチによる効率的な脂質導入、保護基の脱保護、蛍光分子の導入により蛍光ガングリオシド GD3 の合成を達成した。本発表では、これらの詳細について報告する。

[1] H. Ando, Y. Koike, S. Koizumi, H. Ishida, M. Kiso, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 6759-6763.
[2] T. Fuse, H. Ando, A. Imamura, N. Sawada, H. Ishida, M. Kiso, T. Ando, S.-C. Li, Y.-T. Li, *Glycoconjugate J.* **2006**, *23*, 329-343.

lipid raft, ganglioside, disialic acid

講演番号：3D34p14
講演日時、会場：3 月 28 日 16:43～ D 校舎 34 会場

MBP のリガンド糖鎖認識機構解明を指向したルイス a タンデムリピートの合成
Systematic synthesis of the Lewis A tandem repeat for elucidating the recognition mechanism of MBP

○小林 大輔[1]、山路 智也[1]、植木 章晴[1,2]、安藤 弘宗[1,2]、石田 秀治[1]、木曽 真[1,2]（[1]岐阜大・応用生物、[2]京都大・iCeMS）
○Daisuke KOBAYASHI[1], Tomoya YAMAJI[1], Akiharu UEKI[1,2], Hiromune ANDO[1,2], Hideharu ISHIDA[1], Makoto KISO[1,2] ([1]Gifu Univ., [2]iCeMS)

【背景・目的】動物レクチンの一種であるマンノース結合タンパク質（mannose-binding protein : MBP）は、微生物表面に存在する糖鎖を認識して結合すると、レクチン経路を介して補体系を活性化し、種々の微生物を排除することが知られている。一方で、近年、ヒト結腸がん細胞上に存在する N-結合型複合型糖鎖と MBP の複合体が形成されることにより、顕著ながん増殖抑制作用を示すことが報告された[1)]。その結合に関与する糖鎖はガラクトース β(1-3) グルコサミンからなるI型ラクトサミンにフコースが α(1-4) 結合したルイス a 糖鎖が 4 回以上繰り返された構造（ルイス a タンデムリピート）であると推定されているが、その詳細な認識機構は未だ明らかとなっていない。我々は、この MBP のリガンド糖鎖認識機構及びがん増殖抑制機構を解明することにより、糖鎖ワクチンを用いた新規がん治療法への展開が期待できると考えた。

そこで本研究では、MBP が認識する糖鎖の最小有効構造の決定及びその認識機構解明を目的とし、4-6 量体からなるルイス a タンデムリピート（12-18 糖）の効率的合成を行った。

【方法・結果】鍵中間体となるルイス a 3 糖ユニットには、合成終盤における反応性の低下を防ぐため電子供与基である Bn 基を多数導入し、またグリコシル化反応にて高い反応性及び立体選択性を示すトリクロロアセチル基をグルコサミンのアミノ基の保護基として用いた。さらに ^{1}H-NMR にて特徴的なピークを示す TBDPS 基をグルコサミンの 1 位に、アリル基をガラクトースの 3 位にそれぞれ導入し、糖鎖伸長に伴い複雑化する生成物を容易に確認するためのタグとして利用することとした。また、これらの保護基は選択的脱保護が可能であり、鍵中間体から 3 糖供与体、受容体へと容易に導くことができた。さらに、これらをグリコシル化反応に供することにより、高収率で 2 量体（6 糖）を合成することが可能となった。得られた 2 量体は先と同様に簡便かつ高収率で 6 糖供与体、受容体へと変換され、そのグリコシル化反応においても、高い反応性と立体選択性をもって、4 量体からなるルイス a タンデムリピート（12 糖）骨格を効率的に合成することに成功した。この 12 糖に対し、リンカー及びビオチン基の導入、脱保護を行うことにより、4 回繰り返し構造を有するビオチン標識ルイス a タンデムリピートの合成を達成した。

さらに本手法を応用し、5、6 量体からなるルイス a タンデムリピート（15、18 糖）の合成検討を行った。本発表ではその結果も併せて報告する。

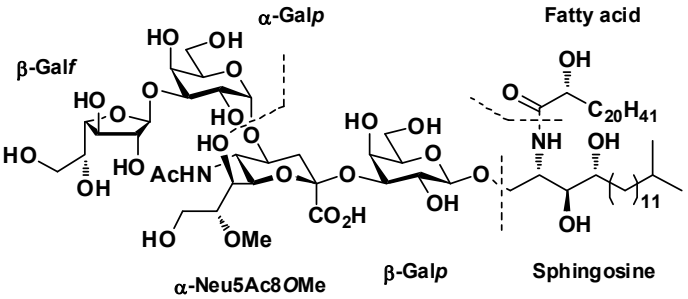
1) T. Kawasaki, *et al*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1999**, *96*, 371-375.

Oligosaccharide synthesis, Lewis A tandem repeat, MBP

講演番号：3D34p15
講演日時、会場：3 月 28 日 16:54～ D 校舎 34 会場

コブヒトデ由来ガングリオシド PNG-2A の全合成
Total synthesis of ganglioside PNG-2A isolated from *Protoreaster nodosus*
○後藤 健太[1]、鈴木 達哉[1,2]、玉井 秀樹[1,2]、安藤 弘宗[1,2]、今村 彰宏[1]、石田 秀治[1]、木曽 真[1,2] ([1]岐阜大・応用生物、[2]京都大・iCeMS)
○Kenta GOTO[1], Tatsuya SUZUKI[1,2], Hideki TAMAI[1,2], Hiromune ANDO[1,2], Akihiro IMAMURA[1], Hideharu ISHIDA[1], Makoto KISO[1,2] ([1]Gifu Univ., [2]iCeMS)

【目的】ヒトデ、ナマコなどの棘皮動物に由来するガングリオシドは、神経成長因子 NGF 存在下、マウス副腎髄質由来褐色細胞腫 PC-12 に対し、強力な神経突起伸展活性を示すことが明らかとなっている。それら棘皮動物由来ガングリオシドは特異な修飾を受けたシアル酸を有するものが多く、その構造と神経突起伸展活性との相関を解明することにより、神経疾患に対する治療薬の開発ができるのではないかと期待されている。中でも、シアル酸 8 位水酸基がメチル化されたガングリオシド LLG-3 や GAA-7 は特に強力であると報告されている [1]。今回我々は、コブヒトデから単離されたガングリオシド PNG-2A [2]の奇異な構造、すなわちシアル酸 8 位がメチル化され 4 位がα-ガラクトピラノシル化を受けた構造に注目した。PNG-2A も 8 位がメチル化されたシアル酸を持つことから同様に強力な活性を示すことが期待されるが、その活性は未だ調べられていない。そこで、本研究ではその活性評価を行うため、PNG-2A の全合成を行うこととした。
【方法・結果】本研究では、PNG-2A を、ガラクトフラノシルガラクトピラノース、シアリルガラクトース、アジドスフィンゴシン、α-ヒドロキシ脂肪酸の各ユニットに分け、収斂的に合成することとした。シアリルガラクトースユニットは、大量調製が可能な *N*-Troc シアリルガラクトース誘導体を出発物質として 5 段階の反応の後、シアル酸 8 位水酸基のメチル化を行うことで効率的に合成した。また、シアル酸 4 位への二糖導入においては、当研究室で見出された DTBS 効果 [3]を用いることで立体選択的にα-グリコシド結合を構築した。得られた四糖は供与体へと変換し、アジドスフィンゴシン、α-ヒドロキシ脂肪酸を順次導入した後、脱保護を行うことにより PNG-2A の全合成を達成した。



[1] M. Kaneko, T. Yamada, M. Inagaki, R. Higuchi, *Chem. Pharm. Bull.* **2007**, *55*, 462-463.
[2] K. Pan, C. Tanaka, M. Inagaki, R. Higuchi, T. Miyamoto, *Mar. Drugs*, **2012**, *10*, 2467-2480.
[3] A. Imamura, H. Ando, S. Korogi, G. Tanabe, O. Muraoka, H. Ishida, M. Kiso, *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 6725-6728.

ganglioside, total synthesis, echinoderms

講演番号：3F11a01
講演日時、会場：3 月 28 日 09:00～ F 校舎 11 会場

加齢による味嗜好性の変化

Analysis of age-dependent change in taste preferences between young and aged mice

○幸田 理恵、成川 真隆、三坂 巧（東大院農生科・応生化）
○ Rie KOHTA, Masataka NARUKAWA, Takumi MISAKA (Dept.Appl.Biol.Chem., The Univ.Tokyo)

【背景と目的】超高齢社会となった現在、高齢者の食生活を豊かにし、健康維持へつなげることに関心が寄せられている。ヒトは年齢の増加とともに食に対する嗜好性が変化する。そのため、加齢による嗜好性の変化を考慮した食事の提供は生活の質（QOL）を維持する上で重要であると考えられる。しかし、加齢によりどの味質がどの程度変化するのかという定量性に関する統一的な見解は得られていない。また、どのように嗜好性の変化が生じるのかについても、その詳細なメカニズムは明らかではない。本研究では若齢マウスと高齢マウスの味嗜好性を比較し、加齢に伴う味嗜好性の変化を評価した。さらに、加齢が味を検出する味細胞のターンオーバーに与える影響についても調査した。
【方法】本研究においては、若齢モデルとして 8 週齢、高齢モデルとして 120 週齢の雄性 C57BL/6J マウスを用いた。味嗜好性評価は、(1)5 秒間に水溶液を舐めた回数から嗜好性を算出するリッキング法と、(2)水と味溶液を 48 時間提示し、各々の飲水量の比率から嗜好性を算出する 48 時間二瓶選択法の二つを行い、両者をもって比較した。味溶液として、デナトニウム（苦味）、クエン酸（酸味）、スクロース（甘味）、グルタミン酸 Na＋イノシン酸 Na（旨味）と NaCl（塩味）の五基本味を用いた。さらに、味細胞のターンオーバー速度の変化を解析するために、味嗜好性試験終了後、腹腔内にチミジンアナログであるブロモデオキシウリジン（BrdU）を投与してサンプルの組織染色を行い、味蕾における BrdU 陽性細胞をカウントすることによって味細胞のターンオーバーの速度を解析･検討した。
【結果】加齢により嗜好性の変化が観察された。特に塩味と苦味に対して顕著な嗜好性の変化が見られた。一方で、加齢による影響が少ない味質も観察されたことから、加齢により影響を受けやすい味質と受けにくい味質が存在する可能性が考えられた。若齢と高齢マウスの味蕾における BrdU 陽性細胞数を比較したところ、高齢マウス味蕾において BrdU 陽性細胞が減少する傾向が観察された。従って、加齢が味細胞のターンオーバー速度に影響する可能性も示唆された。
本研究の一部は総合科学技術・イノベーション会議の SIP（戦略的イノベーション創造プログラム）「次世代農林水産業創造技術」によって実施された。

aging, taste preference, mice

講演番号：3F11a02
講演日時、会場：3 月 28 日 09:11～ F 校舎 11 会場

味刺激に暴露したマウスにおける味嗜好性の変化
Individual differences in taste preferences of mice after strong taste stimulus
○谷下 道大[1]、匂坂 美輝[2]、成川 真隆[2]、三坂 巧[2]([1]東大農、[2]東大院農生科・応生化)
○MICHIHIRO TANISHITA[1], Miki SAGISAKA[2], Masataka NARUKAWA[2], Takumi MISAKA[2]
([1]The Univ. Tokyo, [2]Dept. Appl. Biol. Chem., The Univ. Tokyo)

【背　景】動物は本能的においしいものとまずいものを区別することができる。しかし一方でヒトにおいては、食物に対する好き嫌いが個人により大きく異なる。これには育った地域や環境などの影響が考えられるが、その詳細は不明である。現在我々は食嗜好性の変化が生じる仕組みを明らかにするために、マウスを用いて食嗜好性変化の評価モデル構築を試みている。本研究では食経験の有無に着目し、特定の味刺激への暴露により味嗜好性が変化するかどうかについて検討した結果について報告する。

【方　法】実験にはC57BL/6Jマウスを用いた。6週齢のマウスに3日間カプサイシン溶液を提示した。8週齢に達した時点でカプサイシン溶液および基本味溶液に対する嗜好性を48時間二瓶選択法により評価した。また、カプサイシン受容体である TRPV1 をノックアウトした TRPV1 KO マウスを用いて同様の解析を行い、カプサイシン対する嗜好性の変化における TRPV1 の関与を調査した。

【結　果】カプサイシンへの暴露により、カプサイシン溶液に対する忌避性が低下する傾向が認められた。この作用は TRPV1 KO マウスでは観察されなかった。従って、カプサイシンに対する嗜好性の変化は TRPV1 を介した作用であることが考えられた。また、この嗜好性変化が口腔内味覚システムの変化により導かれたのかどうか、Brief access test 及び味覚シグナル関連分子の発現解析により検討している。

本研究の一部は総合科学技術・イノベーション会議の SIP（戦略的イノベーション創造プログラム）「次世代農林水産業創造技術」によって実施された。

taste preference, taste stimulus, capsaicin

講演番号：3F11a03
講演日時、会場：3 月 28 日 09:22～ F 校舎 11 会場

カプサイシン刺激によって生ずる大脳皮質における SNAP25 発現変動の発生要因の探索

Factors that affect SNAP25 expression pattern in response to capsaicin stimulus in mice cerebral cortices

○匂坂 美輝、成川 真隆、三坂 巧（東大院農生科・応生化）
○Miki SAGISAKA, Masataka NARUKAWA, Takumi MISAKA (The Univ. Tokyo)

【目的】　食事を摂取した際に生ずる味覚や食感などの情報は、大脳皮質味覚野・体性感覚野において認識される。このような食関連情報が処理される脳領域について、ある程度明らかにされているものの、食関連情報が脳にどのような変化をもたらすかについてはほとんど解明されていない。我々はこれまで、母乳から母乳以外へと食環境が劇的に変化する離乳期に着目し、離乳期の食刺激によってシナプス関連タンパク質である SNAP25 の発現が増加することを見出した。さらに、離乳期のマウスにカプサイシンを与えることで、大脳皮質味覚野・体性感覚野の尾側領域において SNAP25 タンパク質の発現領域が拡大することを明らかにしてきた。そこで本年は、カプサイシン刺激による大脳皮質味覚野・体性感覚野の SNAP25 タンパク質の発現領域の拡大がカプサイシン受容体である TRPV1 を介した作用であるかどうかを明らかにするため、TRPV1 KO（V1KO）マウスを対象とし、カプサイシン投与による SNAP25 タンパク質の発現変動の有無について検討を行った。
【方法】　実験には離乳期の C57BL/6J（B6）または V1KO マウスを用いた。マウスは試験当日まで母親と同じケージで飼育し、生後 21 日目に母親と別のケージに移した。このマウスに水（コントロール群）またはカプサイシン溶液（カプサイシン群）を生後 21 日目から 24 日目までの 3 日間提示した。刺激終了後、マウスを潅流固定し、脳を摘出した。摘出した脳から得た切片を抗 SNAP25 抗体を用いた免疫組織染色法に供した。また、SNAP25 タンパク質の発現量を比較するために、カプサイシン刺激後のマウスから切り出した大脳皮質味覚野・体性感覚野のサンプルをウェスタンブロッティング法に供した。
【結果】　免疫組織染色法により大脳皮質味覚野・体性感覚野における SNAP25 タンパク質の発現領域を比較したところ、B6 マウスで観察されたカプサイシン刺激に依存した大脳皮質味覚野・体性感覚野における SNAP25 タンパク質の発現領域拡大は、V1KO マウスでは認められなかった。続いて、ウェスタンブロッティング法により SNAP25 タンパク質の発現量を比較したところ、B6 マウスではカプサイシン群の SNAP25 タンパク質の発現量が増加していた一方、V1KO マウスでは SNAP25 タンパク質の発現量の増加は認められなかった。これらの結果から、カプサイシン刺激による大脳皮質味覚野・体性感覚野の SNAP25 タンパク質の発現変動が TRPV1 による口腔内における辛味受容を介したものであることを強く示唆している。本研究の一部は総合科学技術・イノベーション会議の SIP（戦略的イノベーション創造プログラム）「次世代農林水産業創造技術」によって実施された。

food stimulus, SNAP25, mouse cerebral cortex

講演番号：3F11a04
講演日時、会場：3 月 28 日 09:33～ F 校舎 11 会場

味蕾におけるコンプレキシンファミリーの発現と末梢味情報伝達におけるコンプレキシンの関与
Expression of complexin family in taste buds and its participation to peripheral taste transduction

○成川 真隆[1]、黒川 あずさ[1]、應本 真[1]、吉本 靖東[1]、阿部 啓子[1,2]、三坂 巧[1] ([1]東大院農生科、[2]神奈川科学技術アカデミー)
○Masataka NARUKAWA[1], Azusa KUROKAWA[1], Makoto OHMOTO[1], Joto YOSHIMOTO[1], Keiko ABE[1,2], Takumi MISAKA[1] ([1]The Univ. Tokyo, [2]KAST)

【目　的】一部の味情報はシナプスを介して味覚神経へ伝達されるが、そのメカニズムには不明な点が多く残されている。本研究ではシナプスを介した味情報伝達機構を明らかにするために、神経伝達において重要な役割を果たす SNARE タンパク質複合体の一つ、コンプレキシン（Cplx）の味蕾における発現を調査した。さらに、Cplx の味情報伝達への関与を検討するため、CPLX2 KO マウスを用いて味応答を記録した。
【方　法】味蕾における Cplx ファミリーの発現は RT-PCR および *in situ* hybridization により確認した。CPLX2 KO マウスの味応答解析として電気生理学的および行動学的解析を行った。電気生理学的解析は味覚神経応答を記録した。行動学的解析は 48 時間二瓶選択試験を行った。味刺激として、基本 5 味を用いた。
【結　果】4 種類存在する Cplx ファミリーのうち、味蕾特異的に Cplx2 mRNA の発現を確認した。続いて、Cplx2 の味情報伝達への関与を明らかにするため、CPLX2 KO マウスを用いて味応答を記録した。電気生理学的及び行動学的解析を行った結果、CPLX2 KO マウスの酸味刺激に対する応答が Wild type（WT）マウスの酸味応答よりも有意に減少することを見出した。一方で、甘味、苦味、旨味と塩味に対する味応答において、WT と KO マウス間で有意な差は見られなかった。これらの結果は味蕾において Cplx2 が酸味情報伝達に関与することを示唆する。
本研究の一部は総合科学技術・イノベーション会議の SIP（戦略的イノベーション創造プログラム）「次世代農林水産業創造技術」によって実施された。

taste, taste transduction, complexin

講演番号：3F11a05
講演日時、会場：3 月 28 日 09:44～ F 校舎 11 会場

Characterization of ex vivo expanded taste-like cells derived from small intestine

○Ken IWATSUKI[1], Eitaro Aihara[2], Peihua Jiang[3], Ayako Kimura[1], Takumi Yamane[1], Yuichi Oishi[1], Kazuo Hattori[1], Nobuyuki Takahashi[1], Makoto Shimizu[1] ([1]Tokyo Univ. Agric., [2]Univ. Cincinnati, [3]Monell Chemical Senses Center)

It has been widely accepted that taste cells in the oral cavity and enteroendocrine cells in the gastrointestinal (GI) tract share common characteristics to detect tastants/nutirents for maintaining homeostasis of the body. However, lack of a fine in vitro model made us uneasy to further characterize the identity and function of these endoderm derived cells. In this study, we have introduced the 3D organoid culture system in order to overcome technical difficulties of culturing these cells.

Previous studies have shown that the organoid derived from the small intestine spontaneously differentiate into multiple cell-types that mimic native tissue. We examined whether chemosensory cells exist within differentiated cell population and found at least two subtypes of taste-like cells that exclusively express different molecular markers: 1) an enteroendocrine cell that express both taste cell markers and enodcine markers, and 2) a less-characterized tufted cell which express TRPM5 and DCAMKL-1. Furthermore, we found morphological differences between two populations of differentiated cells. These variances have also been observed in native intestine tissues.

Therefore, our data suggest that organoid culture system is a good model to study chemosensory cells in the GI tract since it recapitulates in vivo cell features.

taste cell, gastrointestinal tract, organoid

講演番号：3F11a06
講演日時、会場：3 月 28 日 10:05～ F 校舎 11 会場

鉄欠乏マウスにおける味覚嗜好性の変化

Alteration of taste preference in dietary iron deficient mice

○宮本 岳、藍原 祥子、橋本 堂史、水野 雅史 (神戸大農)
○Takeshi MIYAMOTO, Yoshiko AIHARA, Takashi HASHIMOTO, Masashi MIZUNO (Kobe Univ.)

【目的】味覚は生物にとって食物を摂取するか否かを判断する重要な感覚であり、栄養状態に応じて変化することが知られている。鉄は酸素の運搬と貯蔵、エネルギー生成などに必須な微量元素で、体内量の約 65%はヘモグロビンの構成成分として存在し、不足すると貧血状態を引き起こす。一方で、味を正常に感知できない味覚障害の患者に鉄欠乏の例が報告されていることから、体内鉄量と味覚感受性に関連があることが示唆されるが、そのメカニズムはよくわかっていない。本研究では、体内鉄の減少による味覚感受性への影響を明らかにするため、鉄欠乏状態のマウスに対し飲水行動によって嗜好性を評価するリッキングテストを行い、その変化を検討した。
【方法】6 週齢、雄の C57BL/6 マウスに AIN-93G 組成の通常食、または組成からクエン酸鉄を除いた鉄欠乏食を与え、7 週間飼育した。飼育期間中、マウスの体重、摂食量、血中ヘモグロビン濃度を測定した。飼育 1 ～2 週目は週 2 回ずつ、リッキング行動に対する馴化を行い、一定数以上の飲水行動を行う動物を選択した（通常群 10 匹、欠乏群 11 匹)。味物質に対するリッキングテストは生得的に嗜好される味質（甘味、旨味、低濃度の塩味）と忌避される味質（苦味、酸味、高濃度の塩味）に二分し、飼育 3～7 週目にかけて各週 1 回ずつ実施した。嗜好味質テストでは前処理として 23.5 時間の 1 g 制限食と 2 ml の制限水、忌避味質では絶水を施し、一定時間に対する飲水行動数を比較することで各味物質に対する濃度依存的な応答を評価した。
【結果】飼育期間中の体重変化および摂食量については通常食群と鉄欠乏食群で有意な差は観察されなかった。血中ヘモグロビン濃度は飼育開始時の両群に差はなく、飼育 3 週目から有意差が観察され始め、飼育期間長とともに差が拡大した。 味覚嗜好性は、5 週目以降に鉄欠乏食群において 10 mM クエン酸水溶液（酸味）に対する感度が低下した。6 週目からは 75 mM 以下の塩化ナトリウム水溶液（低濃度の塩味）に対する応答が消失した。スクロース（甘味)、グルタミン酸ナトリウム（旨味)、デナトニウム（苦味）に対する応答は、鉄欠乏食群と通常食群間で差は観察されなかった。

taste, iron deficiency, brief access test

講演番号：3F11a07
講演日時、会場：3 月 28 日 10:16～ F 校舎 11 会場

低タンパク質食摂取が膵島の大きさにおよぼす影響

Effect of dietary protein restriction on islet mass

○堀内 真美[1]、向後 雄一郎[1]、遠藤 駿[1]、田口 雄亮[2]、豊島 由香[2]、南 史朗[2]、高橋 伸一郎[3]、竹中 麻子[1] ([1]明治大・農・農化、[2]日医・老人病研、[3]東大・院・農生科)
○ Mami HORIUCHI[1], YUICHIRO KOGO[1], SHUN ENDO[1], YUSUKE TAGUCHI[2], YUKA TOYOSHIMA[2], SHIRO MINAMI[2], SHINICHIRO TAKAHASHI[3], ASAKO TAKENAKA[1] ([1]Meiji University, [2]NIPPON MEDICAL SCHOOL, [3]University of Tokyo)

【背景】低タンパク質食では、摂食に応答したインスリン分泌が低下する。我々は、このインスリン分泌低下が迷走神経を介したアミノ酸のインスリン分泌促進作用の低下と、ロイシンやイソロイシンによる膵島β細胞からのインスリン分泌促進作用の低下に起因することを報告してきた。一方、長期間の低タンパク質食摂取は膵島の大きさの減少とβ細胞の機能低下を引き起こし、グルコースに応答したインスリン分泌を低下させる。このインスリン分泌低下が低タンパク質食摂取３日目にはすでに観察されたことから、本研究では短期間（８時間）の低タンパク質食摂取が膵島面積の低下を引き起こすのかどうかを長期摂取（23 日間）と比較して検討した。
【方法・結果】6 週齢の Wistar 系雄ラットを 2 群に分け（各群 n=10)、タンパク質として 20%カゼインを含む通常食（20P）あるいは 5%カゼインを含む低タンパク質食（5P）を、1 日 8 時間の時間制限で 23 日間給餌した。給餌 21 日目の摂食開始 0、1、2、8 時間後に尾静脈から採血を行い、血漿中のインスリン濃度を測定した。給餌 23 日目に実験食を 8 時間給餌した後、心臓から 2%パラホルムアルデヒド溶液を灌流して膵臓を固定後、採取した。凍結ミクロトームを用いて膵臓の薄切切片を作成し、抗インスリン抗体による免疫染色を行った。インスリン陽性部分の面積を膵島β細胞集団の面積値として計測し（ラット数:各群 n=3, 計測膵島数: 20P 群 n=235; 5P 群 n=305)、23 日間の 5P 摂取により膵島β細胞集団の面積が有意に減少し、20P 群の 46%になることを確認した。5P 群では、1000 μm^2 以上の膵島の割合が減少し、1000 μm^2 以下の膵島の割合が増加していた。摂食中の血漿インスリン濃度は、摂食開始 0、1、2、8 時間後において、20P 群と比較して 5P 群で有意に低かった。次に、8 時間の低タンパク質食摂取の影響を同様の方法で検討した（ラット数:各群 n=3, 計測膵島数: 20P 群 n=201; 5P 群 n=242)。その結果、膵島β細胞集団の面積は 5P 群で 20P 群の 63%に低下したが、統計的な有意差はなかった。摂食中の血漿インスリン濃度は、摂食開始 1、2 時間後において、20P 群に比べて 5P 群で有意に低かった。
【結論】膵島の大きさの減少は低タンパク質食摂取開始直後から生じ始め、グルコースに応答したインスリン分泌低下の要因となる可能性が示された。本研究は、農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業を活用して行った。

Insulin, Protein-restriction, islet

講演番号：3F11a08
講演日時、会場：3 月 28 日 10:27～ F 校舎 11 会場

NMDA 型グルタミン酸受容体に対する日本酒成分の効果

Effect of sake components on the N-methyl-D-aspartate receptors

○矢吹 智[1]、上村 勇貴[1]、曽我部 直哉[1]、黒沢 幹[1]、則包 潔人[1]、伊豆 英恵[2]、山田 康枝[1]([1]近畿大工、[2]酒類総合研究所)
○ Tomo YABUKI[1], Yuki UEMURA[1], Naoya SOGABE[1], Motoki KUROSAWA[1], Kiyoto NORIKANE[1], Hanae IZU[2], Yasue YAMADA[1] ([1]Kinki Univ., [2]Natl. Res. Inst. of Brewing)

【目的】NMDA 型グルタミン酸受容体（NMDA 受容体）は脳に多く存在し，高い Ca^{2+}透過性を有するイオンチャンネルのひとつである．神経可塑性の中心的役割を担い，記憶形成，学習，運動等に深く関与しており，認知症や神経疾患などの病気の原因に関わりのある受容体であると考えられている．また，NMDA 受容体を活性化する物質は，統合失調症や記憶障害などに効果がある可能性があり，活性を阻害する物質は，神経細胞死の抑制やリラックスなどに効果がある可能性がある．本研究は，ヒトが古来より飲用し 1000 種類以上の物質が含まれているが，その多くは生理活性が明らかにされていない日本酒に注目した．これまでの研究で，日本酒成分である agmatine や 2-phenylethylamine といったアミンが NMDA 受容体に対し効果を示すことを報告してきた．今回，NMDA 受容体の 4 つあるサブタイプのうち，脳の大脳皮質や海馬に多く存在する GluN1/GluN2A，GluN1/GluN2B 受容体に対する日本酒成分の効果を検討した．
【方法】マウス NMDA 受容体の GluN1，GluN2A 及び GluN2B サブユニットの mRNA をアフリカツメガエルの卵母細胞にインジェクションし，20℃で 24～48 時間インキュベートし発現させたものを受容体活性測定に使用した．膜電位を－70mV に固定し，二電極膜電位固定法によりグルタミン酸とグリシンをリガンドとして活性測定を行った．今回，純米酒を A 画分（酸等），R 画分（中・酸性アミノ酸，ペプチド等），C 画分（塩基性アミノ酸，ペプチド等），N 画分（糖等）にイオン交換樹脂を用いて分画し，各画分をメタボローム解析し，含有量が多かった成分のうち，C 画分 4 の成分 （trimethylamine N-oxide，ornithine，betaine，chorine）と A 画分の 3 成分（5-oxoproline，cysteic acid，N-acetylglutamic acid）の単独活性とグルタミン酸 100 μM/グリシン 100 μM 存在下での NMDA 受容体活性への効果を検討した．
【結果】７種の成分を比較検討した結果，どの成分も control（100%）に対し 13%以下であったが，単独活性がみられた．trimethylamine N-oxide は，GluN1/GluN2A と GluN1/GluN2B 受容体ともに活性化効果を示した．ornithine は，GluN1/GluN2A と GluN1/GluN2B 受容体ともに阻害効果を示した．betaine，chorine，5-oxoproline，cysteic acid，N-acetylglutamic acid は，GluN1/GluN2B 受容体に対し阻害効果を示した．中でも chorine は GluN1/GluN2B 受容体に対し強い阻害効果を示した．以上の結果から，日本酒中に，多くの NMDA 受容体活性に影響を与える物資が存在することが示された．

N-methyl-D-aspartate receptors, sake, GluN1/GluN2B

講演番号：3F11a09
講演日時、会場：3 月 28 日 10:38～ F 校舎 11 会場

新たな Capsaicin 受容体（TRPV1）作用物質および Capsaicin による神経細胞保護効果の検討
Examination of new capsaicin receptor (TRPV1) ligands and the protective effect of capsaicin on neuronal damage

○佐藤 崇弘[1]、山岡 裕磨[2]、岡田 芳治[1,2]、青島 均[3]、伊豆 英恵[4]、山田 康枝[1,2]（[1]近畿大・院・工、[2]近畿大・工、[3]山口大・院・医、[4]酒類総合研究所）
○TAKAHIRO SATO[1], YUMA YAMAOKA[2], YOSHIHARU OKADA[1,2], HITOSHI AOSHIMA[3], HANAE IZU[4], YASUE YAMADA[1,2] ([1]Grad.Sch.of.Engineering,Kinki Univ., [2]Engineering,Kinki Univ., [3]Grad.Sch.of Med.Yamaguchi Univ., [4]Natl.Res.Inst.of Brewing.)

【目的】Capsaicin 受容体（transient receptor potential vanilloid type 1, TRPV1）は身体の様々な所に発現しているが特に皮膚や脳，神経などに多く発現しており，43℃以上の温度刺激やトウガラシの辛味成分である capsaicin（Cap）などで活性化する Ca^{2+}チャネルで痛みにも深く関与している．近年，受容体の活性化は抗肥満作用や神経障害性疼痛治癒効果，神経細胞保護効果などがあり，受容体の活性抑制は頭痛抑制作用などの様々な効果があるとの報告がある．そのため，新たに TRPV1 に作用する物質を見つけるために，6-shogaol とその誘導体やメタボローム解析により同定されている日本酒中の成分を TRPV1 を発現させたアフリカツメガエルの卵母細胞を用いて，その活性を測定した．また動物では Cap による神経細胞保護が報告されているが，ヒトの神経細胞でも保護効果があるか検討するため，ヒト神経芽細胞腫株 SK-N-SH を用いて検討した．
【方法】アフリカツメガエルの卵母細胞に TRPV1 の mRNA をインジェクションし受容体を発現させ，20℃で約 24～48 時間インキュベートしたのち，二電極膜電位固定法を用いて，膜電位を-70mV に固定し，Cap を受容体に潅流し得られる Ca^{2+}の流入による電流を測定した．TRPV1 の agonist として鎮痛，抗肥満が報告されている 6-shogaol とその誘導体の効果を検討した．TRPV1 はこれまで spermine による単独活性が報告されている．メタボローム解析の結果，日本酒中に存在することが明らかになった amine 類（agmatine, 2-phenylethylamine, tyramine, isoamylamine, putrescine）の単独効果を検討した．また，スクラッチアッセイを用いてヒト神経芽細胞腫株 SK-N-SH の Cap による創傷治癒効果を検討した．
【結果・考察】6-shogaol, 10-shogaol, 6-shogaol(mom)は単独で受容体活性を示した．また 6-shogaol の EC_{50}は 8.1μM であった．これまで本研究において日本酒に含まれる amine のうち spermine, agmatine は単独活性を示したが，今回新たに 2-phenylethylamine が単独で活性を示し，その EC_{50}は 14.2 μM であった(Cap EC_{50}： 3.7 μM)．tyramine, isoamylamine, putrescine は単独で活性は見られなかった．食品中に含まれる成分には TRPV1 と反応する物質が多く含まれることが示された．スクラッチアッセイによる細胞の修復効果では何も添加しないものと比べて，Cap を添加した細胞の方が修復効果は高いことが示された．このことから Cap はヒト神経系細胞に保護効果があることが示唆される．今後，Cap 同様に今回用いた物質の神経系細胞保護効果の検討や動物による行動実験（痛みへの効果，肥満への効果）を行い，TRPV1 への効果のある物質の作用機序を検討する予定である．

capsaicin, TRPV1, shogaol

講演番号：3F11a10
講演日時、会場：3 月 28 日 10:49～ F 校舎 11 会場

ヒト神経芽細胞腫 SK-N-SH へのサリン類似有機リン剤の毒性作用

The effect of a sarin-like organophosphorus agent on human neuroblastoma cell line SK-N-SH

○山田 耕資[1]、白石 弘章[2]、奈女良 昭[3]、有馬 陽介[3]、長尾 正崇[3]、山田 康枝[1]([1]近畿大・院・工、[2]大雄会・第一病院・産婦人科、[3]広島大・医・法医)
○Kosuke YAMADA[1], Hiroaki SHIRAISHI[2], Akira NAMERA[3], Yousuke ARIMA[3], Masataka NAGAO[3], Yasue YAMADA[1] ([1]Grad. of Engineering.Kinki Univ., [2]Daiyukai.First Hosp.Dept.of Gynecol.and Obstet, [3]Dept.of Forensic Med.,Inst.of Biomedical and Health Sciences.)

【目的】1995 年に東京都の地下鉄で神経ガスのサリンを使用した地下鉄サリン事件が発生した．その当時重度な中枢神経障害を負った被害者の中には，未だに重度な後遺症・神経症状に悩まされ，苦しめられている者も数多くいる．サリンは急性毒性としては，アセチルコリンエステラーゼ阻害剤であるが，その遅発性神経毒性の作用機序は分かっていない．しかし，アセチルコリンエステラーゼ阻害以外の効果が毒性に関与していると考えられる．サリンなど毒性の高い有機リン化合物の合成および使用は厳密に法や国際条約において規制されている．本研究では我々が合成した，サリンと同一のリン酸基を持つ揮発性の全くない有機リン剤 bis (isopropyl methyl) phosphonate (BIMP) を使用した．サリンによる遅発性毒性の神経系細胞への効果をみるために， BIMP のヒト神経芽細胞腫 SK-N-SH 細胞への毒性効果及び，レチノイン酸添加によって神経細胞へ分化させた SK-N-SH 細胞への効果を検討する．

【方法】SK-N-SH 細胞は FCS 10%を含む MEMα培地で継代培養し、実験に用いた．様々な濃度の BIMP を添加し, MTT アッセイ法により細胞生存率を求め毒性効果を検討した． 培養した SK-N-SH 細胞(2.0x10^5 cells /ml)にイエローチップの先で細胞に傷を入れ，BIMP の創傷治癒への影響を観察した（スクラッチアッセイ）．神経細胞へ分化させるため， FCS 5%を含む MEMα培地で細胞培養を開始した（5.0x10^5 cells /ml）. 3 日ごとに培地交換とレチノイン酸, NGF, BDNF の添加を行い MAP2 染色によって，神経細胞への分化誘導の確認.

【結果・考察】MTT アッセイ法による毒性の効果では BIMP 添加後 24 時間～72 時間で検討した結果では，BIMP100 μM を添加後 72 時間では，生存率は約 38%であった．また，BIMP 添加後 24 時間の IC_{50} は 44 μM であった．スクラッチアッセイの結果は，SK-N-SH 細胞に対して傷を与えてから 48 時間後, BIMP 添加なしの細胞修復率約 90%に対して，BIMP 1 μM では約 60%，BIMP100 μM では約 45%と BIMP の添加濃度が高くなるにつれて細胞修復率が低くなった．神経細胞へ分化させた SK-N-SH 細胞 に対する BIMP の効果は傷を与えてから 48 時間後, BIMP 添加なしの細胞修復率約 80%に対して，BIMP 1 μM では約 70%，BIMP100 μM では約 43%であり修復率を低くする形となった．この結果から，BIMP は SK-N-SH 細胞及び，神経細胞へ分化させた SK-N-SH 細胞 に対する細胞修復率に影響を与えた．以上のことより，BIMP はアセチルコリンエステラーゼ阻害以外の効果で SK-N-SH 細胞に対して毒性効果を与えることが明らかになった.

Neuronal cells, BIMP, Sarin

講演番号：3F11a11
講演日時、会場：3 月 28 日 11:10～ F 校舎 11 会場

シアル酸認識レクチンシグレックによるマクロファージの活性調節機構

Mechanism of Regulation of macrophage activity by Siglec

○西島 謙一、樋口 廣士、庄司 徹、村瀬 佑介、飯島 信司（名大院工）
○Ken-ichi Nishijima, Hiroshi Higuchi, Toru Shoji, Yusuke Murase, Shinji Iijima (Nagoya Univ.)

【目的】　動物細胞表面を覆う糖鎖の末端は主に負電荷を持つシアル酸である。シアル酸は下等生物にはまれであり、自己の識別マーカーとして機能しているとされる。シグレックは主に免疫系の細胞表面に発現しているレクチンで、シアル酸含有糖鎖を特異的に認識する。その多くは細胞内ドメインに Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif（ITIM）と呼ばれる抑制性のチロシンモチーフをもち、免疫系を制御する活性が知られる。我々は、シグレック-9 及び-5 が LPS やペプチドグリカンなどの TLR リガンドにより誘導されるマクロファージの炎症性サイトカイン産生を抑制すると同時に、抗炎症性サイトカイン IL-10 を強く誘導することを報告した。

マクロファージは LPS 等により炎症を誘導するが、異なる環境下では炎症抑制・組織修復を担う。典型的には、IL-4 により分化する M2 マクロファージは抗炎症機能を持つ。これまでに、シグレックが IL-4 により誘導されるアルギナーゼ発現を強く促進することを見出している。本発表ではこのメカニズムの解明を目指した。

【方法及び結果】シグレック-9 を遺伝子導入し、安定に発現するマウスマクロファージ細胞株 RAW264 を用いた。細胞を IL-4 で刺激した際のアルギナーゼ、マンノースレセプターの発現を定量 PCR により測定したところ、いずれもシグレック発現株では顕著に高かった。IL-4 シグナルに重要な STAT6 のリン酸化を検討したところ、シグレック発現株で低下していたため、シグレックによる IL-4 応答促進を説明できないことが示された。一方、IL-4 下流で活性化される他のシグナルである PI-3 キナーゼについて検討したところ、活性化の指標とされる Akt のリン酸化がシグレック発現細胞で大きく上昇していた。そこで、PI-3 キナーゼ阻害剤である Wortmannin 及び LY294002 を添加したところ、アルギナーゼの発現は 1/3 程度に減少したが、その抑制度合は大きくなかった。そこで、他の経路について検討したところ、MEK 阻害剤である U0126 が顕著にアルギナーゼの発現を阻害することが見出された。現在 MEK 経路の関与について検討中である。

sialic acid, lectin, macrophage

講演番号：3F11a12
講演日時、会場：3 月 28 日 11:21～ F 校舎 11 会場

間葉系幹細胞から脂肪細胞への Wnt シグナルによる分化制御

Differentiation of mesenchymal stem cells into adipocytes by Wnt-mediated pathway

○谷口 実由紀[1]、田中 牧[1]、鬼丸 祐二[1]、鋳方 綾香[1]、山岸 あづみ[2]、金 東浩[1]、佐伯 茂[1] ([1]大阪市大・院生活科学・生体情報、[2]山形大・地域教育)
○Miyuki TANIGUCHI[1], Maki TANAKA[1], Yuji ONIMARU[1], Ayaka IKATA[1], Azumi YAMAGISHI[2], Dong-Ho KIM[1], Shigeru SAEKI[1] ([1]Lab.of Mol. Biochem. Nutr., Osaka City Univ., [2]Yamagata Univ.)

【目的】骨髄に存在する間葉系幹細胞は，骨芽細胞や脂肪細胞など多様な細胞種に分化し，骨粗鬆症や肥満症などの病態では分化のバランスが破綻している。分泌糖蛋白質 Wnt は，間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化を誘導する。一方，PPARγ のアゴニストは，間葉系幹細胞から脂肪細胞への分化を誘導するが，Wnt は脂肪細胞の分化を抑制する。Wnt ファミリーには 19 種が知られ，線虫やショウジョウバエから哺乳類に至るまで生物種を超えて広く保存されている。Wnt によって活性化されるシグナル経路は，canonical 経路と non-canonical 経路に大別される。Canonical 経路は，Wnt が Wnt の受容体 Frizzled と共受容体 LRP5/6 に結合すると，β-catenin が GSK3β によるユビキチン化を受けずに核内に移行して TCF を活性化する経路である。一方，non-canonical 経路は，Wnt が Wnt の受容体 Frizzled に結合するシグナル経路であり，この経路は β-catenin 非依存的な経路であると考えられている。本研究では，間葉系幹細胞の脂肪細胞への分化機構に果たす canonical 経路と non-canonical 経路の役割について検討した。
【結果と考察】マウス骨髄由来間質系細胞である ST2 細胞は, PPARγ のアゴニストである Troglitazone と培養すると脂肪細胞に分化し，canonical 経路を活性化する Wnt3a は TCF 活性を亢進させ，脂肪細胞の分化を抑制した。このような Wnt3a による脂肪細胞分化の抑制作用は，β-catenin siRNA によって阻害された。一方，non-canonical 経路を活性化する Wnt5a は TCF 活性に影響を与えず，Troglitazone による脂肪細胞の分化を抑制しなかった。これらの結果より，Wnt3a による脂肪細胞分化の抑制作用は，canonical 経路を介して TCF の活性化によって誘導されると考えられた。しかし，Wnt3a 非存在下で，GSK3β によるユビキチン化を受けない活性型 β-catenin をトランスフェクションすると TCF 活性は亢進したが，Troglitazone による脂肪細胞の分化を抑制しなかった。これらのことから，Wnt3a による脂肪細胞分化の抑制機構には，canonical 経路を介する TCF の活性化以外の因子が関与すると推定された。

adipocyte, Wnt

講演番号：3F11a13
講演日時、会場：3 月 28 日 11:32～ F 校舎 11 会場

エンドウヒゲナガアブラムシの Toll 経路において機能する Toll 受容体の特定

Analysis of toll receptor in *Acyrthosiphon pisum*

○丸山 航平、志和 睦、河部 陽平、和田 崇史、竹下 勇斗、河野 強、岩崎 崇（鳥取大農）
○Kohei MARUYAMA, Mutsumi SHIWA, Youhei KAWABE, Takafumi WADA, Yuto TAKESHITA, Tsuyoshi KAWANO, Takashi IWASAKI (Tottori Univ.)

【背景・目的】　昆虫は、抗原抗体反応のような獲得免疫系を有しておらず、体内に侵入した異物の排除は、全て自然免疫系に依存している。自然免疫系において、真菌・グラム陽性細菌は Toll 経路、グラム陰性細菌は Imd 経路と呼ばれるそれぞれの経路によって異物として認識され、次いで選択的な免疫応答(抗菌性ペプチドの発現)が誘導される。また、Toll 経路は自然免疫系だけでなく、胚発生時における背腹軸形成にも必須の経路であることが知られている。2010 年に農業害虫エンドウヒゲナガアブラムシ(*Acyrthosiphon pisum*)のゲノム解読が行われた結果、幅広い昆虫種間で保存されている Imd 経路関連遺伝子の大部分が、アブラムシにおいては失われていることが判明した。この知見より、アブラムシは Toll 経路のみで自然免疫系を構築している可能性が示唆された。そこで本研究では、アブラムシ防除における分子標的として Toll 経路に着目し、Toll 経路を活性化させる Toll 受容体の特定を試みた。
【方法・結果】　エンドウヒゲナガアブラムシに対し、グラム陽性細菌(*S. aureus*)とグラム陰性細菌(*E. coli*)を感染させ、経時的な生存率を測定した。その結果、エンドウヒゲナガアブラムシはグラム陽性細菌感染に対して明確な抵抗性を示した(*S. aureus* 10^6CFU/insect感染において、48時間後の生存率は90%)一方で、グラム陰性細菌感染に対しては高い致死率(*E. coli* 10^2CFU/insect感染において、48時間後の生存率は10%)を示した。この結果は、エンドウヒゲナガアブラムシにはImd経路が存在せず、Toll経路のみで自然免疫系を構築していることを裏付けている。次いで、Toll経路を活性化させるToll受容体を特定するために、アブラムシに存在する6種類のToll受容体様遺伝子(*ApToll1-1, 1-2, 6-1, 6-2, 7, 8*)に関してバイオインフォマティクス解析を行った。他昆虫種のToll受容体との比較解析の結果、アブラムシにおいてはToll1ファミリー(*ApToll1-1, 1-2*)が高い相同性を示した。実際に、Toll経路を活性化させるアブラムシToll受容体を特定するために、ショウジョウバエS2細胞株を用いたレポーターアッセイ系を構築した。Toll経路活性化によって発現誘導されることが知られているショウジョウバエの抗菌性ペプチド遺伝子(Defensin, Attacin, Drosomycin)のプロモーターと、その下流にルシフェラーゼ遺伝子を挿入したレポータープラスミドを構築し、S2細胞に導入することでレポーターアッセイ系を構築した。このような細胞株に、アブラムシの6種類のToll受容体様遺伝子をそれぞれ強制発現させた結果、*ApToll1-1, 1-2*ともにDrosomycin遺伝子のプロモーター活性を1.5倍、また*ApToll1-2*のみAttacin遺伝子のプロモーター活性を2.1倍増強させることが分かった。これらの結果から、*ApToll1-1*および*ApToll1-2*がアブラムシのToll経路活性化に関与している可能性が示唆された。現在、より詳細な解析を行っている。

toll receptor, innate immunity, Acyrthosiphon pisum

講演番号：3F11a14
講演日時、会場：3 月 28 日 11:43～ F 校舎 11 会場

線虫 CD36 の低温応答への関与
Participation of CD36 in nematode cold response.
○小粥 みどり[1]、太田 夕貴[1]、澤田 理奈[1]、谷口 芙美[1]、岡松 麻衣[1]、桑原 未季[1]、田中 江来[1]、片岡 愛理[1]、土肥 奈津子[1]、弥谷 智代[1]、加藤 康介[2]、松本 晋也[1] ([1]京女大家政、[2]京大院農)
○Midori OGAI[1], Yuki OOTA[1], Rina SAWADA[1], Fumi TANIGUCHI[1], Mai OKAMATSU[1], Miki KUWAHARA[1], Eri TANAKA[1], Eri KATAOKA[1], Natsuko DOHI[1], Tomoyo YATANI[1], Kosuke KATO[2], Sinya MATSUMOTO[1] ([1]Kyoto Women's Univ., [2]Grad. Sch. Agriculture, Kyoto Univ.)

【目的】CD36 は細胞膜上に存在する多機能性膜糖タンパク質で、血小板、白血球、血管内皮細胞、脂肪細胞、筋細胞などに発現する。その働きとして、スカベンジャー受容体としての機能や炎症応答、脂肪酸の取り込みなどが報告されており、体内で重要な働きをすると考えられる。しかし、日本人ではおよそ 3%にあたる人が CD36 を欠損しているにも関わらず、欠損による大きな障害は認められていない。そのため CD36 にはいまだ解明されていない機能があるのではないかと考えられる。モデル生物として多用される線虫(*Caenorhabditis elegans*)には CD36 のホモログが存在する。これら線虫 CD36 をノックダウンした線虫では、低温環境にさらされた際に死亡率が著しく上昇することを見出した。本研究では、低温環境の条件を詳しく検討し、CD36 が生物の低温応答にどのように関与しているのかを解明することを目的とした。
【方法】本実験では分子生物学的手法の行いやすさから、線虫で実験を行う。線虫の CD36 を欠損させる方法としては、feeding RNAi 法を用いた。CD36 欠損群とコントロール群を用意し、それぞれ 24 時間および 48 時間 4℃の低温条件下でコールドショックを負荷した。各時間経過後にタッチ法にて生きている線虫の数を数え死亡率を計測する。また、線虫が仮死状態でないことを確認するために、コールドショック負荷後に常温（20℃）に戻した後の死亡率についても同様に計測を行う。
【結果】コールドショックから 24 時間後の死亡率に有意な差は見られなかった。しかし 48 時間後では、コントロール群に比べ CD36 ノックダウン群の方が高い死亡率を示すという結果が得られた。コールドショック後、24 時間 20℃に戻した場合の死亡率についても、CD36 ノックダウン群の死亡率の方が高い結果となった。また温度依存性の確認のため、20 度で同じ期間生育した線虫の死亡率についても計測を行ったところ、24 時間後・48 時間後ともに差は見られなかった。
【考察】CD36 は細胞膜に存在することから、実験結果より CD36 は細胞膜における低温応答や耐冷性に関わりを持つことが示唆される。動物の低温応答に関しては、膜脂質の不飽和度の変化や熱ショックタンパク質の発現コントロール、不凍物質の増加などが報告されている。CD36 はこれらの応答に関する機能と密接な関わりを持つと予想されることから、今後は細胞膜の脂質・タンパク質の変化に注目することで生化学的観点から CD36 の機能解析を続ける。

CD36, *Caenorhabditis elegans* , cold shock

講演番号：3F11a15
講演日時、会場：3 月 28 日 11:54～ F 校舎 11 会場

飢餓体験が次世代に及ぼす影響について線虫を用いた解析
Analysis of the intergenerational influence of starvation in *Caenorhabditis elegans*.
○斎藤 春佳[1]、森下 真有[1]、清 愛[1]、岡田 嵯和子[1]、下地頭所 理美[1]、西田 彩乃[1]、坂上 美登理[1]、松村 康生[2]、村上 博[2]、松本 晋也[1] ([1]京女大家政、[2]京大院農)
○ Haruka SAITO[1], Mayu MORISHITA[1], Megumi SEI[1], Sawako OKADA[1], Satomi SHIMOJITOSYO[1], Ayano NISHIDA[1], Midori SAKAGAMI[1], Yasuki MATSUMURA[2], Hiroshi MURAKAMI[2], Shinya MATSUMOTO[1] ([1]Kyoto Women's Univ., [2]Grad.Sch.Agriculture,Kyoto Univ.)

【背景・目的】生活習慣病発症の新しい要因である「受精時、胎児期、乳児期に低栄養または過量栄養の環境に胎芽、胎児(胎仔)、乳児が暴露されると、成人病(生活習慣病)の素因が形成され、マイナスの生活習慣が負荷されることにより成人病(生活習慣病)が発生する。」という「成人病胎児期起源説(FOAD 説)」が注目されている。疫学的研究をはじめ多くの研究が行われているものの、そのメカニズムは十分に分かっていない。動物を低栄養状態にすることは人道的・物理的観点から難しいため、我々はヒトと共通するシステムを持つ線虫(*C. elegans*)で再現することを試みた。親世代の飢餓状態は線虫に絶食を施すことで再現し、次世代への影響について検討した。
【方法】絶食を経験した線虫から生まれた次世代と、経験していない線虫から生まれた次世代をそれぞれ絶食群、給餌群とする。各群の線虫に Nile Red 染色を施し、蛍光顕微鏡で脂肪蓄積量を解析した。また、Gas Chromatography を用いて脂肪酸を実際に定量することで生化学的にも解析を行った。次に、線虫の運動・生殖能力、食餌量を調べるため、線虫が移動する際に左右に首を振る回数、産仔数および咽頭ポンピング回数を数えた。寿命への影響を調べるため、各線虫の生存日数を数え、寿命解析を行った。エネルギー代謝を調べるため、ATP とルシフェリンの反応を利用して ATP 量を測定した。また、遺伝子発現量への影響を見るため各群それぞれの Total RNA を抽出し、DNA マイクロアレイで遺伝子発現量を網羅的に解析するとともに、Real time RT-PCR 法で脂肪合成・分解関連遺伝子の発現量の違いをみた。
【結果・考察】Nile Red 染色による脂肪蓄積量の解析では、絶食群が給餌群に比べ有意に増加していた。Gas Chromatography を用いた脂肪酸定量についても、絶食群が給餌群に比べて総脂質量が多いという傾向にあった。このことは、前述した脂肪蓄積量の結果を生化学的に支持すると考えられる。運動・生殖能力、食餌量では、両群において有意な差は見られなかった。寿命解析でも同様に有意な差は見られなかった。ATP 測定量については、給餌群に比べて絶食群で多い傾向にあることがわかった。よって、飢餓体験は次世代のエネルギー消費を低下させ、ATP を蓄積しやすい代謝にすることが示唆される。以上より、胎児期の低栄養に適応するために効率よく栄養を蓄える体質に変化したことが示唆され、これは FOAD 説に合致し、線虫においても認められる現象だと考える。DNA マイクロアレイ解析と Real time PT-PCR 法による遺伝子発現量の違いについては、現在解析中である。

Caenorhabditis elegans, starvation, epigenetics

講演番号：3F11p01
講演日時、会場：3 月 28 日 14:00～ F 校舎 11 会場

ABCA1 と ABCG1 による細胞膜変化と細胞機能の制御

The regulation of plasma membrane and cellular functions by ABCA1 and ABCG1.

○伊藤 志帆[1]、松尾 道憲[2]、植田 和光[1,3] ([1]京大院・農・応用生命、[2]京女・家政・食物栄養、[3]京大 iCeMS)
○Shiho Ito[1], Michinori Matsuo[2], Kazumitsu Ueda[1,3] ([1]Kyoto Univ. Agric., [2]Kyoto women's Univ., [3]iCeMS)

【背景・目的】

ABCA1 と ABCG1 は ABC トランスポータースーパーファミリーに属し、ABCA1 は細胞膜のコレステロールとホスファチジルコリンを、ABCG1 はコレステロールとスフィンゴミエリンを輸送する。ノックアウトマウスを用いた実験から、ABCA1 と ABCG1 は免疫応答、細胞増殖あるいは遊走などの制御に関わることが明らかにされたが、そのメカニズムは未だ不明である。脂質ラフト領域は、コレステロールとスフィンゴミエリンを多く含む細胞膜上のマイクロドメインであり、シグナル伝達やエンドサイトーシスの場として細胞機能の制御に重要な役割を果たす。そこで、ABCA1 と ABCG1 が機能することによって脂質ラフト構造を変化させ、その結果シグナル伝達やエンドサイトーシスを介して、免疫応答、細胞増殖、遊走などを制御しているのではないかと考え、これらを検証することを目的とした。

【方法・結果】

まず ABCA1 と ABCG1 が脂質ラフト構造に与える影響を調べた。脂質ラフトに集積するガングリオシド GM1 の細胞膜における局在を検討するため、ABCA1 および ABCG1 を一過的に発現させた細胞を GM1 に特異的に結合する蛍光標識コレラトキシンを用いて染色した。その結果、ABCA1 と ABCG1 を発現している細胞では、発現していない細胞と比較して、コレラトキシンの蛍光が弱くなっていた。これらの結果から、ABCA1 と ABCG1 の発現によって脂質ラフト構造が壊れていることが示唆された。次に、ABCA1 と ABCG1 が細胞遊走に与える影響を調べた。その結果、ABCA1、ABCG1 を発現している細胞では、発現していない細胞に比べ 24 時間後に遊走能の低下が見られた。また、創傷治癒アッセイを行なった結果、同様に ABCA1 あるいは ABCG1 を発現している細胞では 24 時間後に遊走能が低下していた。これらの結果から、ABCA1 および ABCG1 の発現によって細胞遊走は低下することが示唆された。以上の結果より、ABCA1 と ABCG1 は脂質ラフト構造を変化させ、遊走などの細胞機能を制御する可能性が示された。

ABC transporters, lipid raft, cell migration

講演番号：3F11p02
講演日時、会場：3 月 28 日 14:11～ F 校舎 11 会場

1 分子イメージングによる HDL 産生機構の解析

Analysis of HDL generation mechanism by single-molecule imaging

○永田 紅[1]、中田 千枝子[1,2]、笠井 倫志[2]、石神 正登[3]、楠見 明弘[1,2]、植田 和光[1,3] ([1]京大 iCeMS、[2]京大再生研、[3]京大院農)
○Koh NAGATA[1], Chieko NAKATA[1,2], Rinshi KASAI[2], Masato ISHIGAMI[3], Akihiro KUSUMI[1,2], Kazumitsu UEDA[1,3] ([1]iCeMS, Kyoto Univ., [2]Inst. Frontier Med. Sci., Kyoto Univ., [3]Grad. Sch. of Agri., Kyoto Univ.)

【研究の背景と目的】ABCA1(ATP-binding cassette protein A1)は、善玉コレステロールとして知られるHDL(high density lipoprotein)産生に必須の膜タンパク質である。ABCA1はATP加水分解依存的に細胞内の過剰なコレステロールやリン脂質を動かし、細胞外の脂質受容体であるapoA-I(apolipoprotein A-I)へ受け渡すことでHDL産生の初期段階を担うが、その機構には不明な点が多い。また、ABCA1と高い相同性をもつABCA7は、脳内のコレステロール恒常性維持に重要な働きを担い、その機能異常はアルツハイマー病のリスクを増大させる。ABCA7はABCA1同様apoA-Iへコレステロールやリン脂質を受け渡すが、ABCA7の産生するHDLの脂質組成はABCA1のそれとは異なる。本研究では、生細胞の細胞膜上でABCA1およびABCA 7 の動態とオリゴマー化を1分子解析し、ABCA1によるHDL産生メカニズムを明らかにすることを目的とした。
【方法】野生型ABCA1、あるいはATP加水分解活性をもたず脂質輸送能のない非機能性ABCA1-MMとEGFPとの融合タンパク質をHeLa細胞で一過的に発現させ、全反射照明蛍光顕微鏡を用いて1分子イメージングを行った。蛍光輝点の拡散性を調べるとともに、その段階的退色を調べることによりオリゴマー形成を検討した。また、野生型ABCA7についても同様の解析を行い、ABCA1と比較した。
【結果】1) apoA-I 非存在下では、ABCA1 輝点の運動性は低く、約 7 割が静止し、3 割が拡散運動をした。一方、非機能性の ABCA1-MM では約 2 割が静止し、8 割が拡散運動をしたことから、ABCA1 の機能発現によりその細胞膜上での運動性が低下することがわかった。また、ABCA7 については、約 3 割が静止し、7 割が拡散運動をした。2) ABCA1 の脂質輸送阻害剤である PSC833 は ABCA1 の運動性を上昇させた。3) 各蛍光輝点の段階的退色を調べたところ、静止 ABCA1 は 2 段階で退色するものが多く、静止 ABCA1 分子の約 9 割がダイマーを形成していることが明らかになった。一方、拡散運動をしている ABCA1、ABCA1-MM および ABCA7 は 1 段階退色を示し、これらはモノマーであることが示唆された。4) 培地に apoA-I を添加すると、ABCA1 の運動性が上昇し、ABCA1-MM と同等の運動性を示すようになった。また 1 段階退色する ABCA1 が増加したことから、apoA-I 添加により ABCA1 ダイマーがモノマーに解離することが示唆された。
以上の結果より、ABCA1 は細胞膜中の脂質を動かして自身の分子内あるいは周囲に蓄積するとダイマー化し、apoA-I に脂質を受け渡すと単量体に解離して再び脂質を集めるというサイクルがあり、このダイマーとモノマーの相互変換が ABCA1 による HDL 産生に重要であることが示唆された。

HDL, ABCA1, single-molecule imaging

講演番号：3F11p03
講演日時、会場：3 月 28 日 14:22～ F 校舎 11 会場

多価不飽和脂肪酸を含有する HDL の炎症抑制効果の検証

The anti-inflammatory effect of HDL including polyunsaturated fatty acid

○斉藤 貴将[1]、植田 和光[1,3]、松尾 道憲[2]([1]京大院・農・応用生命、[2]京女・家政・食物栄養、[3]京大 iCeMS)
○Takanobu Saito[1], Kazumitsu Ueda[1,3], Michinori Matsuo[2] ([1]Kyoto Univ., [2]Kyoto Women's Univ., [3]Kyoto Univ. iCeMS)

【背景・目的】

高密度リポタンパク質(HDL)は抗炎症作用を持ち、動脈硬化などの生活習慣病を防ぐ役割を担っている。これまでに HDL の抗炎症作用について多くの研究が行われてきたが、HDL の脂質組成に着目した研究は行われておらず、それが HDL の炎症抑制効果に与える影響も明らかではない。我々は HDL の脂質組成を変化させるために、魚に多く含まれるエイコサペンタエン酸(EPA)やドコサヘキサエン酸(DHA)に代表される抗炎症性の多価不飽和脂肪酸を用いて HDL 中の脂質組成を変化させ、HDL の持つ炎症抑制効果に対する影響を検討した。まず、これらの脂肪酸を細胞に添加すると、細胞膜の一部にこれらの脂肪酸が取り込まれ、EPA、DHA 含有のリン脂質膜が形成されると考えられる。その後、これらの脂肪酸含有のリン脂質が細胞膜に存在する ABC トランスポーターにより、細胞外の脂質アクセプターに対して排出されることで HDL の脂質組成が変わり、より強い抗炎症作用を持つ EPA、DHA 含有の HDL が産生されるのではないかと考えた。

【方法・結果】

ABC トランスポーターを発現するヒトマクロファージ様 THP-1 細胞に多価不飽和脂肪酸であるアラキドン酸(AA)、EPA、DHA を添加して 24 時間静置し、細胞に取り込ませた。その後、脂質アクセプターであるアポリポプロテイン A-1 (apoA-1) を含む培地に交換後、さらに 72 時間静置し、産生される HDL を含む条件培地を回収した。この条件培地からスクロース密度勾配超遠心により HDL を精製した。その後、炎症性サイトカインを誘導するリポポリサッカライド(LPS)と同時にマクロファージ細胞に添加し、mRNA レベルでの炎症抑制効果を RT-PCR により検証した。その結果、EPA、DHA を添加した THP-1 細胞から分泌される HDL は、コントロールに比べて炎症抑制効果が強いことが分かった。一方で AA を添加したマクロファージ細胞から分泌される HDL において強い炎症抑制効果は確認できなかった。この結果から、EPA と DHA のような炎症抑制効果を持つ多価不飽和脂肪酸を HDL に取り込ませると、HDL の脂質組成が変化し、より炎症抑制効果が強い HDL が産生されると考えられる。

HDL, ABC transporter, polyunsaturated fatty acid

講演番号：3F11p04
講演日時、会場：3 月 28 日 14:33～ F 校舎 11 会場

ブタ腎臓および肝臓マクロファージの単離・培養と P2X7 受容体機能解析

Isolation of renal- and liver-derived swine macrophages and functional analysis of P2X7 receptor in these cells

○竹之内 敬人[1]、鈴木 俊一[2]、新開 浩樹[1]、月本 光俊[3]、佐藤 充[1]、上西 博英[1,4]、木谷 裕[1] ([1]農生資研・動物生体防御、[2]農生資研・医用ブタ、[3]東理大・薬、[4]農生資研・家畜ゲノム)
○ Takato TAKENOUCHI[1], SHUNICHI SUZUKI[2], HIROKI SHINKAI[1], MITSUTOSHI TSUKIMOTO[3], MITSURU SATO[1], HIROHIDE UENISHI[1,4], HIROSHI KITANI[1] ([1]Anim. Immun. Cell Biol. Res. Unit, Natl. Inst. Agrobiol. Sci., [2]Transg. Pig Res. Unit, Natl. Inst. Agrobiol. Sci., [3]Fac. Pharm. Sci., Tokyo Univ. Sci., [4]Anim. Genome Res. Unit, Natl. Inst. Agrobiol. Sci.)

【目的】マクロファージは、病原体等の異物の排除や自然免疫系の活性化など重要な生体防御機能を担う細胞である。最近我々は、混合培養系を用いることで動物の様々な組織・器官から簡便に繰り返してマクロファージを単離・回収できることを見出した。本研究では重要な経済動物であるブタの生体防御機構の解明に資するため、ブタ腎臓および肝臓の混合培養系からマクロファージを単離・培養する手法を構築し、その自然免疫応答能を調べた。【方法】新生子ブタ（生後 1 ～14 日）の腎皮質を細切し、コラゲナーゼ/ディスパーゼ処理で分散した細胞を 75cm^2 フラスコに播種した。肝臓はコラゲナーゼ溶液で灌流・分散し、低速遠心により回収した肝実質細胞分画をフラスコに播種した。10% ウシ胎子血清を含む DMEM 培地で初代培養し、3-4 日毎に培地交換した。培養開始から 1-2 週間後に上皮および線維芽様細胞の単層シート上でマクロファージが活発に増殖する混合培養系が構築された。その後 1-2 ヶ月の間、培地交換時の培養上清からプラスチックディッシュへの強い付着性を利用して繰り返しマクロファージを回収し、細胞機能解析に用いた。【結果・考察】各種細胞マーカー抗体を用いた免疫染色の結果、混合培養系の上清から回収された細胞は 99%以上がマクロファージであることがわかった。この細胞は蛍光ビーズの貪食能を有すると共に、リポ多糖に反応して炎症性サイトカインを産生した。また、炎症応答に関与する細胞内蛋白質複合体インフラマソームを制御する P2X7 プリン受容体 (P2X7R) を発現していた。ところが、ブタマクロファージに ATP 刺激を加えても、P2X7R を介した細胞内 Ca^{2+}濃度の上昇やインフラマソームの活性化は検出されなかった。ヒトやげっ歯類のマクロファージでは ATP/P2X7R は重要な内因性のインフラマソーム活性化経路であるが、ブタマクロファージではこの経路が機能しておらず、自然免疫応答における ATP/P2X7R 経路の動物種間での役割の違いが推測された。

swine, macrophage, P2X7 receptor

講演番号：3F11p05
講演日時、会場：3 月 28 日 14:44～ F 校舎 11 会場

ブタ卵胞顆粒層細胞の体外培養過程における細胞形態および遺伝子発現プロファイルの変化

Changes in cell shape and gene expression profile during in vitro culture of follicular granulosa cells

○篠原 千裕[1]、沖 嘉尚[2]、加野 浩一郎[1,2]([1]日大院生資科、[2]日大生資科)
○Chihiro SHINOHARA[1], Yoshinao OKI[2], Kouichiro KANO[1,2] ([1]Bioresource Sciences. Nihon Univ., [2]Graduate School of Bioresource Sciences, Nihon Univ.)

【目的】卵胞顆粒層細胞は卵巣の卵胞内壁に存在し、エストロジェンやプロジェステロンなどのステロイドホルモンを分泌して、卵母細胞の発育および成熟を調節する支持細胞である。これまで、我々は、ブタ卵巣由来の卵胞顆粒層細胞（GC）を単離し、20%ウシ胎子血清（FBS）添加 DMEM で培養すると、GC が特異的機能を消失し、多分化能を獲得することを明らかにしている。しかし、GC が脱分化および多分化能を獲得する機構は明らかでない。本研究では、GC の脱分化および多分化能獲得機構の一端を明らかにする目的で、GC の培養過程における遺伝子発現プロファイルの変化をマイクロアレイ解析によって調べた。
【方法】生後 6～7 ヶ月齢の未経産ブタの卵巣を採取し、直径 3～5mm の卵胞を採取した。卵胞周囲の結合組織を除去したのち、卵胞を反転させ内壁からシート状の顆粒層細胞層（sGC）をピンセットで剥離した。コラゲナーゼ処理により GC を単離したのち、20%FBS 添加 DMEM で 7 日間培養した。アロマターゼの発現状況を調べる目的で、sGC、単離直後 GC（iGC）、培養 1、2、4 および 7 日後に定法に従って全タンパク質を抽出し、ウエスタンブロット法（WB）を行なった。また遺伝子発現プロファイルの変化を調べる目的で、sGC、iGC、培養 1、2、4 および 7 日後に全 RNA を抽出し、マイクロアレイデータを取得した。
【結果】GC は培養 1 日後に培養皿に接着し、培養 2 日後に伸展した。その後、培養 4 日後には増殖を始め、培養 7 日後にコンフルエントとなった。WB の結果、GC の特異的機能にかかわるアロマターゼの発現は sGC および iGC では認められたが、培養 1 日後以降では殆ど検出されなかった。マイクロアレイ解析の結果、遺伝子発現プロファイルは sGC および iGC では殆ど違いがみられなかったが、iGC から培養 1 日後に著しく変化した。その後、培養時間の経過に伴って培養 7 日後と類似した遺伝子発現プロファイルに変化した。また、GC の特異的遺伝子群の発現は iGC から培養 1 日後に減少したが、それに伴って脂肪細胞、骨芽細胞、軟骨細胞あるいは平滑筋細胞それぞれの初期分化マーカー遺伝子の発現が増加した。以上のことから、GC は細胞接着が起こる培養 1 日後には脱分化し、その後に細胞形態の変化に伴って種々の間葉系細胞における初期分化マーカー遺伝子を発現することが示された。

Follicular granulosa cell, Gene expression profile, Cell shape

講演番号：3F11p06
講演日時、会場：3 月 28 日 15:05～ F 校舎 11 会場

心臓周囲の脂肪組織は心外膜マーカーを発現する
Pericardial adipose tissue expresses pericardium markers.
○金井 すみれ、真田 洋平、山本 岳史、加藤 範久、矢中 規之（広島大院　生物圏）
○Sumire Kanai, Yohei Sanada, Takahumi Yamamoto, Norihisa Kato, Noriyuki Yanaka (The Graduate School of Biosphere Sci.,Hiroshima Univ.)

〈背景・目的〉
高脂肪食などによって本来脂肪が蓄積しえない臓器に過剰に沈着・蓄積している脂肪が異所性脂肪とさる．異所性脂肪は，メタボリックシンドロームや 2 型糖尿病の病態形成に深く関与していると考えられており，近年，皮下脂肪や内臓脂肪に加えてその病態的役割が注目されている．皮下脂肪や内臓脂肪への一定の脂肪蓄積が先行し，収容しきれない脂肪が異所性脂肪として蓄積すると考えられている．異所性脂肪の中でも特に心臓周囲脂肪組織は，冠動脈疾患などの循環器疾患との関連性が示唆されており，血管リモデリングにおいて重要な役割を果たしていると考えられている．しかし，皮下脂肪や内臓脂肪と比較して解析例は少なく，心臓周囲脂肪組織の性質や形成に関するメカニズムの詳細は明らかにされていない. そこで，心臓周囲脂肪組織の特性や組織形成のメカニズムの解明を目的とし，網羅的な遺伝子発現解析に着手した.
〈方法・結果〉
遺伝性肥満マウスである db/db マウスの皮下脂肪組織，腸間膜脂肪組織，精巣上体脂肪組織，心臓周囲脂肪組織より RNA を回収し，real-time PCR 法を用いて遺伝子発現解析を行ったところ，心臓周囲脂肪組織において炎症マーカーである *TNFα* の発現量が他の脂肪組織よりも低く，また *UCP1* や *PGC-1α* などの褐色脂肪マーカーの発現量が他の脂肪組織に比べて著しく高かった. そこで, db/db マウスの精巣上体脂肪組織, および心臓周囲脂肪組織の遺伝子発現について DNA microarray 法を用いて網羅的に解析し，さらに 16 週間高脂肪食を負荷した食餌性肥満マウスの心臓周囲脂肪組織についても同様に遺伝子発現解析を行った．その結果，精巣上体脂肪組織と比較して心臓周囲脂肪組織において *UCP1*, *Cidea* および *PGC-1α* などの褐色脂肪マーカーの発現量が極めて高く, 一方で *Hoxc6*, *Hoxc8*, *Hoxc9* などの白色脂肪マーカーの発現量が著しく低いことが示された．また，心臓周囲脂肪組織では，心筋細胞の発生に関わる *GATA6* や *Tbx5*, さらに心外膜マーカーである *Wt1*, *TBx18*, *ALDH1A2* の発現量が精巣上体の脂肪組織よりも著しく高いことが明らかになった．また，db/db マウスと食餌性肥満マウスの心臓では，上皮細胞マーカーである *Cdh1*, *Cldn3*, *Cldn4*, さらに *Ocln* の発現量が野生型マウスよりも低いことが示された. 以上の結果から, 心臓周囲脂肪組織の発生には, 高脂肪食による心外膜における上皮間葉転換（Epithelial-Mesenchymal Transition）が関わっている可能性が示唆された.

ectopic fat, pericardial adipose tissue, obesity

講演番号：3F11p07
講演日時、会場：3 月 28 日 15:16～ F 校舎 11 会場

細胞外マトリクスの硬さ感知におけるビンキュリンのアクチン繊維結合能の重要性
The importance of the actin binding ability of vinculin for sensing the stiffness of extracellular matrix
○大町 朋弘[1]、市川 尚文[1]、木村 泰久[1]、植田 和光[1,2]、木岡 紀幸[1] ([1]京都大農、[2]京都大 物質-細胞統合システム拠点)
○ TOMOHIRO OMACHI[1], TAKAHUMI ICHIKAWA[1], YASUHISA KIMURA[1], KAZUMITSU UEDA[1,2], NORIYUKI KIOKA[1] ([1]Kyoto Univ., [2]iCeMS, Kyoto Univ.)

【背景・目的】動物細胞はコラーゲンなどの細胞外マトリクス（ECM）に取り囲まれて存在している。近年、ECM の硬さが細胞の分化や運動のような細胞の運命決定において非常に重要であることが明らかになっており、細胞が ECM の硬さを感知する仕組みに注目が集まっている。細胞は ECM との接着部位に形成されている接着斑と呼ばれる複合体にアクチン繊維を連結させ、ECM の硬さに見合った張力で ECM を引っ張っている。最近、私たちは硬い ECM 上では接着斑タンパク質ビンキュリンの構造がアクチン繊維低親和型からアクチン繊維高親和型に変換し、これが ECM の硬さ感知に関与していることを明らかにしている。しかし、ビンキュリンがアクチン繊維に結合することが ECM の硬さの感知に必要であるかについては明らかになっていない。本研究では、アクチン繊維との結合能が低下したビンキュリン変異体を用いて、ECM の硬さを感知する際のビンキュリンとアクチン繊維との結合の必要性について検討した。
【方法・結果】ビンキュリンは N 末端側頭部と C 末端側尾部の分子内相互作用により閉じた構造をとり、アクチン繊維低親和型で存在する。構造変化により、アクチンとの結合部位である尾部が露出した Open 型になると、アクチン繊維高親和型となる。本実験ではアクチン繊維結合能を低下させることが報告されている I997A 変異体（IA）および V1001A 変異体（VA）を用いた。この変異を全長のビンキュリンに導入したところ、期待通りアクチン繊維との親和性が低下していることをアクチン繊維共沈降実験で確認した。ビンキュリンの構造変化の影響を除外して解析するため、恒常的に Open 型であると報告されている T12 変異を同時に持つ T12/IA および T12/VA 変異体も作製した。当研究室のこれまでの実験結果から、ECM の硬さが増加するに従って、ビンキュリンの TritonX-100 不溶性と FRAP 法（光褪色後蛍光回復法）で評価した非動性画分が増加することが分かっており、これが ECM の硬さ感知に関わっていると考えられている。そこでビンキュリン変異体を、内在のビンキュリンの発現を抑制したマウス繊維芽細胞に発現させ、硬いプラスチックシャーレ上において変異体の TritonX-100 不溶性を調べた。T12 変異体に比べて T12/IA および T12/VA 変異体の TritonX-100 への不溶性は低かった。また、同様に硬いプラスチックシャーレ上において FRAP 法における非動性画分を調べたところ、T12 変異体に比べて T12/I997A および T12/V1001A 変異体の非動性画分は低下していた。以上の結果から、硬い ECM 上におけるビンキュリンの挙動の変化にはビンキュリンのアクチン繊維結合能が必要であることが明らかとなった。

vinculin, actin filament, mechanosensing

講演番号：3F11p08
講演日時、会場：3 月 28 日 15:27～ F 校舎 11 会場

接着斑タンパク質ビネキシンαの両親媒性ヘリックスはビンキュリンと相互作用する

An amphipathic helix in vinexin α interacts with vinculin

○日野 直也[1]、市川 尚文[2]、木村 泰久[2]、植田 和光[2,3]、木岡 紀幸[2] ([1]京大農、[2]京大院農、[3]京大 iCeMS)
○Naoya HINO[1], Takafumi ICHIKAWA[2], Yasuhisa KIMURA[2], Kazumitsu UEDA[2,3], Noriyuki KIOKA[2] ([1]Dept. of Agri., Kyoto Univ., [2]Grad. Sch. of Agri., Kyoto Univ., [3]iCeMS, Kyoto Univ.)

【背景・目的】近年、動物細胞は細胞外マトリックス(ECM)の硬さを感知して、自身の分化や運動、増殖などの運命決定を行っていることが明らかになってきた。細胞は、ECM との接着部位である接着斑を介してアクチン繊維で ECM を引っ張り、ECM の硬さを感知していると考えられている。当研究室の研究より、接着斑タンパク質ビンキュリンは、ECM が硬い時に別の接着斑タンパク質であるビネキシンαと相互作用し、構造変化することが明らかになっている。このことから、これらのタンパク質の複合体形成が ECM の硬さを感知するメカノセンサーとして働いていると考えられている。これまでにビネキシンαに含まれる SH3 ドメインがビンキュリンとの結合に寄与することはわかっているが、ビンキュリンの構造変化を引き起こす詳細なメカニズムについては明らかになっていない。テーリンやα-カテニンなどのタンパク質は、両親媒性ヘリックスを介してビンキュリンと結合し、ビンキュリンの構造変化を引き起こすことが明らかにされている。そこで、本研究では、ビネキシンαは両親媒性ヘリックスを介してもビンキュリンと結合し、ビンキュリンの構造変化を引き起こすという仮説を立て、これを検証することとした。
【方法・結果】ビネキシンαの二次構造予測を行ったところ、両親媒性ヘリックスと予想される領域が、アミノ酸配列の 193-214 番目(Helix1)、329-355 番目(Helix2)の 2 ヶ所存在していることが明らかになった。そこで、これら 2 つの両親媒性ヘリックスに含まれるアミノ酸残基をプロリンに置換し、ヘリックス構造を破壊した変異体を 5 種類作成した。これらの変異体を GST 融合タンパク質として大腸菌で発現・精製し、ビンキュリンとのプルダウンアッセイを行ったところ、Helix2 に含まれる I329L332L333 と L337L340S341L344 をそれぞれプロリンに置換した変異体は、共沈降するビンキュリン量が顕著に減少した。さらに Helix2 について詳細に解析するため、Helix2 の疎水性残基をグルタミンに置換し、両親媒性を破壊した変異体を 4 種類作成した。この変異体を用いてビンキュリンとのプルダウンアッセイを行ったところ、L333L337 と L340L344 をそれぞれグルタミンに置換した変異体は、ビンキュリンとの共沈降量が大きく減少した。そこで、Helix2 領域のみを GST 融合タンパク質として大腸菌で発現・精製し、ビンキュリンとのプルダウンアッセイを行ったところ、Helix2 単独でもビンキュリンと共沈降した。よって、本研究により、ビネキシンαは、SH3 ドメインに加えて、両親媒性ヘリックス Helix2 を介してもビンキュリンと結合することが明らかになった。今後は、ビネキシンαが引き起こすビンキュリンの構造変化に、Helix2 が必要であるのかを明らかにしたい。

vinculin, focal adhesion, mechanosensing

講演番号：3F11p09
講演日時、会場：3 月 28 日 15:38～ F 校舎 11 会場

リサイクリングエンドソームに局在する低分子量 G タンパク質の解析

Analysis of small G proteins localizing on recycling endosomes

○森 将人[1]、三崎 亮[1]、田口 友彦[2]、大橋 貴生[1]、藤山 和仁[1] ([1]大阪大生国セ、[2]東京大薬)
○Masahito Mori[1], Ryo Misaki[1], Tomohiko Taguchi[2], Takao Ohashi[1], Kazuhito Fujiyama[1] ([1]Osaka Univ. ICBiotech, [2]Univ. Tokyo)

【背景および目的】

細胞内輸送は細胞の生存に不可欠であり、多くのオルガネラとモータータンパク質によって制御されている。オルガネラの中でもリサイクリングエンドソーム(RE)は、物質の再回収を制御することで見出されたエンドソームの一種である。ところが、最近の研究から RE が複数の輸送経路を制御すること、さらには RE の膜成分が他のオルガネラとは異なりホスファチジルセリン(PS)が豊富に存在するという細胞膜と似た膜環境を持つことも明らかになってきたため、注目を浴びている。しかしながら、RE で機能する局在タンパク質の同定が遅れているため、その機能については未だ解明されていない部分が多い。近年、モータータンパク質として知られる低分子量 GTPase Rab が細胞膜の PS を介して機能することが分かってきた。これに対して、RE 上の PS はコレラ毒素の逆行輸送に関与することが知られているものの RE 局在 Rab (RE-Rab) との関係や機能は不明である。本研究では、PS が RE-Rab の RE 局在と機能にどのような影響を持つか明らかにすることで、RE の新規機能を提示したい。

【方法および結果】

RE の観察が容易なアフリカミドリザル腎臓由来 COS-1 細胞で緑色蛍光タンパク質を融合したマウス由来 60 種の Rab を発現させ、共焦点レーザー顕微鏡を用いて各局在を観察した。その結果、Rab9A, 10, 11A, 11B, 12, 13, 17, 22A, 23, 25, 35, 37, 38, 40C, 43 の 15 種を、RE-Rab として選抜した。

PS 合成遺伝子を欠損したチャイニーズハムスター卵巣細胞 CHO-PSA-3 を用いて、PS を持たない RE を調製し、PS が RE-Rab の局在にどのような影響を与えるのか調べたところ、Rab23 と Rab37 の局在が大きく変化した。このことから、Rab23 と Rab37 が安定的に RE に局在するためには RE 上の PS が必要であると考えられた。さらに、siRNA を用いて Rab23 をノックダウンした COS-1 細胞では TGN46 の局在が顕著な影響を受けたことから、Rab23 が RE を介した逆行輸送経路を制御している可能性があることが示唆された。

recycling endosomes, Rab, phosphatidylserine

講演番号：3F11p10
講演日時、会場：3 月 28 日 15:49～ F 校舎 11 会場

小腸上皮の栄養吸収機能における小胞輸送制御因子 Rab8 の役割
Roles of two Rab8 subtypes in cell morphology and nutrient absorption in enterocytes
○佐藤 隆史[1]、加藤 将夫[2]、竹田 直樹[3]、辻 彰[2]、原田 玲子[4]、原田 彰宏[1,5] ([1]群馬大生体調節、[2]金沢大院自然科学、[3]熊本大生命資源、[4]宝塚医療大、[5]大阪大院医)
○Takashi Sato[1], Yukio Kato[2], Naoki Takeda[3], Akira Tsuji[2], Reiko Harada[4], Akihiro Harada[1,5] ([1]Gunma Univ., [2]Kanazawa Univ., [3]Kumamoto Univ., [4]Takaraduka Med. Univ., [5]Osaka Univ.)

小腸からの栄養吸収を担う吸収上皮細胞（enterocyte）は、非対称な細胞形態（極性）を持つ細胞であり、tight-junction により隔った apical 面と basolateral 面といった 2 種の異なる性質をもつ細胞膜が存在する。吸収上皮細胞は、apical 側で栄養を吸収し、basolateral 面で細胞接着や体内シグナルの受容等を行う。この細胞極性を形成、維持することは細胞機能の発現において不可欠であり、この形態は各々の細胞膜ドメインに特有のタンパク質をトランスゴルジ網で選別し正しく輸送する選別輸送により維持されている。しかし、細胞極性を維持するための選別輸送を制御する分子メカニズムは不明な点が多い。そこで、本研究では極性小胞輸送に関わる小胞輸送制御因子の一つで低分子量 GTP 結合タンパク質である Rab8 の生体内機能に興味を持ち、極めて構造の類似した 2 種のアイソフォーム（Rab8a, Rab8b）についてそれぞれノックアウトマウス（KO）を作製その表現型を解析した。まず、Rab8aKO（AKO）を作製し解析した結果、マウスは生後 20 日以降に栄養吸収障害とみられる重篤な生理を呈し、生後 4 週以内で死亡した。このマウスの小腸を詳しく解析したところ、吸収上皮細胞において、apical 側の細胞膜のマーカータンパクである膜消化酵素やトランスポーターの局在異常が明らかになった。さらに、吸収上皮細胞表面の微絨毛は、封入体として細胞内に取り込まれ消化されることにより、短くなり消失した。従って、AKO マウスの栄養吸収障害は、これらの吸収上皮細胞 apical 側におけるタンパク局在と微絨毛構造の異常により起こるものと考えられた。

一方、Rab8bKO（BKO）は、生理機能や組織の形態に著明な異常の見られない正常な個体であった。そこで、Rab8a と Rab8b の相互の代償機能を明らかにする目的で両者のダブル KO（DKO）マウスを作製し解析した。その結果、DKO では AKO の小腸吸収上皮細胞で観られた、apical タンパクの局在異常と微絨毛の萎縮による栄養吸収不全がより早期に現われ、生後 3 週以内に死亡した。一方、basolateral タンパクの局在は Rab8a と Rab8b の両者が欠損しても、異常は見つからなかった。以上の解析の結果から、apical 細胞膜への選別輸送による吸収上皮細胞の形態維持に Rab8a が必須であり、Rab8b によりその機能の一部が代償されるものと考えられる。また、これらの KO マウスは離乳期の前後において異常をも呈したことから、Rab8 の機能と新生児期の小腸上皮成熟との関連に注目している。

Rab8, cell polarity, membrane traffic

講演番号：3F11p11
講演日時、会場：3 月 28 日 16:10～ F 校舎 11 会場

神経細胞内に蓄積した Aβ42 による細胞毒性の発現機構
Mechanism of cellular toxicity caused by intracellular accumulated Aβ42 in neuronal cells
○奥 勇紀[1,2]、村上 一馬[3,4]、入江 一浩[3,4]、寶関 淳[2,4]、阪井 康能[1,2,4] ([1]京都大院・総合生存学館、[2]京都大院農・応用生命、[3]京都大院農・食品生物、[4]京大学際・生理化学)
○Yuki OKU[1,2], Kazuma MURAKAMI[3,4], Kazuhiro IRIE[3,4], Jun HOSEKI[2,4], Yasuyoshi SAKAI[1,2,4] ([1]Grad. Sch. of Adv. Int. Studies., Kyoto Univ., [2]Divi. of Applied. Life. Sci., Grad. Sch. of Agri., Kyoto Univ., [3]Divi. of Food. Sci and Bio., Grad. Sch. of Agri., Kyoto Univ., [4]Res. Unit for Physiol. Chem., C-PIER., Kyoto Univ.)

アルツハイマー病は高齢者の認知症の原因の中で最も頻度の高い神経変性疾患であり、特徴的な脳の病理変化として細胞外に蓄積する老人斑が挙げられる。老人斑は 42アミノ酸残基からなる amyloid-β（Aβ42）ペプチドによって主に構成された凝集体であり、凝集した Aβ42 の細胞毒性により神経細胞死が引き起こされ、その結果アルツハイマー病を発症すると考えられている。Aβ42 は容易に凝集することが知られており、凝集化した Aβ42 が神経細胞外に蓄積することで神経細胞死を引き起こす機序は盛んに研究されてきた。近年 Aβ42 が細胞外だけでなく細胞内に蓄積するとの報告がある一方、細胞内に蓄積した Aβ42 が細胞死を引き起こす機構は未だ不明であった。

本研究では、細胞内に蓄積した Aβ42 が細胞死を引き起こす機構を明らかにすることを目的とした。神経細胞内に取り込まれた Aβ42 凝集体の細胞内局在を調べたところ、リソソーム膜タンパク質である LAMP1 と共局在することがわかった。β-galactoside を認識するタンパク質 Galectin-3 の GFP 融合タンパク質 (GFP-Gal3) を発現させた細胞では、サイトゾルに拡散していた GFP-Gal3 が細胞内の Aβ42 蓄積に伴うリソソームへの局在が観察され、リソソーム膜の透過性が亢進していることが示唆された。凝集化した Aβ42 は *in vitro* で活性酸素種を発生させることが知られているので、LAMP1 に抗酸化酵素 prx1 を融合したタンパク質をリソソームに過剰発現させたところ、酵素活性依存的に Aβ42 蓄積に伴う細胞死が抑制された。

以上の結果から、リソソーム内に蓄積した Aβ42 凝集体が活性酸素を発生することで、リソソーム膜に損傷を引き起こし、その結果細胞死に至ることで細胞毒性を発揮していることを示唆していると考えられる。

Amyloid-ß, ROS, Lysosome

講演番号：3F11p12
講演日時、会場：3 月 28 日 16:21～ F 校舎 11 会場

亜鉛トランスポーターによる細胞内シグナル制御機構の解析

The analysis of intracellular signaling regulation by zinc transporter

○福江 和久、宮前 友策、増田 誠司、長尾 雅哉、神戸 大朋 (京大農)
○Kazuhisa FUKUE, Yusaku MIYAMAE, Seiji MASUDA, Masaya NAGAO, Taiho KAMBE (Kyoto Univ.)

亜鉛は生体内に 2～3 g 存在する必須微量元素である。その機能には、タンパク質の構造因子、酵素の触媒作用に関わる補因子としてだけでなく、様々な細胞外の刺激に応じて細胞内での情報伝達を担うセカンドメッセンジャーの役割が報告されている。亜鉛が欠乏すると、皮膚炎、脱毛症、味覚障害、免疫機能が低下し、小児では成長障害を示すことからもその重要性が分かる。

生体内における亜鉛は 2 価の陽イオンとして存在するため、脂質二重層で形成される生体膜を透過できない。したがって、組織や細胞における亜鉛の恒常性を制御している本体は、亜鉛トランスポーターとなる。亜鉛トランスポーターは細胞質内濃度を上昇させる向きに働く ZIP(Zrt- and Irt-like Protein)と減少させる向きに働く ZnT(Zinc Transporter)に大別される。

発表者は、セカンドメッセンジャーとしての亜鉛の機能に着目し、その機能に、細胞内小器官に局在する亜鉛トランスポーターがどのように関与しているか解明することを目的に解析を行った。

相同組換え率の高いニワトリ B リンパ球系の細胞である DT40 細胞を用いて、ゴルジ体や小胞体といった早期分泌経路に局在する ZIP である ZIP9 と ZIP13 を二重欠損した *ZIP9*$^{-/-}$*ZIP13*$^{-/-}$ DT40 細胞株(Δ9Δ13)を樹立した。この細胞株と DT40 野生株(WT)、それぞれのトランスポーター単独欠損株での通常培養条件における ERK(Extracellular signal-regulated kinase)のリン酸化を比較したところ、Δ9Δ13 においてリン酸化が優位に減少していることが判明した。また、このΔ9Δ13 において、細胞外刺激による応答や亜鉛イオノフォアである Zinc Pyrithione による細胞質内への直接的な亜鉛の流入といった各種刺激によっても ERK のリン酸化の上昇といった応答が見られないことも確認している。一方で、ZIP と逆向きに亜鉛を輸送する ZnT においても早期分泌経路状に存在する ZnT5、ZnT6、ZnT7 を三重欠損させた細胞株である *ZnT5*$^{-/-}$*ZnT6*$^{-/-}$*ZnT7*$^{-/-}$ DT40 細胞株(TKO)においては、WT と明確な変化は確認できなかった。早期分泌経路に局在する亜鉛トランスポーター5 種類を五重欠損させた *ZnT5*$^{-/-}$*ZnT6*$^{-/-}$*ZnT7*$^{-/-}$*ZIP9*$^{-/-}$*ZIP13*$^{-/-}$ DT40 細胞株(TKOΔ9Δ13)において、Δ9Δ13 通常培養条件にて顕著に減少していたリン酸化の回復が見られたものの、各種刺激に応じたリン酸化の上昇は WT ほど回復しないことも判明している。

本研究により、定常時、および、各種刺激応答時の ERK のリン酸化において早期分泌経路に局在する ZIP の重要性が示されるとともに、定常時の ERK のリン酸化に対する制御に ZnT の関与が示唆された。

zinc transporter, extracellular signal-regulated kinase

講演番号：3F11p13
講演日時、会場：3 月 28 日 16:32～ F 校舎 11 会場

亜鉛トランスポーターZnT5、ZnT6、ZnT7 を介した分泌型亜鉛要求性酵素の活性化機構

The regulation of zinc enzyme activity via Zn transporters: ZnT5, ZnT6 and ZnT7.

○宮崎 志保、宮前 友策、増田 誠司、永尾 雅哉、神戸 大朋（京大生命）
○Shiho MIYAZAKI, Yusaku MIYAMAE, Seiji MASUDA, Masaya NAGAO, Taiho KAMBE (Kyoto Univ.)

【目的】

亜鉛は、生体における必須微量元素の一つであり、その重要な機能の一つは酵素タンパク質の活性中心における補因子としての役割である。活性発現に亜鉛を必要とする酵素、すなわち亜鉛要求性酵素はヒトゲノム中に３００種類以上がコードされていると推定される。本研究では、これら亜鉛要求性酵素のうち、CD73（ecto ヌクレオチダーゼ）に着目し、細胞内初期分泌経路への亜鉛輸送を担う亜鉛トランスポーターである、ZnT5、ZnT6、ZnT7 と CD73 の活性化機構について解析を行った。また、既に同様の解析を行っている亜鉛要求性酵素 TNAP（組織非特異的アルカリフォスファターゼ）における知見を参考にした。

【方法と結果】

相同組換え効率の高い、ニワトリ B 細胞由来 DT40 細胞を用いて各種解析を行った。亜鉛トランスポーターZnT5、ZnT6、ZnT7 を欠損させた三重欠損株（triple knock out: TKO）を樹立し、野生株（WT）と TKO 株にヒト CD73 を安定に過剰発現させた株（WT+hCD73 株と TKO+hCD73 株）を作製した。CD73 活性と TNAP 活性はそれぞれ AMP 、*p*NPP（*p*-nitro phenyl phosphate）を基質とし、定量した生成物の吸光度を以て相対的な加水分解活性とした。

TKO+CD73 株においては、mRNA レベルでは CD73 が発現しているにも関わらず、Western Blotting 法では CD73 タンパク質が認められず、CD73 活性も WT+hCD73 株と比較して著しく低下した。また、TKO+hCD73 株に ZnT5、ZnT6、ZnT7 を単独、あるいは複数で再発現させた株では、TNAP 活性が回復した一方で、CD73 活性はほとんど回復しなかった。

さらに、WT+hCD73 株を亜鉛欠乏培地で培養したところ、CD73 活性は経時的に低下し、その後培地中に亜鉛を添加することで活性は回復した。この間、CD73 タンパク質は分解を受けることなく、安定に存在していた。

【考察】

亜鉛要求性酵素 CD73 は、細胞内初期分泌経路に局在する亜鉛トランスポーターZnT5、ZnT6、ZnT7 を介して活性が制御されるが、そのメカニズムは同じ亜鉛要求性酵素である TNAP とは異なっていることが示された。

zinc, enzyme, transporter

講演番号：3F11p14
講演日時、会場：3 月 28 日 16:43～ F 校舎 11 会場

シグナルペプチドのアミノ酸配列と成熟タンパク質の細胞内局在との相関
Correlation between Signal-peptide Sequences and Subcellular Localization of Mature Formed Proteins

○濱田 康太[1]、高知尾 尚志[1]、越中谷 賢治[1]、池田（向井） 有理[1,2] ([1]明治大・院理工、[2]明治大・理工)
○Kota Hamada[1], Naoyuki Takachio[1], Kenji Etchuya[1], Yuri Ikeda-Mukai[1,2] ([1]Grad. Sch. Sci & Tech., Meiji Univ., [2]Sch. Sci. & Tech., Meiji Univ.)

分泌経路を経由し局在化する多くのタンパク質は、小胞体移行シグナルを持つことが知られている。タンパク質を小胞体へ輸送した後に、シグナルペプチダーゼによって切断を受ける小胞体移行シグナルは、Signal Peptide（以下 SP）と呼ばれる。SP は疎水性アミノ酸により構成される疎水性領域を持つことが明らかにされている。SP はタンパク質の N 末端に存在し、タンパク質の合成が開始されると、まず SP 部分のみがリボソームから露出する。細胞質を漂う Signal Recognition Particle（複数のサブユニットからなる RNA-タンパク質複合体: 以下 SRP）は、露出した SP とリボソームごと結合する。SRP-リボソーム複合体は、小胞体膜上に存在する SRP 受容体と結合し、小胞体膜のトランスロコンにリボソームを受け渡す。上記の働きにより、小胞体内へのタンパク質の輸送が行われた後、成熟タンパク質のみが小胞輸送により適切な細胞内小器官へ輸送され、各々の機能を発揮する。

前述のとおり、SP は疎水性領域を保持することは明らかにされているが、明確なコンセンサス配列は定まっておらず、SP にはさまざまな配列バリエーションが存在する。しかしながら、SP のアミノ酸配列バリエーションの存在意義は明らかになっていない。

そこで本研究では、SP のアミノ酸配列が後ろに連なる成熟タンパク質の細胞内局在・小胞輸送に及ぼす影響をバイオインフォマティクスの手法と実験的手法を用いることで解析を行った。まず、バイオインフォマティクスの手法では、UniProtKB/Swiss-Prot Release 2014_01 から SP を持つ哺乳類由来タンパク質の SP のアミノ酸配列および成熟タンパク質の細胞内局在情報を抽出した。抽出した各配列について、成熟タンパク質の細胞内局在場所ごとに SP のアミノ酸出現頻度解析を行った。その結果、SP の疎水性領域から N 末端側にかけての残基長・アミノ酸の物理化学的性質が異なり、特徴領域を同定することができた。さらに主成分分析を行った結果、特に細胞外分泌タンパク質の SP とそれ以外の SP において、物理化学的性質が異なることが明らかになった。上記の結果をふまえ、実験的解析では、特徴領域のアミノ酸配列の性質が異なる、天然に存在するタンパク質の SP を複数用いて解析した。レポータータンパク質（Green Fluorescent Protein, mCherry）の N 末端に各 SP を挿入し、HeLa 細胞で共発現させて蛍光観察を行うことで、SP が細胞内局在・小胞輸送経路へ与える影響を比較検証した。

Signal-peptide, Subcellular Localization

講演番号：3F12a01
講演日時、会場：3 月 28 日 09:00～ F 校舎 12 会場

Human malonyl-CoA decarboxylase production using silkworm *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus (BmNPV) bacmid system and their decarboxylase activity

○In-Wook Hwang[1], Yu Makishima[2], Tomohiro Suzuki[3], Tatsuya Kato[2,4], Shin-Kyo Chung[5], Sungjo Park[6], Enoch Y. Park[1,2,4] ([1]Laboratory of Biotechnology, Integrated Bioscience Section, Graduate School of Science and Technology, Shizuoka University, 836 Ohya, Suruga-ku, Shizuoka, 422-8529, Japan., [2]Laboratory of Biotechnology, Department of Applied Biological Chemistry, Faculty of Agriculture, Shizuoka University, 836 Ohya, Suruga-ku, Shizuoka, 422-8529, Japan., [3]Research Institute of Green Science and Technology, Shizuoka University, 836 Ohya Suruga-ku, Shizuoka, 422-8529, Japan., [4]Laboratory of Biotechnology, Green Chemistry Research Division, Research Institute of Green Science and Technology, Shizuoka University, 836 Ohya Suruga-ku, Shizuoka, 422-8529, Japan., [5]School of Food Science and Biotechnology, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Republic of Korea., [6]Center for Regenerative Medicine, Mayo Clinic, 200 First Street SW, Rochester, MN, 55905, USA. Marriott Heart Disease Research Program, Division of Cardiovascular Diseases, Departments of Medicine, Molecular Pharmacology and Experimental Therapeutics, and Medical Genetics, Mayo Clinic, 200 First Street SW, Rochester, MN, 55905, USA.)

<Purpose> Decarboxylation of malonyl-CoA to acetyl-CoA by malonyl-CoA decarboxylase (MCD; EC 4.1.1.9) is a vital catalytic reaction for regulation of lipid metabolism. While phosphorylation/dephosphorylation of MCD is associated with enzymatic activity, the specific phosphorylation sites with their catalytic function have not been documented due to the lack of sufficient MCD production with proper post-translational modification. Here, we used silkworm-based BmNPV bacmid system to express human MCD (hMCD) and to evaluate the phosphorylation effects on enzymatic function.

<Method> To enhance the recombinant hMCD production, we designed a construct without a mitochondrial targeting sequence but with retaining the peroxisomal SKL sequence. The recombinant Δ39aa-hMCD with N-terminal FLAG tag was expressed in silkworm larvae and pupae, and purified using an anti-FLAG M2 affinity gel column. According to LC-MS/MS results, we constructed hMCD mutants using site-directed mutagenesis to evaluate the effect of dephosphorylation on hMCD activity. The purified Δ39aa-hMCD and their post-translational phosphorylation were determined by coomassie brilliant blue (CBB)-staining and western blotting analysis. Decarboxylase activity of purified Δ39aa-hMCD and their mutants was measured by the production of NADH in the coupled reactions.

<Results> The hMCD fused with FLAG tag was expressed in silkworm larvae and pupae using silkworm-based BmNPV bacmid system and purified by affinity chromatography. Purified hMCDs from silkworm displays proper phosphorylation and demonstrates coherent enzymatic activity, much higher than that observed in non-phosphorylated MCD. The mutation in the phosphorylation sites (S204G or Y405F of hMCD) identified by LC-MS/MS analysis substantially reduces the catalytic activity, indicating the functional importance of phosphorylation in modulating decarboxylase activity. Moreover, these phosphorylated residues are not in the locale of decarboxylation catalytic site, implicating the phosphorylation-induced global conformational change of MCD to alter the catalytic function. Thus, the phosphorylation of S204 and Y405 regulates the catalytic function of hMCD and silkworm-based BmNPV bacmid expression system offers an unfailing production platform implementing proper post-translational modification such as phosphorylation for functional analysis of eukaryotic proteins.

Human malonyl-CoA decarboxylase (hMCD), Phosphorylation/dephosphorylation, *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus

講演番号：3F12a02
講演日時、会場：3 月 28 日 09:11～ F 校舎 12 会場

マウス組織におけるキチナーゼ様タンパク質の遺伝子発現解析

Gene expression analysis of chitinase-like proteins in mouse tissues

○大野 美紗、貴田 雄太、坂口 政吉、菅原 康里、小山 文隆（工学院工）
○Misa OHNO, Yuta KIDA, Masayoshi SAKAGUCHI, Yasusato SUGAHARA, Fumitaka OYAMA (Kogakuin Univ.)

キチンは，*N*-アセチル-D-グルコサミンの重合体で，甲殻類，昆虫，寄生虫，真菌類など様々な生物に広く存在する。キチナーゼは，キチンを加水分解する酵素である。哺乳類は，キチンを合成しないが，二種類の活性のあるキチナーゼ，chitotriosidase（Chit1）と acidic mammalian chitinase（AMCase），を発現している。Chit1 は哺乳類で最初に発見されたキチナーゼで，ゴーシェ病，アルツハイマー病，慢性閉塞性肺疾患（COPD）患者や喫煙者でレベルが増加する。また，哺乳類は，構造的にキチナーゼと似ているが，キチンを分解する能力が欠損しているキチナーゼ様タンパク質（CLPs）も発現している。マウスは，主な CLPs として breast regression protein-39（BRP-39）[chitinase 3-like-1（Chi3l1），38-kDa glycoprotein（gp38k)]，Ym1 (Chi3l3)， Ym2 (Chi3l4) を発現している。BRP-39 は，マクロファージ，軟骨細胞，腫瘍細胞を含む様々な細胞で分泌されている糖タンパク質である。CLPs は，喘息，アレルギー，関節リウマチ，悪性腫瘍を含む種々の病気で，それらの発現が上昇することが報告されている。しかし，CLPs の生化学的機能はわかっていない。

我々は，これまでに二種類のキチナーゼと housekeeping 遺伝子などの対照遺伝子の発現を同じ尺度で定量する PCR システムを確立した。その結果，マウスでは AMCase が胃で，消化酵素並みの非常に高いレベルで発現するが，ヒトではほとんど発現していないことを見出した。本研究では，定量 PCR システムを発展させ，マウス組織で CLPs mRNA レベルを定量した。その結果，BRP-39 と Ym1 は，マウスの肺で大量に発現していた。一方，Ym2 mRNA は，胃，次いで肺で多かった。マウスの肺における BRP-39 と Ym1 の発現レベルは，二つの活性のあるキチナーゼよりも高く，すべての組織で恒常的に発現している housekeeping 遺伝子である，glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase に匹敵するレベルであった。以上のことから，マウスの肺で，BRP-39 と Ym1 は重要な役割をしていると考えられる。

Chitinase-like protein, Chitinase, Gene expression analysis

講演番号：3F12a03
講演日時、会場：3 月 28 日 09:22～ F 校舎 12 会場

骨格筋分化能はヒストン H3 バリアントの取り込みによって制御されている

Incorporation of Histone H3 Variants Dictates the Lineage Potential of Skeletal Muscle

○原田 哲仁、大川 恭行（九州大医）
○Akihito HARADA, Yasuyuki OHKAWA (Kyushu Univ.)

骨格筋分化では、ヒストン H3 バリアントの一つであるヒストン H3.3 が、分化前から分化特異的遺伝子を“マーキング”することで分化後の選択的な遺伝子発現をもたらす。つまり、ヒストンの選択的な取り込みは最も初期の遺伝子選択機構であると考えられる。しかしながら、各 H3 バリアントの分化特異的遺伝子に対する機能は不明な部分が多い。我々は、予め H3.3 によって“マーキング”された骨格筋分化特異的遺伝子にクロマチン上に最も多く存在する H3.1 を強制的に取り込ませることで、このような細胞では骨格筋分化能が抑制されることが示された。さらに、これらの遺伝子におけるヒストン修飾状態を解析すると、遺伝子活性を示す H3K4me3 修飾が減少し、遺伝子抑制を示す H3K27me3 修飾が上昇しており、これにより骨格筋遺伝子の発現が抑制されることが示唆された。対照的に、H3.3 の過剰発現によって、H3.3 の取り込み増加と H3K4me3 修飾の増加が引き起こされることで、骨格筋分化が促進されていた。NIH3T3 線維芽細胞に MyoD を強制発現させると骨格筋形質転換を誘導することが出来るが、この際、MyoD 依存的に骨格筋特異的遺伝子に H3.3 が取り込まれ“マーキング”されることで骨格筋分化能を獲得する。この系を用いて同様の評価を行った結果、H3.3 を安定に発現させた NIH3T3 線維芽細胞に MyoD を発現させたとき、野生型に比べ骨格筋分化が促進されていた。一方で、H3.1 を過剰発現させた NIH3T3 線維芽細胞では、MyoD の発現後の骨格筋分化能が抑制されていた。また、マウス胚において、活性型 H3K4me3 と抑制型 H3K27me3 からなる双極修飾は、胚性骨格筋分化よりも前に骨格筋特異的遺伝子の H3.3 が取り込まれた領域に生じることが明らかとなった。これらの結果は、細胞の分化能が、クロマチンへの H3.3 の取り込みを介して確立され、H3 バリアントの取り込み比によりヒストン修飾状態を調節することにより、制御されていることを示している。

myogenesis, epigenetics, histone variant

講演番号：3F12a04
講演日時、会場：3 月 28 日 09:33～ F 校舎 12 会場

ニワトリ始原生殖細胞における Prdm14 の機能解析
Molecular Cloning and Analysis of Chicken Prdm14

○金岡 英徳、奥嵜 雄也、村瀬 佑介、西島 謙一、飯島 信司（名大院工）
○Hidenori KANEOKA, Yuya OKUZAKI, Yusuke MURASE, Ken-ichi NISHIJIMA, Shinji IIJIMA (Nagoya Univ.)

【背景と目的】

鶏卵は人類にとって重要なタンパク源であり、その高い経済性からトランスジェニックニワトリをタンパク質性医薬品生産のため生きたバイオリアクターとして利用する技術の開発が進められつつある。ここ数年でトランスジェニックニワトリ作製技術は世界的に大きく進歩した。我々を含めウイルスベクター法によるトランスジェニックニワトリ樹立の報告が増えてきた上に、不完全ではあるが ES 細胞の樹立や、始原生殖細胞(PGC)の株化とトランスジェニックニワトリ作製への応用が報告されている。しかし、これらの方法によるトランスジェニック作製効率は未だに不十分である。PGC は将来卵子・精子に分化する細胞であり、この細胞を維持・増殖し、遺伝子操作を行うことが出来れば、トランスジェニック作製効率は飛躍的に向上すると思われる。本研究では、ニワトリ PGC のさらなる理解のために、マウス PGC においてその形質の維持に重要であることが明らかとなった転写因子 Prdm14 のニワトリホモログをクローニングし、その解析を行った。

【方法・結果】

はじめにニワトリ Prdm14 の発現パターンを解析した結果、ニワトリ PGC において高い発現が見られ、さらに発生段階のはやい PGC でより高い発現が観察された。次に、機能解析のためにニワトリ Prdm14 のクローニングを行った。データベースに登録されたニワトリ Prdm14 は N 末端領域に欠失が見られたので、5’RACE により完全長 cDNA を取得した。新たに取得したニワトリ Prdm14 は 486 アミノ酸で C 末端に位置する Zn finger domain と中央に位置する PR/SET domain はマウス Prdm14 と高い相同性を示したが、N 末端領域の特異性は低かった。この Prdm14 をニワトリの胚盤葉から採取した細胞に導入したところ、cvh や dazl など生殖細胞マーカー遺伝子の発現上昇が見られた。さらに cvh プロモーターを用いて、レポーターアッセイを行うと、Prdm14 に応答して発現の上昇が見られた。本研究により、Prdm14 はニワトリにおいても生殖細胞分化の重要な因子であることが示唆された。

chicken, primordial germ cell, Prdm14

講演番号：3F12a05
講演日時、会場：3 月 28 日 09:44～ F 校舎 12 会場

性差因子 MafB の性差発現制御機構の解明
Sexually dimorphic expression of Mafb regulates masculinization of the embryonic urethra
○鈴木 堅太郎[1]、松下 祥子[1]、鈴木 裕子[1]、沼田 朋和[1]、日野 信次朗[2]、佐藤 哲也[3]、高橋 智[4]、中尾 光善[2]、須山 幹太[3]、山田 源[1]([1]和歌山県立医大先端研、[2]熊本大発生研、[3]九州大生医研、[4]筑波大医)
○Kentaro Suzuki[1], Syoko Matsushita[1], Hiroko Suzuki[1], Tomokazu Numata[1], Shinjiro Hino[2], Tetsuya Sato[3], Satoru Takahashi[4], Mitsuyoshi Nakao[2], Mikita Suyama[3], Gen Yamada[1]([1]wakayama Med. Univ., [2]Kumamoto Univ., [3]Kyushu Univ., [4]Univ. of Tsukuba)

外生殖器はその発生過程の中でアンドロゲンの作用により形態的雌雄差を生じる（性差形成）。この性差形成におけるアンドロゲンシグナルの必要性は、今から６０年以上も前に提唱されていた。しかし、アンドロゲンがどのような分子を介して形態の性差を誘導するのか？その分子基盤は長い間謎であった。我々は、マウス外生殖器発生過程をモデルとしてアンドロゲンの下流因子の探索を続けてきた。その結果、雄でのみ強く発現する因子（性差因子）として bZIP 型転写因子である MafB を同定した。MafB は、雄の外生殖器原基に強く発現し、アンドロゲン投与実験およびアンドロゲンの特異的レセプター（AR）のノックアウトマウス（AR KO マウス）の解析から、アンドロゲンの新規下流遺伝子である可能性が示唆された。さらに MafB のノックアウトマウスを解析したところ、雄特有の尿道形成がうまくいかず、尿道下裂様の形成異常を呈することがわかった。よって MafB は、アンドロゲンによる外生殖器の性差形成過程において不可欠なエフェクター因子であることがわかった[1)]。

しかし、アンドロゲンシグナルがどのように MafB の性差発現を制御しているのか？その発現制御メカニズムの解明はこれからの課題である。*in silico* 解析から MafB 発現制御領域にいくつかのアンドロゲン応答配列（ARE）が存在することを見出した。そこで外生殖器の性差形成過程においてこの ARE の意義を検証するため、さらに MafB 以外の AR 下流遺伝子を同定するため次世代シーケンサーによる *in vivo* AR-ChIP 解析系の確立を試みた。本大会では、マウス胎仔組織を用いた *in vivo* AR-ChIP 解析の現状、さらに外生殖器性差形成過程における新たなアンドロゲン下流遺伝子の可能性について論議したい。

1）**Suzuki K.** et al, Sexually dimorphic expression of Mafb regulates masculinization of the embryonic urethral formation. ***Proc Natl Acad Sci U S A.*** 2014 111(46):16407-16412.

androgen, Sexual dimorphism, gene regulation

講演番号：3F12a06
講演日時、会場：3 月 28 日 10:05～ F 校舎 12 会場

マスト細胞において GATA3 は Th2 型サイトカインの発現を制御する

GATA3 regulates the expression of Th2 cytokines in mast cells

○八代 拓也[1]、奥村 康[2]、西山 千春[1] ([1]東京理大　生物工、[2]順天堂大　医)
○Takuya YASHIRO[1], Ko OKUMURA[2], Chiharu NISHIYAMA[1] ([1]Tokyo Univ. of Sci., [2]Juntendo Univ.)

【目的】GATA3 は Th2 細胞分化のマスターレギュレーターであり、IL-4 や IL-5、IL-13 といった Th2 型サイトカインの遺伝子発現に関わることが明らかとなっている。マスト細胞 (MC; Mast cell) も活性化すると Th2 型サイトカインを産生することが知られているが、その制御機構は明らかになっていない。近年、MC の分化に GATA3 が必須であることが示されたことから、我々は MC における Th2 型サイトカインの発現に GATA3 が関与するかについて検討した。
【方法・結果】BALB/c マウス由来の骨髄細胞を IL-3 および SCF 存在下で培養し、BMMC (Bone marrow-derived MC)を作製した。BMMC を活性化させるために IgE 架橋や IL-33、LPS で刺激した後、Th2 型サイトカインの発現量を qPCR および ELISA にて測定した。その結果、いずれの刺激においても Th2 型サイトカインの発現が大きく上昇することが確認された。続いて、GATA3 に対する siRNA をエレクトロポレーション法にて BMMC に導入した後、同様に刺激して Th2 型サイトカインの発現量を解析した結果、GATA3 をノックダウンすると LPS 刺激による IL-13 の発現誘導が抑制されることが明らかとなった。一方、LPS 刺激により活性化する細胞内シグナル伝達経路を Western blotting により解析したところ、p38 および JNK が活性化することが示された。そこで、これらの阻害剤を用いて LPS 刺激による IL-13 発現誘導への影響を調べた結果、p38 および JNK いずれも IL-13 の発現誘導に関与することが明らかとなった。さらに、GATA3 のリン酸化量を Western blotting により解析したところ、LPS 刺激による p38 および JNK の活性化依存的に GATA3 のリン酸化が亢進することが示された。
　以上の結果から、LPS 刺激されたマスト細胞において、p38 および JNK 経路が活性化し、GATA3 のリン酸化が亢進することで、IL-13 の発現上昇に寄与することが示唆された。

Mast cell, GATA3

講演番号：3F12a07
講演日時、会場：3 月 28 日 10:16～ F 校舎 12 会場

PLSCR3 は脂肪前駆細胞 3T3-L1 細胞分化の負の制御因子として機能する
PLSCR3 functions as a nagative regulator of adipogenesis in mouse 3T3-L1 preadipocytes
○猪川 亮、犬塚 達俊、高原 照直、柴田 秀樹、牧 正敏 (名大院生命農)
○Akira INOKAWA, Tatsutoshi INUZUKA, Terunao TAKAHARA, Hideki SHIBATA, Masatoshi MAKI (Grad.Sch.Bioagric.Sci., Nagoya Univ.)

Phospholipid scramblase (PLSCR, 以下 Scr)には 5 種類のアイソフォーム (Scr1-5)が存在する。一次構造上、Scr の C 末端側が膜会合性転写調節因子である Tubby (TUB)や Tubby-like protein (TULPs)の Tubby domain に似ており、Scr ファミリーは Tubby-like protein スーパーファミリーに属す。G タンパク共役型受容体の活性化によりホスファチジルイノシトール 4,5-ビスリン酸(PIP_2)に結合している TUB や TULPs は細胞膜から核に移行する。また、Scr1 は転写調節因子として働き、イノシトール三リン酸レセプター遺伝子の発現を活性化することが報告された。そのため Scr3 は転写調節因子の働きを持つと考えられるが、定かではない。一方、Scr3 ノックアウトマウスは、腹部脂肪の蓄積、血中の脂質濃度の上昇、インシュリン抵抗性の生活習慣病症状を示す。当研究室ではこれまでに Scr3 が細胞外膜小胞エクソソームに包まれて細胞外分泌されることを明らかにした。本研究では脂質蓄積と Scr3 の関係を明らかにするために、マウス脂肪前駆細胞株 3T3-L1 の分化過程における Scr3 の役割を調べた。

3T3-L1 細胞分化過程における Scr3 の発現をウェスタンブロットや RT-qPCR で解析したところ、細胞内の Scr3 タンパク質と Scr3 mRNA はそれぞれ著しく減少した。さらに Scr3 タンパク質の細胞外分泌量は分化に伴って増加した。細胞内 Scr3 タンパク質減少は細胞内 Scr3 mRNA 減少と Scr3 タンパク質分泌亢進によるものと考えられた。細胞分化における Scr3 タンパク質減少の意義を理解するために 3T3-L1 細胞にレトロウイルスベクターを用いて Scr3 を一過性に発現させ、トリグリセリド蓄積に対する影響を調べた。その結果、Scr3 過剰発現はコントロールベクターと比較してトリグリセリド蓄積を抑えた。3T3-L1 脂肪細胞分化過程では IBMX や Dexamethasone によって前期段階転写因子である C/EBPβ と C/EBPδ が誘導される。その後、後期段階転写因子である C/EBPα や PPARγ が C/EBPβ と C/EBPδ によって誘導される。また、後期段階転写因子は ER ストレス応答型 XBP1 によっても誘導される。Scr3 過剰発現が細胞分化過程経路のどの段階に影響を与えるか調べた。C/EBPβ と C/EBPδ (前期段階転写因子) mRNA 発現誘導に対して Scr3 過剰発現の影響はなかった。一方、C/EBPα や PPARγ (後期段階転写因子) mRNA や ER ストレス応答型 XBP1 mRNA 発現誘導を抑制した。従って、Scr3 は 3T3-L1 細胞分化過程における前期段階から後期段階への移行に対する負の因子として機能すると示唆された。

PPARγ, adipogenesis, 3T3-L1

講演番号：3F12a08
講演日時、会場：3 月 28 日 10:27～ F 校舎 12 会場

網羅的トランスクリプトーム解析による破骨細胞選択的高発現を示す遺伝子の探索

Comprehensive transcriptomics-based exploration of genes expressed selectively and predominantly expressed in osteoclasts

○石橋 宰[1]、小谷 康斗[1]、今村 亮俊[2]、今町 直登[2]、鈴木 譲[3]、秋光 信佳[2]、目良 恒[4]、吉矢 晋一[5]、乾 隆[1] ([1]大阪府大生命環境、[2]東京大アイソトープ、[3]東京大新領域、[4]武庫川女子大スポーツ健康、[5]兵庫医大整形)

○OSAMU ISHIBASHI[1], YASUTO KOTANI[1], KATSUTOSHI IMAMURA[2], NAOTO IMAMACHI[2], MINORU SUZUKI[3], NOBUYOSHI AKIMITSU[2], HISASHI MERA[4], SHIN-ICHI YOSHIYA[5], TAKASHI INUI[1] ([1]Osaka Pref. Univ., [2]Tokyo Univ. Isotope, [3]Tokyo Univ. Front. Sci., [4]Mukogawa Women's Univ., [5]Hyogo Col. Med.)

【目的】現在までに破骨細胞を標的とした様々な骨吸収阻害剤が開発され、骨粗鬆症治療薬として一定の成果が収められている。しかし、 bisphosphonate 製剤服用中の歯科処置による顎関節壊死に代表されるように、これらの薬剤は副作用などの問題から使用が制限される場合も多い。このことから、異なる作用機序を有する新規骨吸収阻害剤を開発することは、臨床的に大きな意味を持つと考えられる。本研究では、破骨細胞における新たな薬剤標的分子の探索を目的とし、マウス成熟破骨細胞の網羅的トランスクリプトーム解析（RNA-seq）を行った。

【材料と方法】マウス単球系細胞株 RAW264 をディッシュに播種し一晩培養した後、 100 ng/ml RANKL 存在下にて 4 ～ 5 日間培養し、破骨細胞への分化を誘導した。なお、破骨細胞分化の成否については TRAP 染色により確認した。その後、プロナーゼ E 処理およびピペッティングにより未分化細胞を除去することで破骨細胞を純化し、定法により RNA を抽出した。この RNA から poly-A RNA を分離して cDNA を作製した後、次世代シーケンサー HiSeq2000 を用いて RNA-seq を行った。さらに、得られたデータから補正値であるreads per kilobases per million (rpkm)値を算出し、遺伝子発現量の指標とした。

【結果】本解析の結果、成熟破骨細胞における rpkm 値が、 RANKL 非存在下で培養した未分化 RAW264 細胞と比較して 100 倍以上の値を示す遺伝子が62種類存在することが明らかとなった。この中には、破骨細胞特異的遺伝子として知られる cathepsin K （ 3,900 倍）や TRAP （ 1,700 倍）が含まれていることから、破骨細胞が高度に純化されていることが示された。また、既に破骨細胞における発現や機能について報告されている遺伝子が多く含まれる一方で、そのような報告が存在しない遺伝子も多く見出された。その中の１つであるリガンド未知の G 蛋白質共役型受容体（オーファン GPCR ）の遺伝子について、マウスの主要臓器と破骨細胞における発現を定量的 RT-PCR により比較解析したところ、破骨細胞における選択的な高発現が確認された。さらに、本遺伝子のヒト相同遺伝子について、巨細胞腫（破骨細胞様細胞を多く含む良性腫瘍）組織とヒト主要臓器における遺伝子発現を比較解析した結果、巨細胞腫に選択的な高発現が認められた。

【結論】新規骨粗鬆症治療薬の開発を目指す上で、オーファン GPCR を含む分子が有望な新規標的分子となり得る可能性が示唆された。

osteoclast, transcriptome, G-protein-coupled receptor

講演番号：3F12a09
講演日時、会場：3 月 28 日 10:38～ F 校舎 12 会場

血管内皮間葉転換(EndMT)を制御するエピゲノム制御因子の探索

Isolation and characterization of epigenetic regulators involved in endothelial-mesenchymal transition.

○諸岡 信克 (群馬大生調研)
○Nobukatsu MOROOKA (Gunma Univ.)

(目的)血管内皮細胞は、遷延化した炎症刺激により多能性前駆細胞へと脱分化し、最終的に間葉系の細胞へと再分化することが知られている。この特徴的な形質転換は血管内皮間葉転換(Endothelial mesenchymal transition: EndMT)と呼ばれ、ガンの進展や動脈硬化性疾患などの発症と密接に関わっている。この多段階の形質転換には TGF-β を介したシグナル伝達が関与し、その分子機序が注目されているが、シグナルの統合として機能するエピゲノム制御のメカニズムはほとんど明らかになっていない。そこで本研究では、血管内細胞における EndMT の進行制御において中心的な役割を果たす、エピゲノム制御因子および転写因子を同定することを目的とした。
(方法・結果)先ず、血管内皮細胞の培養細胞に TGF-β を添加し、EndMT を *in vitro* で再現した。次に、血管内皮細胞、多能性前駆細胞および間葉系細胞マーカー遺伝子の mRNA の発現レベルを指標にした EndMT 評価系を構築した。この評価系を用いて、レンチウイルスによるエピゲノム制御因子と転写因子の網羅的な shRNA スクリーニングを行い、EndMT の進行を制御する責任因子の探索を行った。その結果、ノックダウンにより EndMT の進行が顕著に変化するヒストン修飾因子および転写因子を取得した。現在は、取得した因子の中でヒストン修飾因子に注目し、EndMT の進行制御における機能を解析している。

EndMT, epigenetic regulation, TGF-ß

講演番号：3F12a10
講演日時、会場：3 月 28 日 10:49～ F 校舎 12 会場

PKC-δにより誘導される hTERT 転写抑制の分子メカニズム

molecular mechanisms for the PKC-δ-induced hTERT repression

○高木 大司[1]、山下 俊太郎[2]、片倉 喜範[3] ([1]九大院シス生、[2]学振特研、[3]九大院農院)
○Hiroshi TAKAKI[1], Shuntaro YAMASHITA[2], Yoshinori KATAKURA[3] ([1]Grad. Sch. Sys. Life Sci., Kyushu Univ, [2]Research Fellowship for Young Scientist, Japan Society for the Promotion of Science, [3]Fac. Agr., Kyushu Univ)

【背景・目的】これまでに我々は、PKC-δが hTERT コアプロモーター（hTERTp）内の E-box 依存的に hTERT 転写抑制を引き起こすことを明らかにしている。そこで本研究では、PKC-δ により誘導される hTERT 転写抑制の分子メカニズムを明らかにすることを目的として研究を行った。

【材料及び方法】
モデル細胞としては、ヒト肺ガン細胞株である A549 細胞を用いた。遺伝子発現解析はプロモーターアッセイ及び定量 RT-PCR 法により、プロモーター領域への転写制御因子の結合は、特異的抗体を用いた Chromatin immunoprecipitation（ChIP）アッセイにより検証した。遺伝子発現のノックダウンは、shRNA を発現するレトロウイルスベクターシステムを用いて行った。

【結果及び考察】これまでに、hTERTp 内の E-box 依存的な転写活性化因子として c-MYC が知られている。そこで本研究ではまず、PKC-δ による hTERT 転写抑制にたいする c-MYC の寄与につい検証した。ChIP アッセイの結果、PKC-δ により hTERTp に結合している c-MYC の量が有意に減少していることが確認された。
そこで次に、hTERT 転写抑制に対する転写抑制因子の寄与について検証した。ChIP アッセイの結果、PKC-δ により、hTERTp への転写抑制因子複合体（NFX1-91、mSin3A、HDAC）の結合量が増大し、それとともに hTERTp 領域のヒストンのアセチル化レベルも減少していることが確認された。さらに、NFX1-91 及び mSin3A のノックダウン、及びトリコスタチン A による HDAC 活性の抑制により、PKC-δによる hTERT 転写抑制の解除が引き起こされることが明らかとなった。
以上の結果から PKC-δ は、hTERTp からの転写活性化因子 c-MYC の解離とそれとともに転写抑制因子複合体（HDAC-mSin3A-NFX1-91）の形成及び hTERTp へのリクルートを誘導することで、hTERT の転写を抑制しているものと考えられた。今後は、PKC-δ による転写抑制因子複合体の形成メカニズムに関し解析を進める予定である。

telomerase, PKC-δ, transcription

講演番号：3F12a11
講演日時、会場：3 月 28 日 11:10～ F 校舎 12 会場

ビタミン B1 欠乏によるマウス海馬ニューロン数とスパイン密度の減少

Decrease in neuron number and spine density in the mouse hippocampus by thiamine deficiency

○岸本 拓也[1]、大石 諭[1]、永田 幹[1]、長谷川 俊介[1,2]、喜田 聡[1,2]([1]東京農大・農・バイオ、[2]CREST,JST)
○Takuya KISHIMOTO[1], Satoru OHISHI[1], Kan NAGATA[1], Shunsuke HASEGAWA[1,2], Satoshi KIDA[1,2] ([1]Dep. of Bioscience, Tokyo Univ. of Agriculture, [2]CREST,JST)

必須栄養素の一つであるビタミン B1（B1）は糖代謝系や ATP 産生に対する補酵素として機能するだけではなく、神経系の機能維持にも重要な役割を果たすことが示されている。特に、ヒトにおけるウェルニッケコルサコフ症候群を代表例として、B1 欠乏が記憶障害を引き起こすことが明らかにされているが、その発症メカニズムは不明である。我々はこれまでに、B1 欠乏から 3 週間の回復処置を施した B1 欠乏マウスでは、運動能力、行動活性、さらに、扁桃体依存的記憶形成能力は正常であるものの、B1 欠乏から回復後も少なくとも 3 ヶ月持続する慢性的な海馬依存的記憶形成能力の障害が認められることを明らかにした。以上の結果から、B1 欠乏は不可逆的に海馬機能の低下を導くと結論している。本発表では、B1 欠乏が海馬を中心とした脳領域に及ぼす影響を組織学・形態学的に解明をすることを目的とした。野生型 C57/B16N マウスあるいはニューロン特異的に GFP を発現する Thy1-GFP マウスに B1 欠乏飼料を 10 日間給餌し、この間 B1 アンタゴニストであるピリチアミンを連日腹腔内投与し、B1 欠乏状態を誘導した（B 1 欠乏マウス）。その後、通常飼料を 3 週間以上給餌し、B1 欠乏状態から回復させた群を B1 欠乏回復マウスとした。まず、蛍光免疫染色法を用いて NeuN をマーカーとしてニューロン数を測定した結果、B1 欠乏マウスの海馬歯状回ではニューロン数の顕著な低下が観察され、一方、扁桃体及び前頭前野ではこの低下は観察されなかった。さらに、Thy1-GFP マウスを用いたスパインイメージングの結果、B1 欠乏マウスでは海馬歯状回においてシナプス密度の顕著な減少が観察された。以上の結果と、B1 欠乏処置から 3 ヶ月経過しても海馬の萎縮が起こっている点から、B1 欠乏回復マウスに認められた海馬依存的記憶形成能力の障害は、B1 欠乏によって誘導された海馬ニューロンの変性が原因であると考察した。

Thiamine, hippocampus, memory

講演番号：3F12a12
講演日時、会場：3 月 28 日 11:21～ F 校舎 12 会場

海馬レチノイン酸情報伝達経路による記憶形成能力の制御機構の解析

Positive regulation of memory formation by retinoid signaling pathway in the hippocampus

○海老原 てい[1]、篠沢 貴寛[1]、野本 真順[1]、内田 周作[1]、喜田 聡[1,2]（[1]東京農大院・農・バイオ、[2]科学技術振興機構 CREST）
○Tei EBIHARA[1], Takahiro SHINOZAWA[1], Masanori NOMOTO[1], Shusaku UCHIDA[1], Satoshi KIDA[1,2] ([1]Dept. of Bioscience, Tokyo Univ. of Agriculture, [2]CREST・JST)

ビタミン A の活性本体であるレチノイン酸は転写調節因子レチノイン酸受容体（RAR）のリガンドとして機能している。この RAR は脳内で広範囲に発現していることから、脳機能において重要な役割を果たしていることが予想される。我々は、これまでに、前脳特異的ドミナントネガティブ型 RARα過剰発現マウス（dnRAR マウス）の作製及び解析を行い、レチノイン酸情報伝達系の不活性化（loss-of-function）により、海馬依存性記憶能力に障害が観察されることを明らかにしてきた（Nomoto et al., 2012）。本発表では、海馬依存性記憶形成能力に対するレチノイン酸情報伝達系の役割を明らかにすることを目的とし、遺伝学的手法を用いてレチノイン酸情報伝達系の活性化（gain-of-function）の効果を解析した結果を中心に報告する。実際には、テトラサイクリン依存的発現制御システムを用いて、前脳特異的に野生型 RARα を過剰発現するマウス（RARα-OE マウス）を作製し、解析した。その結果、RARα-OE マウス海馬では、RARα標的遺伝子である RARβ の mRNA 発現量が ATRA 投与 4 時間後に野生型マウスに投与した場合に比較して顕著に増加しており、この変異型マウスではより強くレチノイン酸情報伝達系が活性化されることが示唆された。続いて、海馬依存性記憶形成能力に対するレチノイン酸情報伝達の活性化の影響を解析した結果、興味深いことに、RARα-OE マウスでは、ATRA 投与後に記憶形成能力が顕著に向上することが観察された。以上より、海馬におけるレチノイン酸情報伝達系の活性化が、海馬依存的記憶形成能力が向上を導くことが示され、レチノイン酸情報伝達系は海馬記憶機能を正に制御する情報伝達経路であると結論した。現在、次世代シークエンサーを用いて RARα-OE マウスのトランスクリプトーム解析を行い、レチノイン酸情報伝達経路によって制御を受ける記憶制御因子群の同定を進めている。

retinoic acid, memory, hippocampus

講演番号：3F12a13
講演日時、会場：3 月 28 日 11:32～ F 校舎 12 会場

ERK 情報伝達系による記憶想起のサーカディアン制御
ERK signaling mediates time-dependent regulation of memory retrieval
○渡辺 玉絵[1]、長谷川 俊介[1,2]、喜田 聡[1,2] ([1]東京農大院、[2]科学技術復興機構 CREST)
○Tamae WATANABE[1], Shunsuke HASEGAWA[1,2], Satoshi KIDA[1,2] ([1]Tokyo Univ. of Agriculture, [2]CREST,JST)

認知機能とサーカディアンリズムとの関連性は古くから指摘されているものの、その実体は不明である。サーカディアンリズムの中枢は視床下部の視交叉上核（SCN）であり、一方、分子レベルでは、転写調節因子 BMAL1 による転写制御を起点としてサーカディアン転写リズムが産生される。この転写リズムは SCN のみならず末梢組織でも観察され、この細胞レベルの転写リズムにより細胞独自の時計機能が発揮され、SCN は個体全体のリズムを統合しているものと考えられている。我々は、学習・記憶能力と前脳領域で発振しているサーカディアン転写リズムとの関係を明らかにするために、前脳特異的にドミナントネガティブ型 BMAL1（dnBMAL1）を発現するマウス（dnBMAL1 マウス）を作製し、解析してきた。これまでに、dnBMAL1 マウスでは前脳領域特異的にサーカディアンリズムが破壊されていること、さらに、明期開始 10 時間後（ZT10）特異的に、すなわち、時間帯特異的に海馬依存性記憶の想起に障害が観察されることから、前脳時計機能が記憶想起をサーカディアン制御すると結論している。本発表では、記憶想起のサーカディアン制御に関わる情報伝達経路を同定することを目的とした。この目的に向けて、ERK 情報伝達系の活性化が記憶想起を制御することに着目し、記憶想起のサーカディアン制御に対する ERK 情報伝達系の役割を解析した。野生型マウスを用いて、ZT4 または ZT10 における記憶想起に対する ERK 活性化阻害剤（SL327）の影響を解析した。その結果、低濃度の SL327 投与（2mg/kg）によって、ZT10 における記憶想起は阻害されるものの、ZT4 における記憶想起は阻害されないことが観察された。このように、dnBMAL1 マウス同様に、ERK 活性化阻害による想起効率の低下は ZT4 よりも ZT10 において顕著に観察されたことから、ERK 情報伝達経路が記憶想起効率のサーカディアン制御を媒介していることが示唆された。

Circadian rhythm

講演番号：3F12a14
講演日時、会場：3 月 28 日 11:43～ F 校舎 12 会場

Reconsolidation-update による恐怖記憶制御の組織学的解析

Mechanisms for regulation of fear memory by reconsolidation-update

○石川 理絵[1]、喜田 聡[1,2] ([1]東農大院・農・バイオ、[2]CREST,JST)
○Rie ISHIKAWA[1], Satoshi KIDA[1,2] ([1]Dep. of Bioscience, Tokyo Univ. of Agriculture, [2]CREST, JST)

心的外傷後ストレス障害（PTSD）は恐怖記憶が原因となった精神疾患である。現在、PTSD の最も有効な治療法は、生物学的基盤を「恐怖記憶消去」とする認知行動療法「持続エクスポージャー療法」である。しかし、恐怖記憶消去を誘導しても、長期間経過すると恐怖記憶は自然回復するため、この自然回復が PTSD 治療に応用する上で問題となっている。一方、近年の研究において、再固定化を誘導後、速やかに消去を誘導させることで、恐怖記憶の自然回復が観察されなくなる Reconsolidation update（RU）と呼ばれる現象が報告された（Monfils et al., 2009）。しかし、RU 誘導を制御する組織学的なメカニズムについては理解されておらず、RU 誘導により自然回復が阻害されるメカニズムも解明されてない。そこで、本研究では RU の制御基盤を解明する端緒として、恐怖条件付け文脈学習課題を用いて RU 行動解析系を確立し、RU 制御機構を組織学的に解析した。マウスを条件付けチャンバーに入れ、0.4mA、2 秒間の電気ショックを与えて恐怖記憶を形成させた。この 24 時間後に、再固定化を誘導するためにマウスを条件付けチャンバーに 3 分間戻し、この 30 分後に消去を誘導するためにマウスを条件付けチャンバーに再度 30 分間戻した。その後、遺伝子発現誘導とプロテオソーム依存的タンパク質分解のマーカーとして、それぞれ初期応答遺伝子 c-fos 発現及びポリユビキチン鎖（Ub-Lys48）を用いて、RU 誘導時に生化学的変化が観察される脳領野を免疫組織化学染色法により同定した。その結果、海馬では、条件付けチャンバーに 3 分間戻した場合に観察される c-fos 及び Ub-Lys48 陽性細胞がその後 30 分間チャンバーに再度戻した後にも引き続き観察されることが示されたのに対して、扁桃体では、30 分間再度チャンバーに戻すことで、c-fos 及び Ub-Lys48 陽性細胞の増加が観察されなくなることが明らかとなった。一方、前頭前野 prelimbic 領域では再度チャンバーに 30 分間戻した後に c-fos 及び Ub-Lys48 陽性細胞数の増加が観察されるようになったのに対して、前頭前野 infralimbic 領域では観察されなかった。以上の結果を我々の過去の解析結果と比較すると、RU 誘導時には、消去誘導時に観察される扁桃体及び前頭前野 IL 領域の遺伝子発現誘導とタンパク質分解が活性化されず、一方、海馬では消去誘導時には観察されなくなる遺伝子発現誘導が逆に観察されることが明らかとなった。従って、RU 処置により、扁桃体-前頭前野-海馬では、消去誘導時とは異なる神経ネットワークが構築され、このネットワーク機能により恐怖記憶の自然回復が妨げられることが強く示唆された。

PTSD, Fear memory, Reconsolidation update

講演番号：3F12a15
講演日時、会場：3 月 28 日 11:54～ F 校舎 12 会場

PI3K は BMAL1/CLOCK を介する転写制御を正に調節する
PI3K positively regulates BMAL1/CLOCK-mediated transcription
○森下 良一[1]、三浦 大樹[1]、喜田 聡[1,2] ([1]東京農大院・農・バイオ、[2]JST, CREST)
○Yoshikazu MORISHITA[1], Daiki MIURA[1], Satoshi KIDA[1,2] ([1]Dep. of Bioscience, Tokyo Univ. of Agriculture, [2]JST, CREST)

BMAL1/CLOCK によって仲介されるサーカディアン転写リズムは行動･生理レベルでサーカディアンリズム産生に重要な役割を果たしている。現在までに、BMAL1/CLOCK を介した転写リズムは正と負の転写-翻訳フィードバックループによって産生されることが知られている。一方、BMAL1/CLOCK を介したサーカディアン転写リズムの制御機構に対する細胞内情報伝達系の機能と役割は未だ不明である。本研究では、BMAL1/CLOCK を介した転写リズム制御機構解明を目的として、サーカディアン転写リズムを制御する細胞内情報伝達経路の同定を試みた。NIH3T3 細胞における血清ショックによるサーカディアン転写リズムの同調系を利用し、血清ショック後の BMAL1/CLOCK 標的遺伝子群の mRNA 発現レベルに対する情報伝達因子群の選択的阻害剤添加の影響を定量的 RT-PCR 法により解析した。その結果、PI3K 活性の薬理学的阻害が複数の BMAL1/CLOCK 標的遺伝子群の mRNA 発現リズムの変化を導き、特に、Dbp mRNA の発現レベルを顕著に低下させることが観察された。この結果と一致して、レポーター解析においても PI3K 阻害が Dbp 遺伝子のプロモーター活性を顕著に低下させることが観察された。さらに、shRNA を用いて PI3K のノックダウン効果を解析した結果、触媒サブユニット p110α ノックダウンの効果は観察されなかったものの、p110β のノックダウンにより Dbp mRNA の発現レベルが有意に低下した。また、ChIP 解析を行ったところ、PI3K の阻害により Dbp 遺伝子のプロモーター領域の E-box 配列に対する BMAL1/CLOCK の結合に低下が認められた。以上の結果から、PI3K は E-box 配列に対する BMAL1/CLOCK の結合を調節することで BMAL1/CLOCK が産生する転写リズムに貢献しているメカニズムの存在が示唆された。

circadian rhythm, PI3K

講演番号：3F12p01
講演日時、会場：3 月 28 日 14:00～ F 校舎 12 会場

ヒト MDR1 の基質取り込みゲート機構の解析
Analysis of the substrates entry gate mechanism of human MDR1
○末永 健人[1]、井上 修一[1]、木村 泰久[1]、木岡 紀幸[1]、加藤 博章[2]、植田 和光[1,3]（[1]京大院・農、[2]京大院・薬、[3]京大・iCeMS）
○ KENTO SUENAGA[1], SYUICHI INOUE[1], YASUHISA KIMURA[1], NORIYUKI KIOKA[1], HIROAKI KATOU[2], KAZUMITSU UEDA[1,3] ([1]Graduate school of Agriculture, Kyoto Univ., [2]Graduate school of Pharmacy, Kyoto Univ., [3]iCeMS Ueda Lab.)

【背景】MDR1(multidrug resistance 1)は多様な構造の化合物の輸送能を有する細胞膜上のタンパク質であり、様々な有害物質から生体を保護する役割をもつ。一方、MDR1 の過剰発現はがん細胞に多剤耐性を付与することから、MDR1 はがん化学療法の障壁となっている。MDR1 は ABC(ATP binding casette)トランスポーターファミリーに属し、二つの膜貫通領域と二つの ATP 結合領域を持つ。膜貫通領域はそれぞれ 6 つの TM(Transmembrane helix)からなり、基質結合部位を形成する。近年、我々が明らかにした MDR1 オーソログタンパク質の構造から、TM4 が柔軟な構造をしており、基質の取り込みゲートとして機能することが示唆された。昨年度大会ではヒト MDR1 においてオーソログタンパク質の TM4 に相当するヘリックス(TM4,10)を固定すると予想された変異体を作成し、基質による ATP 加水分解活性促進を指標とした解析により、ヒト MDR1 においても TM4、10 が基質取り込みゲートとして機能する可能性を報告した。本研究では、実際の基質輸送活性を評価することで、直接的な検証を行った。
【方法】輸送活性測定には、ATP 加水分解活性測定の結果から TM10 側から取り込まれると予想された Rhodamine 6G を用いた。野生型および変異体を発現した HEK293 細胞を Rhodamine 6G 存在下で培養し、細胞に取り込まれた Rhodamine 6G の蓄積量をフローサイトメトリーで測定し、基質輸送能を評価した。
【結果】MDR1 オーソログタンパク質は TM４の柔軟な部分をバリンに置換することで柔軟性が失われることが明らかとなっている。そこで、ヒト MDR1 においても同様に TM4 又は TM10 にバリンを導入した変異体を作製した。また、TM4 と TM5、 TM10 と TM11 の間にイオン相互作用を導入して TM4、TM10 を固定化した変異体(W232E/A302K、T945R)を作製した。野生型 MDR1 及び TM4 バリン変異体、W232E/A302K を発現した細胞では Rhodamine 6G の蓄積が見られなかったが、TM10 バリン変異体と T945R を発現した細胞では Rhodamine 6G が蓄積した。この結果から、TM10 を固定化した変異体では Rhodamine 6G の輸送活性が低下していると考えられた。輸送活性測定の結果は TM10 を固定化すると Rhodamine 6G による ATP 加水分解活性の促進が観察されないという結果とよく一致する。以上の結果からヒト MDR1 においても柔軟な膜貫通ヘリックスが存在し、基質取り込みゲートを形成していることが示唆された。

ABC transporter family, MDR1, drug transport

講演番号：3F12p02
講演日時、会場：3 月 28 日 14:11～ F 校舎 12 会場

ヒト MDR1 の内向き構造安定化機構の検討
Analysis of mechanism for stabilizing inward open conformation of human MDR1
○津山 智美[1]、木村 泰久[1]、木岡 紀幸[1]、加藤 博章[2]、植田 和光[1,3]([1]京大院農、[2]京大院薬、[3]京大・iCeMS)
○Tomomi TSUYAMA[1], Yasuhisa KIMURA[1], Noriyuki KIOKA[1], Hiroaki KATO[2], Kazumitsu UEDA[1,3] ([1]Grad. Sch. of Agric., Kyoto Univ., [2]Grad. Sch. of Pharm., Kyoto Univ., [3]iCeMS, Kyoto Univ.)

【背景】MDR1(Multidrug resistance 1)は細胞膜上の輸送体であり、ATP 結合、加水分解エネルギーを利用して、多様な基質を細胞外へ排出する。MDR1 は生体異物を排出して生体防御の役割を担う一方、様々な抗がん剤を排出することから、がん細胞の多剤耐性化に関与する。MDR1 は ABC タンパク質に属し、膜貫通領域とヌクレオチド結合領域を 2 つずつ持つ 12 回膜貫通タンパク質である。MDR1 は細胞内側に開いた内向き構造と、細胞外側に開いた外向き構造を交互にとりながら基質を輸送する。我々が明らかにしたオーソログタンパク質の構造から、内向き構造で膜貫通ヘリックス間に相互作用が形成され、内向き構造を安定化する機構が明らかとなった。本研究ではヒト MDR1 にも内向き構造を安定化する機構が存在するかを検討した。
【方法】C 末側に精製用タグを導入した MDR1 変異体を、浮遊状態で培養可能な FreeStyle 293 細胞で発現させた。発現細胞を界面活性剤(0.8% DDM)で可溶化し、抗 FLAG 抗体を用いて精製タンパク質を得た。MDR1 の基質輸送は ATP 加水分解と共役しているため、基質により ATP 加水分解活性が上昇する。そこで、ATP 加水分解活性の上昇を指標として基質との相互作用を酵素化学的に評価した。また、フローサイトメーターを用いて細胞からの基質排出を解析し、基質輸送能を評価した。
【結果】オーソログタンパク質では、膜貫通ヘリックス TM1-6 間のグルタミンとスレオニンを中心とした相互作用によって内向き構造が安定化されていた。そこで、MDR1 においてグルタミンとスレオニンに対応する、TM1 の D77 と TM12 の L976 に着目した。D77 は TM6 のセリンと水素結合を形成し、L976 は長い側鎖により TM7 のアラニンと疎水性相互作用をすると考えられたため、それぞれのアミノ酸をアラニンに置換した。相互作用が無くなると常に構造変化しやすくなるため、基質による ATP 加水分解活性の上昇が見られなくなると予想される。D77A と L976A はともに輸送基質であるベラパミル、ビンブラスチン、ローダミン B、モネンシン、パクリタキセル、カルセイン AM による ATP 加水分解活性の上昇が野生型に比べて小さかった。また、D77 と L976 をともにアラニンに置換した変異体は基質による誘導がさらに弱まった。さらに、TM6 の TM1 との境界に面した 4 つのアミノ酸をアラニンに置換した変異体（TM6A）は、基質による活性の誘導が見られなかった。基質輸送能に関しては、TM6A 以外の変異体でカルセイン AM 輸送能が確認された。以上の結果から、ヒト MDR1 にも内向き構造を安定化する機構が存在し、基質による ATP 加水分解活性の促進に関与していることが示唆された。

ABC transporter, P-glycoprotein, ATPase

講演番号：3F12p03
講演日時、会場：3 月 28 日 14:22～ F 校舎 12 会場

アミノ酸置換導入による ABCA1 のコレステロール認識機構の解析

Analysis of cholesterol recognition mechanism of ABCA1 by amino acid substitution

○小笠原 史彦[1]、木村 泰久[1]、植田 和光[1,2]（[1]京大院農・応用生命、[2]京大・iCeMS）
○ Fumihiko OGASAWARA[1], Yasuhisa KIMURA[1], Kazumitsu UEDA[1,2] ([1]Kyoto univ. Agric., [2]Kyoto univ. iCeMS)

【背景・目的】

ATP Binding Cassette A1(ABCA1)はコリンリン脂質(PC)とコレステロールを内包した初期 HDL を産生する脂質トランスポーターである。HDL の産生は末梢の細胞から過剰なコレステロールを除去する唯一の経路であるため、ABCA1 は体内のコレステロール恒常性の維持に大きく寄与している。また過剰なコレステロールはアテローム性動脈硬化症を引き起こし、日本人の死因として割合の高い心疾患や脳血管疾患を誘発するため、これら疾患の予防、治療の観点からも ABCA1 のコレステロール排出機構は重要である。しかし、ABCA1 による HDL 産生及びコレステロール排出の機構はいまだ明らかではない。特に、ABCA1 が直接コレステロールを輸送しているか否かについては議論が分かれている。そこで、本研究ではアミノ酸置換導入により ABCA1 のコレステロール認識機構を解明し、コレステロールが ABCA1 の直接の基質であるかどうかを明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】

ABCA1 のコレステロール認識機構として、Cholesterol Recognition/interaction Amino acid Consensus sequence(CRAC)配列及び CARC 配列に着目した。これらのアミノ酸配列モチーフはコレステロール認識に関与することが報告されており、その配列中のチロシン及びフェニルアラニンがコレステロールとの結合に重要であることが知られている。また、膜の構成成分であるコレステロールは膜貫通領域から取り込まれることが予想される。そこで、ABCA1 の膜貫通領域におけるチロシン及びフェニルアラニンを検索した。さらに候補のアミノ酸を絞るため、ABCA1 との相同性が最も高く、コレステロール排出能の低い ABCA7 と配列を比較したところ、両 ABC 蛋白質間で保存されていないフェニルアラニンが 7 個見つかった。これら 7 個のフェニルアラニンを 1 個ずつ ABCA7 のアミノ酸に置換した変異体を作成し、HEK293 細胞に発現させて脂質排出活性の測定を行った。ABCA1 のもう 1 つの基質である PC の排出量とコレステロールの排出量を同時に測定し、野生型の排出量比をコントロールとした。同様に測定した変異体の排出量比からそれぞれのコレステロール排出活性を評価したが、これらの変異体は野生型と同等の活性を示した。そこで、コレステロール認識に複数のアミノ酸が関わっている可能性を考え、7 個すべてのフェニルアラニンに変異を入れた変異体を作成し、現在解析を行っている。

ABC transporter, cholesterol, CRAC motif

講演番号：3F12p04
講演日時、会場：3 月 28 日 14:33～ F 校舎 12 会場

ATP 加水分解活性測定系を用いたヒト ABCA1 と ABCA7 の輸送基質の解析

Analysis of transport substrates of human ABCA1 and ABCA7 based on ATPase assay

○橋本 秀彦[1]、石神 正登[1]、木村 泰久[1]、植田 和光[1,2] ([1]京大院農、[2]京大 iCeMS)
○ Hidehiko HASHIMOTO[1], Masato ISHIGAMI[1], Yasuhisa KIMURA[1], Kazumitsu UEDA[1,2] ([1]Grad. Sch. of Agric., Kyoto Univ., [2]iCeMS, Kyoto Univ.)

【背景・目的】

ABCA1、ABCA7 は ABC タンパク質ファミリーに属しており、ATP 加水分解のエネルギーを用いて基質を輸送する。ABCA1 は、細胞内のフォスファチジルコリン(以下 PC)とコレステロールを apoA-I に受け渡し、HDL 形成を仲介する機能をもつ。ABCA7 の生理的機能は不明だが、ABCA7 の SNPs がアルツハイマー病と関係すること、また ABCA7 を KO したマウスの脳においてアミロイドβの蓄積が増加することが報告されており、ABCA7 がアルツハイマー病の予防において重要な役割を担っていることが示唆される。しかし、ABCA7 の輸送基質は未だに不明である。ABC タンパク質は ATP 加水分解のエネルギーを用いて基質を輸送するため、基質を含むリポソームに精製 ABC タンパク質を再構成すると ATP 加水分解活性が誘導される。そこで本研究では、ATP 加水分解活性の誘導によって基質であるかどうか評価可能な実験条件の確立、および確立した実験条件を用いた ABCA1 や ABCA7 の輸送基質の同定を目的とした。

【方法・結果】

GFP タグと FLAG タグを C 末端に融合した ABCA1 を FreeStyle293 細胞に発現させ、界面活性剤(CHAPS)により可溶化し、FLAG タグを用いて精製を行った。得られた精製 ABCA1 を種々のリン脂質、コレステロールをそれぞれ含ませたリポソームに再構成し、ATP 加水分解活性を測定した。ABCA1 の基質として PC が報告されていることから、PC を含むリポソームに精製 ABCA1 を再構成させると ATP 加水分解活性が誘導されることが予想される。リポソームを構成する脂質の種類、反応液の組成や界面活性剤の除去方法などを検討し、適当な実験条件を確立した。その後、ABCA7 を ABCA1 と同様に精製し、得られた精製 ABCA7 を確立した実験条件のもとリポソームに再構成し、ATP 加水分解活性の測定を行った。測定した ATP 加水分解活性から輸送基質の同定を試みた。

ABCA1, ATPase assay, cholesterol

講演番号：3F12p05
講演日時、会場：3 月 28 日 14:44～ F 校舎 12 会場

癌細胞増殖における長鎖非コード RNA,*ANRIL* の機能解明

Elucidation of the function of long non-coding RNA,*ANRIL* in cancer cell proliferation

○苗村 円佳、紫 千大、神武 洋二郎 (近大院)
○Madoka NAEMURA, Chihiro MURASAKI, Yojiro KOTAKE (Kinki Univ. Graduate School)

近年、ヒトにおいて 1 万個以上の長鎖非コード RNA(long non-coding RNA: lncRNA)の存在が明らかとなったが、それらの機能はほとんど不明である。

本研究対象の *ANRIL*(antisence non-coding RNA in the INK4 locus)は、自身が存在する *INK4* 遺伝子座の転写制御に関与している。*INK4* 遺伝子座には、細胞周期を制御する CDK インヒビター*p15*, *p16* および *ARF* がコードされている。これまでの我々の研究により、ヒト胎児肺線維芽細胞において、*ANRIL* は転写抑制因子であるポリコーム複合体 PRC2 と結合し、*INK4* 遺伝子座へのリクルートメントを介して、*p15*, *p16* 遺伝子の転写を抑制することが明らかとなった。*INK4* 遺伝子座は多くの癌組織において転写抑制されている領域であることから、この領域の転写を抑制する *ANRIL* は、癌化に関与している可能性が考えられる。しかし癌細胞における *ANRIL* の機能は不明である。そこで本研究では、癌細胞増殖における *ANRIL* の機能解析を目的とした。

ヒトの各種培養細胞を用いた *ANRIL* の発現解析を行った結果、正常細胞と比較して、*ANRIL* は各種癌細胞で高発現していることが判明した。また、ヒト正常線維芽細胞 WI38 と子宮頸癌細胞 HeLa に癌化シグナル(活性型 H-Ras 変異体過剰発現)を導入すると、WI38 においては癌化シグナルによって *ANRIL* の発現が顕著に減少したが、HeLa では減少しなかった。この結果から、HeLa では *ANRIL* の発現抑制機構が破綻している可能性が示唆された。

ANRIL が高発現していた肺癌細胞 H1299 及び HeLa で、*ANRIL* をノックダウンした結果、*p15* mRNA 量が増加し、細胞増殖が抑制された。この結果から、*ANRIL* は癌細胞において、*p15* の発現を抑制することにより、細胞増殖を促進する機能があることが示唆された。CDK インヒビターである p15 タンパク質は、細胞周期を G1 期に停止させる機能を持つ。興味深いことに、細胞周期解析の結果、*ANRIL* ノックダウンした HeLa は、G1 期ではなく、G2/M 期で停止することが明らかとなった。この結果から、*ANRIL* は *INK4* 遺伝子座以外の標的遺伝子を持つ可能性が示唆された。本発表では、我々が解明した癌細胞増殖における *ANRIL* の機能について紹介する。

long non-coding RNA, *p15*, *p16*

講演番号：3F12p06
講演日時、会場：3 月 28 日 15:05～ F 校舎 12 会場

嗅覚受容体におけるムスクの香りの認識機構

The Mechanism of Musk Odor Perception by Olfactory Receptors

○佐藤 成見[1,2]、白須 未香[1,2]、伊原 さよ子[1,2]、東原 和成[1,2] ([1]東大院農生科応生化、[2]JST ERATO 東原化学感覚シグナルプロジェクト)
○Narumi Sato[1,2], Mika Shirasu[1,2], Sayoko Ihara[1,2], Kazushige Touhara[1,2] ([1]Univ. of Tokyo, [2]ERATO Touhara Chemosensory Signal Project, JST)

ムスク（麝香）は、温かみのある他にはない官能的な香りで人々を魅了し、有史以前からインドや中国において薬や香油などに用いられてきた。ムスコンとは、天然ムスク系香料の代表格であり、ジャコウジカの雄の臭腺から分泌され、雌を引きつけるなどのフェロモン様作用をもつ。なお、ジャコウジカは保護動物に指定されており、天然ムスコンは現在では非常に希少となっている。また、工業的にもムスコンは合成が困難であったため、これまでに数百種類ものムスク様の香りをもつムスク系香料が開発されてきた。しかし、合成ムスク系香料の中には難分解性のものや感作性があることが指摘され、より良いムスク系香料の開発が今なお続けられている。

ムスク系香料は、ムスコンのような大環状ケトンを基本構造とするものから、ニトロムスクのようにベンゼン環にニトロ基を複数有しているもの、複数のアルキル環があるものまで、様々な化学構造を持つ。それにも関わらず、私たちの鼻では同じような匂いとして知覚されているのは大変興味深い。そこで私たちは、嗅覚受容体（OR）レベルでムスク系香料がどのように認識されているのか、メカニズムの解明を試みてきている。近年、当研究室において、ヒトとマウスのムスコン受容体である OR5AN1 と MOR215-1 が同定された。MOR215-1 は、マウス嗅球イメージングにおいてムスコンのような大環状ケトンに対して強い応答を示し、選択性の高いムスコン OR であることがわかった。

本研究では、OR5AN1 や MOR215-1 とアミノ酸配列の相同性が高い OR のゲノム探索を行い、そこからチンパンジー、オランウータン、マカクのムスコン OR を培養細胞での luciferase assay を用いて同定した。また、これらムスコン OR について、25 種類のムスク系香料並びにその類似物に対する構造活性相関を調べた。その結果、MOR215-1 と同様に他のムスコン OR も大環状ケトンに応答すること、さらにこれらの受容体の一部はニトロムスクにも強く応答することがわかった。これは半世紀前に Amoore が提唱した、ムスクの香りを呈する匂い分子は円形の浴槽型構造のポケットに結合する、という仮説を支持する結果である。OR5AN1 と MOR215-1 については、ムスコンの光学異性体並びにニトロムスクに対する応答を詳細に解析した結果、ヒトとマウスで応答の強さや選択性が異なることがわかった。特にヒトについては、実際にそれぞれのムスク系香料を嗅いだときの匂いの質や強さと、luciferase assay による OR5AN1 の匂い応答性がよく相関していた。

本研究で得られた知見は、新たなムスク系香料の開発に貢献することが期待される。

musk, olfactory receptor, odorants

講演番号：3F12p07
講演日時、会場：3 月 28 日 15:16～ F 校舎 12 会場

消化管特異的カルパイン CAPN8 及び CAPN9 による胃粘膜保護機能の解析

Mechanisms of gastric mucosal defense involving CAPN8 and CAPN9, gastrointestinal tract-specific calpains

○秦 勝志、北村 ふじ子、反町 洋之（都医学研　カルパイン PT）
○Shoji HATA, Fujiko KITAMURA, Hiroyuki SORIMACHI (Calpain PT, Tokyo Metro. Inst. Med.Sci.)

カルパインは、バクテリアからヒトまでの幅広い生物種に見出されている Ca^{2+}要求性の細胞内システインプロテアーゼで、ヒトには様々な発現様式を示す 15 種類の分子種が存在する。これらは基質の限定分解による機能調節を通じて特有の機能を果たすと考えられているが、機能の詳細や疾患との関連が明確されているのはごく一部に限られる。我々は、2 種類の消化管特異的分子種、カルパイン 8(CAPN8)とカルパイン 9(CAPN9)の機能・病態解析を進めており、これらが共に胃粘膜上皮の表層粘液分泌細胞と腸管上皮の杯細胞にのみ発現すること、各遺伝子ノックアウト(KO)マウスがアルコール溶液摂取による胃粘膜損傷を増悪させることをこれまでに明らかにした。本学会では、そのメカニズムの一端を見出したので発表する。

CAPN8 及び CAPN9 は粘液分泌細胞に発現するため、KO マウスにおける表層粘液細胞内の粘液顆粒の数や大きさ、胃粘膜表層の粘液層形成を調べたが変化が見られなかった。一方、培養細胞レベルの解析から、CAPN8 と CAPN9 どちらをノックダウンしても細胞増殖の遅延が見られることと、カルパイン阻害剤処理した細胞株における細胞移動の遅延を見出した。さらに、KO マウス胃腸タンパク質の生化学的解析から、CAPN8 と CAPN9 がヘテロ 2 量体(G-カルパインと命名)として存在し、CAPN8 が基質切断サブユニット、CAPN9 が活性制御サブユニットとして機能することを明らかにした。以上の結果から、CAPN8 と CAPN9 が同一のノックアウト/ノックダウン表現型と発現分布を示す理由が二量体 G-カルパインの形成にあることが明確になった。そして、KO マウスのエタノール摂取による粘膜傷害増悪のメカニズムとして G-カルパインが司る表層粘液細胞の増殖・移動制御の異常による粘膜修復の遅延が示唆された。

calpain, gastric mucosal defense, dimerization

講演番号：3F12p08
講演日時、会場：3 月 28 日 15:27～ F 校舎 12 会場

ハタネズミ受精卵における CRISPR/Cas システムを用いた遺伝子組み換え

Generation genetically modified prairie vole embryos using CRISPR/Cas mediated genome engineering

○堀江 謙吾、平山 貴士、平岡 優一、日出間 志津、福田 智一、西森 克彦（東北大院農）
○Kengo HORIE, Takashi HIRAYAMA, Yuichi HIRAOKA, Shizu HIDEMA, Tomokazu Fukuda, Katsuhiko Nishimori (Tohoku Univ. Grad.)

ハタネズミ（*Microtus ochrogaster*：prairie vole)は北米原産の齧歯類であり、雌雄でつがいを形成する一夫一妻性をとり、夫婦で子育てを行い、同腹子間での交配は行わないなど特徴的な社会行動を示すことが知られている。ハタネズミのパートナー嗜好性や家族の絆は、実験動物として広く用いられているマウスやラットに比べて強固であり、同じく社会的な動物である人の社会性を支える脳神経メカニズムやその破綻病態を研究する為のモデル動物として、注目されている。メスのハタネズミ脳側坐核ではオキシトシン受容体(*Oxtr*)の、オスの腹側淡蒼球ではバソプレシン V1a 受容体(*Avp1ar*)の発現が多く、パートナー嗜好性へのこれらの関与も示されている。しかし、その遺伝子破壊や修飾を基にした研究例は極めて少ない。本研究ではハタネズミの社会性に関した脳神経メカニズムの更なる解明を目指し、遺伝子組み換えハタネズミ作製のための発生工学技術を確立すると共に、CRISPR/Cas を用いて *Oxtr* 欠損ハタネズミを作製することを目的とした。

はじめに採卵条件の検討を行った。過排卵処理を施したハタネズミから、平均 5.5 個/匹の受精卵を取得し、ハタネズミの採卵条件を確立した。受精卵をマウス胚培養培地で培養した場合、発生は 2 細胞期胚で止まってしまうが、胚培養培地の改良により 78.9%が胚盤胞期胚まで発生した。現在、胚盤胞の子宮移植による正常な個体の取得を試みている。

次に、前核期胚での *Oxtr* 遺伝子への変異導入を目指し、CRISPR/Cas の条件検討を行った。HEK293T 細胞に *Oxtr* 遺伝子を標的とした pX330 ベクターとそれに対応した pGL4-SSA ベクターをコトランスフェクションし、single guide RNA (sgRNA)の切断活性をルシフェラーゼアッセイにより検証した。その結果より、切断活性の高い sgRNA を選択し、Cas9 RNA：sgRNA = 100：50 (ng/μl)の比で前核期胚にインジェクションした。ハタネズミ前核期胚を胚盤胞期胚まで培養しゲノムを回収後、PCR により標的配列付近を増幅しシークエンス解析を行った結果、87 bp の挿入と 16 bp の欠失、WT の三つのアリルを一つの胚盤胞期胚中に保持したモザイク変異を確認した。胚盤胞期胚での変異導入効率は 50%程度であり、ハタネズミにおいても CRISPR/Cas が効率的に働くことを確認した。現在、変異個体の獲得を目指しインジェクションを行った胚の卵管移植を試みている。

Prairie vole, CRISPR, genome engeneering

講演番号：3F12p09
講演日時、会場：3 月 28 日 15:38～ F 校舎 12 会場

鶏卵中での有用タンパク質生産に向けたニワトリシアル酸転移酵素の機能解析

Functional analysis of chicken sialyltransferases for pharmaceutical protein production in egg white

○木溪 俊介、小島 佑介、奥嵜 雄也、金岡 英徳、西島 謙一、飯島 信司 (名大院・工)
○ Shunsuke KIDANI, Yusuke KOJIMA, Yuya OKUZAKI, Hidenori KANEOKA, Ken-ichi NISHIJIMA, Shinji IIJIMA (Nagoya Univ.)

・目的

抗体医薬品など現在注目されているタンパク質製剤は、CHO をはじめとする動物細胞で生産が行われているが、生産コストの高さなど課題も多い。そこで我々は、比較的低コストで飼育可能なニワトリの医薬品製造工場としての可能性に着目し、トランスジェニックニワトリによる鶏卵中への有用タンパク質生産を目指して研究を行ってきた。タンパク質製剤が十分な活性を示す為には、正しい折りたたみ構造(フォールディング)に加え、適切な翻訳後修飾が行われることが重要である。中でも、糖鎖による修飾は薬効や血中半減期に関与しており、特に重要である。しかし、最近の解析から、トランスジェニックニワトリに生産させたタンパク質には糖鎖末端のシアル酸付加が十分に行われていないことが明らかとなった。本研究では、ニワトリにおけるシアル酸転移酵素 Sialyltransferase(ST)について基礎解析を行った。

・ 方法と結果

ST は哺乳類で解析が進んでいるが、ニワトリでは限られた知見しか報告されていない。糖鎖修飾は大きく分けて *N*結合型糖鎖と *O*結合型糖鎖の二種類に分類できるが、そのうち *N*型糖鎖合成に関与する ST 遺伝子(*N*型 ST)5 種類及び *O*型糖鎖合成に関与する ST 遺伝子(*O*型 ST)6 種類についてクローニングした。その結果、ニワトリ *N*型 ST の ST3Gal6 および *O*型 ST の ST3Gal1/2/5 にスプライシングバリアントが存在することが初めて示された。次に、ST 遺伝子を強制発現させた 293FT の細胞抽出液を用いて ^{14}C 標識 CMP-シアル酸の転移反応を行い、TLC プレートで展開して ST 活性を解析した。クローニングした遺伝子のうち、*N*型 ST の ST3Gal3/6、ST6Gal1/2 及び *O*型 ST の ST3Gal1/2 がシアル酸転移活性を示し、哺乳類と同様な基質特異性を持つことが明らかとなった。一方 ST3Gal4/5 については、我々の条件では活性が認められず、哺乳類と異なる遺伝子である可能性が示唆された。ST3Gal6 ではスプライシングバリアント間で活性が数倍異なることが観察された。また、各臓器から取得した cDNA をリアルタイム PCR にて解析し、組織での発現レベルを解析したところ、全般に広く発現が認められたが、ST6Gal1 が肝臓で高く発現するなど、組織による差異も認められた。さらにニワトリ組織からゴルジ画分を調製し、*in vitro* で ST の活性および基質特異性を測定したところ、肝臓では *N*型 ST 活性が、輸卵管では *O*型 ST 活性が特に強いことが示された。

sialyltransferase, glycosylation, chicken

講演番号：3F12p10
講演日時、会場：3 月 28 日 15:49～ F 校舎 12 会場

脊椎動物卵膜形成機構の解明に向けたニワトリ ZP 糖タンパク質の存在形態に関する研究

Studies on the posttranslational modifications and interacting partners of ZP glycoproteins aimed at elucidating the mechanisms of vertebrate egg-coat formation

○佐久間 梨央[1]、佐藤 喬洋[1]、西尾 俊亮[2]、松田 幹[2]、氏田 稔[1]、奥村 裕紀[1]（[1]名城大院農、[2]名大院生命農）

○Rio SAKUMA[1], Takahiro SATO[1], Shunsuke NISHIO[2], Tsukasa MATSUDA[2], Minoru UJITA[1], Hiroki OKUMURA[1] ([1]Graduate School of Agriculture, Meijo University, [2]Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University)

“生命のはじまり”とも言われる受精は雌雄それぞれの配偶子が融合することであり、配偶子同士が遭遇してから受精に至るまでの過程は、多種多様な分子が複雑に相互作用することによって引き起こされている。これまでに脊椎動物の受精に関して様々な研究が行われ、多くの知見が得られてきた。しかし、受精の分子メカニズムについて、特に卵膜・精子相互作用の分子メカニズムについては、その詳細が未だ完全には解明されていない。卵膜は、脊椎動物卵細胞を覆う細胞外マトリックスであり、卵を保護するだけではなく、卵と精子の種特異的な結合の媒介や、精子先体反応の誘導、多精子受精の防止などの受精において重要な生理学的機能をもつと考えられている。当研究室では、卵膜の構造や機能を明らかにすることで、有害鳥獣の個体数管理、非ホルモン性の新規避妊薬や不妊症における新規治療法の開発などに応用できる知見が得られると考えている。卵膜を構成するタンパク質群は、哺乳類の卵膜が zona pellucida (ZP; 透明帯) と呼ばれていることから ZP 糖タンパク質と総称され、Cys 残基の特徴的な配置が進化の過程で保存されている ZP モジュール (ZP ドメイン) を分子内にもつことが特徴である。卵膜を構成する ZP 糖タンパク質の組み合わせとそれらを発現する組織は生物種により異なり、当研究室で研究対象としているニワトリの卵膜は、肝臓で合成され血液中に分泌される ZP1 と卵巣内の顆粒膜細胞で合成される ZP3 および ZPD の主に 3 種類で構成されている。しかし、ZP1 が血流を介し卵巣まで運搬され、ZP3 や ZPD と結合して卵の周囲に卵膜マトリックスが形成されるメカニズムは、ほとんど解明されていない。そこで本研究では、脊椎動物の卵膜形成機構の解明を目指し、血液や卵膜における ZP 糖タンパク質の存在形態を解明することを目的とした。これまでの研究で、血中の ZP1 (血清 ZP1) は卵膜に組込まれると一部が分子間ジスルフィド結合を形成して二量体化することが示唆された。ZP1 が血中で他のタンパク質と複合体を形成しているか、あるいは何らかの修飾を受けていることによって、その二量体化が抑制されていることが推測されたため、血清 ZP1 を免疫沈降などの複数の方法で血清から分離し、ZP1 との結合タンパク質を LC-MS/MS 解析によって同定した。また、卵膜中の ZP3 にはレクチン反応性と等電点の異なる複数のアイソフォームが存在するが、それら ZP3 アイソフォームの存在が卵膜形成機構や精子との相互作用においてどのような影響を及ぼしているかは明らかとなっていない。よって、LC-MS/MS 解析やゲルろ過クロマトグラフィーを利用して、各 ZP3 アイソフォームの卵膜形成への関与やそれらが受けている翻訳後修飾を推定したので、結果を報告する。

fertilization, zona pellucida, LC-MS/MS

講演番号：3F12p11
講演日時、会場：3 月 28 日 16:10～ F 校舎 12 会場

特有のアミノ酸配列を有するセリンプロテアーゼ阻害剤オリクチンと標的プロテアーゼ複合体の結晶構造解析

Crystal structure analysis of oryctin, a serine protease inhibitor with a unique amino acid sequence, complexed with its target protease

○永田 宏次[1]、劉 徳生[1]、鈴木 達也[1]、堀田 彰一朗[1]、片山 幸江[1]、侯 峰[1]、河合 岳志[1]、王 世鵬[1]、石橋 純[2]、山川 稔[2]、田之倉 優[1] ([1]東大院農生科、[2]農生資研)
○Koji NAGATA[1], Desheng LIU[1], Tatsuya SUZUKI[1], Shoichiro HORITA[1], Yukie KATAYAMA[1], Feng HOU[1], Takeshi KAWAI[1], Shipeng WANG[1], Jun ISHIBASHI[2], Minoru YAMAKAWA[2], Masaru TANOKURA[1] ([1]UTokyo, [2]NIAS)

【背景・目的】オリクチンはタイワンカブトムシ（*Oryctes rhinoceros*）の幼虫体液から単離された 66 アミノ酸残基のタンパク質で、そのアミノ酸配列は他のタンパク質・ペプチドに対し類似性がない。オリクチンと七面鳥のセリンプロテアーゼ阻害剤の一種オボムコイドインヒビター（OMTKY3）との立体構造類似性に基づき、オリクチンは真核生物由来のキモトリプシン様セリンプロテアーゼと細菌由来のサチライシン様セリンプロテアーゼに対し強い阻害活性を示す Kazal 型セリンプロテアーゼ阻害剤であることが明らかとなった。本研究では、オリクチンによるセリンプロテアーゼ阻害機構を明らかにするために、オリクチンとキモトリプシンまたはサチライシンとの複合体の結晶構造解析を行った。
【方法】大腸菌を宿主として発現、精製した組換えオリクチンと市販のキモトリプシンまたはサチライシンとを混合し、ゲルろ過にて複合体を単離し、蒸気拡散法により結晶化した。得られた結晶の X 線回折データを放射光施設にて取得した。既報のプロテアーゼ単独の結晶構造をモデルとして用いて、分子置換法によりオリクチン-プロテアーゼ複合体の結晶構造を決定した。
【結果】オリクチン-キモトリプシン複合体について空間群 $P2_12_12$ と $C222_1$ の 2 種の結晶が得られ、それぞれ 1.9 Å、2.1 Å 分解能の X 線回折データを得た。オリクチン-サチライシン複合体については空間群 $P2_1$ の結晶が得られ、1.8 Å 分解能の X 線回折データを得た。キモトリプシンとサチライシン単独の結晶構造をモデルとして用い、分子置換法により上記の複合体構造を決定した。その結果、オリクチンは、キモトリプシンとサチライシンという 2 種の異なる族（clan）に属するセリンプロテアーゼの阻害に、共通のループ領域（「阻害ループ」）を用いることが明らかになった。オリクチンによるキモトリプシンとサチライシンの認識および阻害の機構について詳細に議論する。

oryctin, crystal structure, protease inhibitor

講演番号：3F12p12
講演日時、会場：3 月 28 日 16:21～ F 校舎 12 会場

ミトコンドリア外膜タンパク質 SAMM50 に生ずるタンパク質 N-ミリストイル化の解析

Identification and characterization of protein N-myristoylation occurs on SAMM50, a mitochondrial membrane protein

○高光 恵美、飯尾 雄介、福永 和貴、守屋 康子、内海 俊彦（山口大院・医・応用分子生命）
○Emi Takamitsu, Yusuke Iio, Kazuki Fukunaga, Koko Moriya, Toshihiko Utsumi (Appl. Mol. Biosci., Grad. Sch. Med., Yamaguchi Univ.)

【目的】N-ミリストイル化タンパク質は，真核細胞に存在する主要な脂質修飾タンパク質の一つであり，主として細胞情報伝達において重要な機能を果たしている．しかし，ヒト全ゲノムを対象としたN-ミリストイル化タンパク質の網羅的同定はなされていない．本研究では，ヒトcDNAリソースに含まれる約4,500個のヒトcDNAから，バイオインフォマティクスによる手法と無細胞タンパク質合成系による代謝標識法を組み合わせ，新規N-ミリストイル化タンパク質の同定を試みるとともに，新たにN-ミリストイル化が見出されたミトコンドリア外膜タンパク質SAMM50について解析を行った．
【方法・結果】かずさ DNA 研究所ヒトタンパク質発現クローン(Flexi ORF clones)のうち，これまでに解析が完了した約 2,000 個を除く，約 4,500 個の cDNA を対象とし，N-ミリストイル化モチーフ(N 末端 Met-Gly 配列)を持つ cDNA 341 個を選択した．このうち，2 種の N-ミリストイル化予測プログラムによる予測，およびタンパク質データベース検索により，新規 N-ミリストイル化タンパク質候補として 37 クローンを選択した．その N 末端 10 アミノ酸をモデルタンパク質の N 末端 10 アミノ酸と置換した融合タンパク質のセットおよび全長 cDNA のセットを構築し，これらの N-ミリストイル化を昆虫培養細胞由来無細胞タンパク質合成系における[^{3}H]ミリスチン酸標識により検討した．その結果，37 個の cDNA クローン中の 19 個の cDNA 翻訳産物に効率よく N-ミリストイル化が生じることが示された．これらの中にはユビキチンリガーゼ，リン酸化酵素，脱リン酸化酵素，アポトーシス関連タンパク質，ガン関連タンパク質といった生理活性タンパク質に加え、これまであまり N-ミリストイル化の報告のないミトコンドリア膜タンパク質が含まれていた．これらのミトコンドリア膜タンパク質について遺伝子導入培養細胞を用いて N-ミリストイル化を検討したところ，ミトコンドリア外膜タンパク質 SAMM50 に効率の良い N-ミリストイル化が確認され，この N-ミリストイル化は 2 位の Gly を Ala に置換した G2A 変異体では生じないことが示された．さらに，免疫蛍光染色により遺伝子導入細胞における SAMM50 の細胞内局在を検討した結果，野生型，G2A 変異体ともにミトコンドリアへの局在が観察されたが，G2A 変異体では細胞内におけるミトコンドリアの分布に異常が認められたことから，SAMM50 の N-ミリストイル化はミトコンドリアの正常な分布に重要であることが示唆された．以上，これまで親水性の細胞質タンパク質に生ずる事が知られていたタンパク質 N-ミリストイル化が，ミトコンドリア膜タンパク質に生じ得ることが明らかになった．

N-myristoylation, SAMM50, mitochondrial membrane protein

講演番号：3F12p13
講演日時、会場：3 月 28 日 16:32～ F 校舎 12 会場

シグナルペプチドに生ずるタンパク質 N-ミリストイル化の解析

Analysis of protein N-myristoylation occurs on signal peptide of protein

○南風原 樹、大塚 基顕、林田 真梨子、高光 恵美、守屋 康子、内海 俊彦（山口大院・医・応用分子生命）
○ Tatsuki HAEBARA, Motoaki OTSUKA, Mariko HAYASHIDA, Emi TAKAMITSU, Koko MORIYA, Toshihiko UTSUMI (Appl. Mol. Biosci., Grad. Sch. Med., Yamaguchi Univ.)

【目的】タンパク質 N-ミリストイル化は、主要なタンパク質脂質修飾の一種であり、主として細胞情報伝達関連タンパク質に生じ、その過剰発現や変異が疾患に関与することが知られている。この脂質修飾は通常、可溶性の細胞質タンパク質に生ずることが知られているが、N-ミリストイル化タンパク質の網羅的探索を目的としたこれまでの我々の研究から、分泌タンパク質のＮ末端に存在するシグナルペプチドに N-ミリストイル化が生ずる場合があることが示された。本研究ではリソゾーム酵素 Cathepsin C 及び分泌タンパク質 Wnt-10a の N 末端に存在するシグナルペプチドに生ずる N-ミリストイル化について解析を行った。

【方法・結果】無細胞タンパク質合成系における代謝標識により N-ミリストイル化の有無を検討した結果、Cathepsin C 及び Wnt-10a が効率良く N-ミリストイル化されることが示された。Cathepsin C 及び Wnt-10a のシグナルペプチドを成熟 TNF のＮ末端に融合させた融合タンパク質とその N-ミリストイル化部位を変化させた G2A 変異体を作成し、遺伝子導入した COS-1 細胞からの成熟 TNF の分泌を検討した結果、いずれのシグナルペプチドも効率よく成熟 TNF を分泌させることが示され、N-ミリストイル化はこれらのシグナルペプチドの機能に影響を及ぼさないことが示された。次に、COS-1 細胞に全長タンパク質 cDNA を遺伝子導入し、[^{3}H]ミリスチン酸の取り込みにより N-ミリストイル化を、ウエスタンブロットにより細胞での発現を検討したところ、Cathepsin C ではタンパク質発現は生じたが、N-ミリストイル化は検出されなかった。これに対して、Wnt-10a では、培養上清中に分泌された Wnt-10a は検出されず、細胞溶解液中に２本のタンパク質バンドが検出され、このうち低分子量のバンドに N-ミリストイル化が認められた。２本のタンパク質バンドの違いを、Glycopeptidase F 処理や N-グリコシル化部位欠失変異体、シグナルペプチド欠失変異体を用いて検討した結果、高分子量のバンドは、小胞体内腔への移行に伴ってシグナルペチドが切断され、N-グリコシル化されたタンパク質バンドであり、低分子量のバンドはシグナルペプチドの切断が生じず、N-グリコシル化も生じていない N-ミリストイル化されたタンパク質であることが明らかになった。これらの結果から、Wnt-10a は細胞でのタンパク質発現に伴い、小胞体内腔へと移行しシグナルペプチドが切断され、N-グリコシル化される分子種と、細胞質に留まり N 末端が N-ミリストイル化される２種類の分子種を生ずることが示された。

以上、Cathepsin C 及び Wnt-10a は、いずれもその N 末端に N-ミリストイル化され得る N-ミリストイル化モチーフを有しているが、このうち細胞内で N-ミリストイル化を生じるのは Wnt-10a のみであること、またこの Wnt-10a に生ずる N-ミリストイル化が Wnt-10a の分泌、細胞内局在、あるいは生理的機能に影響を与える可能性があることが示された。

N-myristoylation, signal peptide, Wnt-10a

講演番号：3F12p14
講演日時、会場：3 月 28 日 16:43～ F 校舎 12 会場

酵母 split-ubiquitin システムによるヒトドリコールキナーゼ hDOLK の物理的相互作用の解析(第 2 報)

Analyses of physical interactions for the human dolichol kinase (hDOLK) with the yeast split-ubiquitin system (the second report)

○樋口 洋子、高橋 哲夫 (東海大工生命化学)
○Yoko HIGUCHI, Tetsuo TAKAHASHI (Tokai Univ.)

【目的】

ヒト粗面小胞体(rER)膜に局在するポリトピック型酵素であるドリコールキナーゼ(hDOLK)は、ドリコール(Dol)の CTP 依存性リン酸化反応を触媒することにより、*N*-グリカンの前駆体であるドリコール中間体(DLO)、GPI アンカー、*O*-マンノース型糖鎖及び *C*-マンノース型糖鎖の各生合成経路に対して、必要とされるドリコールリン酸(Dol-P0 を供給している。我々はこれまでに、酵母 split-ubiquitin システムを利用して、hDOLK が少なくとも 10 の膜貫通ドメインを有すること、本酵素同士で物理的に相互作用しホモダイマー(またはオリゴマー)を形成していること、並びに、本酵素が Dol-P を基質とするヒト GlcNAc-1-P 転移酵素(hGPT)やヒトドリコールリン酸マンノース(DPM)合成酵素複合体のサブユニットである hDPM3、あるいは Dol-P のリサイクルに働くヒトドリコールピロリン酸(Dol-PP)ホスファターゼ(hDPP)といった、DLO 生合成関連酵素とも物理的相互作用を示すことを明らかにしてきた(日本農芸化学会 2014 年度大会)。今回我々は、当システムによる解析をさらに進め、これまでに検出されたそれぞれの物理的相互作用に必要な酵素中の領域を限定することを試みた。

【方法、結果及び考察】

N 末端及び C 末端に Cub-LexA/VP16 を付加し、含まれる疎水性領域(hydrophobic region; HR)毎に C 末端側から欠失を行った hDOLK を発現する欠失ベイトコンストラクト(それぞれ pBT-N-hDKHR1～9 及び pBT-C-hDKHR1～9)を調製した。これらを、N 末端及び C 末端に NubG を付加した hDOLK、hGPT、hDPM3 または hDPP を発現するプレイコンストラクト(それぞれ pPR-N-x 及び pPR-C-x; x はいずれかの酵素遺伝子)と組み合わせて酵母 NMY51 株を二重形質転換し、レポーター遺伝子 *HIS3* 及び *ADE2* の発現を検出する 2 種類の選択培地(SD-LWH 及び SD-LWHA)上で相互作用の有無を検証した。その結果、全長の hDOLK 同士のベイト/プレイの共発現時に見られた相互作用は、C 末端側から HR を 1 つずつ欠失させた場合、N 末端から 4 番目の HR(HR4)を欠失させた時点で消失することが判明した。また、全長同士の hDOLK ベイト/hGPT プレイ、hDOLK ベイト/hDPM3 プレイ及び hDOLK ベイト/hDPP プレイの共発現時に見られた相互作用についても、類似する結果が得られた。現在これらの結果についての確認作業を行うとともに、プレイである各酵素側の欠失シリーズを作製し、hDOLK との相互作用に重要な、相手酵素側の領域の限定も試みている。

dolichol kinase, split-ubiquitin system, physical interaction

講演番号：3F12p15
講演日時、会場：3 月 28 日 16:54～ F 校舎 12 会場

酵母 split-ubiquitin システムによるヒト GlcNAc-1-P 転移酵素 hGPT の物理的相互作用の解析

Analyses of physical interactions for the human GlcNAc-1-P transferase (hGPT) with the yeast split-ubiquitin system

○高橋 哲夫、吉田 花鈴、樋口 洋子（東海大工生命化学）
○Tetsuo TAKAHASHI, Karin YOSHIDA, Yoko HIGUCHI (Tokai Univ.)

【目的】

ヒト粗面小胞体(rER)膜に局在する *N*-アセチルグルコサミン(GlcNAc)一リン酸転移酵素(hGPT)は、*N*-グリカンの前駆体であるドリコール中間体)DLO)の生合成の第一段階に働く酵素である。最近我々は、酵母 split-ubiquitin システムを利用してポリトピック型酵素である hGPT の膜配向性を解析し、本酵素が少なくとも 8 箇所の膜貫通ドメイン(TMD)を有すること、rER 膜上で本酵素同士がホモダイマーを形成していること、そして、本酵素が DLO 生合成過程で働く GlcNAc 転移酵素複合体(hAlg13/hAlg14)、ドリコールリン酸マンノース(DPM)合成酵素複合体(hDPM1/hDPM2/hDPM3)及びドリコールキナーゼ(hDOLK)などとも物理的に相互作用していることを明らかにしてきた。本研究では、rER 膜上での hGPT の挙動を解明すべく、酵母 split-ubiquitin システムを用いた解析をさらに進め、hGPT に関するこれらの酵素との物理的相互作用について詳細に検討することにした。

【方法、結果及び考察】

まず、hGPT 同士の物理的相互作用について解析するために、N 末端に NubG を付加して C-末端側から疎水性領域(hydrophobic region; HR)毎に欠失を行った hGPT を発現する欠失プレイコンストラクト(pPR-N-hGPTHR1～9)を作製した。これらを、C 末端に Cub-LexA/VP16 を付加した全長 hGPT を発現するベイトコンストラクト(pBT-STE-hGPT)とそれぞれ組み合わせて酵母 NMY51 株を二重形質転換し、得られたベイト/プレイ共発現株について、レポーター遺伝子 *HIS3* 及び *ADE2* の発現を検出可能な 2 種類の選択培地(SD-LWH 及び SD-LWHA)上での増殖性を観察することにより、物理的相互作用の有無を検討した。その結果、すべての欠失 hGPT プレイを用いた場合で全長 hGPT ベイトとの相互作用が観察され、hGPT 同士の相互作用には N 末端から第 2 膜貫通ドメインである HR2 の直前までの領域が重要であることが示唆された。そこで次に、N 末端側から段階的に欠失させた hGPT ベイト(pBT3-STE-hGPT *⊿N*n; n は欠失残基数)を用いて同様の解析を行ったところ、N 末端から 33～56 番目の推定ループ領域(loop2)を欠失させた場合に、相互作用が消失することが明らかになった。現在、同様な手法を用いて、hGPT が他の酵素と物理的に相互作用する際に重要な領域を限定する解析を進めている。

GlcNAc-1-P transferase, split-ubiquitin system, physical interaction

講演番号：3F12p16
講演日時、会場：3 月 28 日 17:15～ F 校舎 12 会場

酸化変性リポタンパク質中に生成される新規修飾構造の解析
Formation of novel adducts in oxidized lipoprotein
○柴田 貴広[1,2]、清水 和真[1]、平野 啓太[1]、内田 浩二[1] ([1]名大院生命農、[2]JST さきがけ)
○Takahiro SHIBATA[1,2], Kazuma SHIMIZU[1], Keita HIRANO[1], Koji UCHIDA[1] ([1]Nagoya Univ., [2]JST PRESTO)

[背景・目的]
反応性の高い短鎖アルデヒド類は、大気汚染物質として環境中に広く存在するだけでなく、食品における脂質の酸化的劣化産物として知られている。また、酸化ストレス条件下においては、細胞膜を構成するリノール酸やアラキドン酸などの多価不飽和脂肪酸の酸化により、生体内においても生成される。このように、我々は外因的あるいは内因的に、アルデヒド類にさらされているものといえる。こうした脂質過酸化反応により生じるアルデヒド類は、高い親電子性ゆえに、タンパク質中のリジン残基やヒスチジン残基などの求核性アミノ酸残基を介して共有結合し、様々な修飾付加体が形成されることが知られている。こうして形成される修飾付加体は、酸化ストレスなどのマーカーとなるだけでなく、パターン認識受容体などによって認識されるダメージ関連分子パターンとして、炎症応答などに関与する可能性が示唆されている。そこで本研究では、タンパク質の酸化的変性により形成される新規な修飾構造の探索を行うこととした。特に動脈硬化に関与していると考えられている低密度リポタンパク質 (LDL) の酸化的変性の過程で生じる修飾付加体の化学構造の網羅的解析を行うこととした。
[方法・結果]
ヒト血液より調製した LDL を 5 μM Cu^{2+}存在下で 24 時間インキュベーションすることにより、酸化 LDL を得た。得られた酸化 LDL および未酸化の LDL を水素化ホウ素ナトリウムで還元後、塩酸雰囲気下 110℃で 24 時間インキュベーションし、加水分解を行った。加水分解サンプルを LC-ESI-MS/MS に供し、LDL 中に生成する修飾付加体の網羅的解析を行った。この時、リジン修飾体およびヒスチジン修飾体のそれぞれに特異的なフラグメントパターンを利用することにより、それぞれを選択的に検出した。その結果、コントロールの LDL と比較し、酸化 LDL において顕著に生成するリジンおよびヒスチジン修飾付加体を複数見出した。このうちのいくつかは既知の修飾付加体とは一致しない未知の付加体である可能性が示唆された。現在、これらの新規な付加体について、その化学構造の解明を行っている。

lipid peroxidation, lipoprotein, protein modification

講演番号：3F12p17
講演日時、会場：3 月 28 日 17:26～ F 校舎 12 会場

タグを N 端、又は C 端へ付加したオキシトシン受容体の細胞内局在と活性の検討
Analysis of cell localization and activation of N- or C-terminally tagged oxytocin receptor.
○鈴木 紳吾[1]、堀江 謙吾[2]、日出間 志寿[2]、西森 克彦[2] ([1]東北大農、[2]東北大院農)
○Shingo Suzuki[1], Kengo Horie[2], Shizu Hidema[2], Katsuhiko Nishimori[2] ([1]Tohoku Univ., [2]Tohoku Univ. Grad)

[背景] オキシトシン（OXT）は脳下垂体後葉から分泌されるペプチドホルモンであり、その受容体であるオキシトシン受容体(OXTR)は 7 回膜貫通型受容体 GPCR の一つである。OXTR の発現は脳、子宮、乳腺、精巣、心臓、腎臓など広範囲に渡る。我々は OXTR 遺伝子欠損マウスを作製し OXTR が社会記憶、母性行動などの社会行動や体温調節等に関わることを明らかにしてきた(1)。近年では、OXT 投与が ASD（自閉症スペクトラム障害）などの社会行動に障害をもつ患者に有効であるという知見が得られている(2)。しかし、OXT/OXTR の作用機構の詳細は未だ不明である。細胞に発現する OXTR の局在や機能解析のためには、組織染色や細胞内局在の検出の為の抗体が不可欠であるが、現在までに利用可能な抗 OXTR 抗体は得られていない。我々は OXTR の分子生物学的、生理学的な機能を保持しつつその病理解剖学的な解析をも可能とする為 OXTR 分子に付加するタグまたは蛍光タンパク質の種類とその付加位置の検討を行った。
[方法・結果]OXTR の性質と機能の評価は細胞膜局在観察と OXT 依存的な Ca^{2+}の細胞内放出の可視化による定性的方法で行った。この為①CMV-FlagOXTR,②CMV-mcherryOXTR,③CMV-OXTRFlag,④CMV-OXTRmcherry の 4 種のキメラ蛋白遺伝子をコードする発現ベクターを作製し、それぞれ Neuro2A 細胞に導入して、まずその細胞膜局在を観察した。導入したキメラ遺伝子のうち細胞膜局在が認められたのは①、④のみであった。②、③は細胞全体が染色され、膜局在する蛍光分子は観察されなかった。次に 293T 細胞を用いた Ca assay により OXT 依存的な Ca^{2+}の細胞内放出を定性的に検証した。Ca^{2+}の細胞内放出については、強弱の違いはあるが①~④すべてのコンストラクトにおいて Ca^{2+}の細胞内放出が確認された。以上の結果から、①FlagOXTR、あるいは④OXTRmcherry が intact な OXTR 分子を反映して分子生物学的、生理学的な解析に用いることができる可能性が示された。キメラオキシトシン受容体分子の細胞内シグナルの定量化についても検討を行う予定である。
(1)Takayanagi Y. et,al: Proc Natl Acad Sci USA 102:16096-16101 (2005)
(2)JAMA Psychiatry.2014Feb;71(2):166-75.
(3) Asuka Inoue.et,al: Nature Methods 9, 1021-1019 (2012)

oxytocin receptor, GPCR, localization

講演番号：3F12p18
講演日時、会場：3 月 28 日 17:37～ F 校舎 12 会場

タンパク質蛍光標識技術を用いた S-ニトロシル化タンパク質検出法の検討
A proteomic approach for quantitaive analysis of S-nitrosylated proteins using fluorescence labeling technique

○芳村 俊広[1]、黒木 勝久[1,2]、水光 正仁[1,2]、榊原 陽一[1,2]（[1]宮崎大学大学院農学工学総合研究科、[2]宮崎大学農学部応用生物科学科）
○ Toshihiro Yoshimura[1], Katsuhisa Kurogi[1,2], Masahito Suiko[1,2], Yoichi Sakakibara[1,2] ([1]Interdisciplinary Graduate School of Agriculture and Engineering, University of Miyazaki, [2]Department of Biochemistry and Applied Biosciences, Faculty of Agriculture, University of Miyazaki)

【目的】生体内において一酸化窒素合成酵素 (NOS)によって産生される一酸化窒素 (NO)は血圧制御やシナプス伝達、炎症反応など生物学的システムにおいて重要な役割を果たすことが知られる。近年、タンパク質のシステイン (Cys)残基に NO が付加する S-ニトロシル (SNO)化と呼ばれる翻訳後修飾がタンパク質の機能制御やシグナル伝達に関与することが明らかになってきた。現在 SNO 化の研究は”Biotin-Switch 法”を用いて主に解析が行われている。”Biotin-Switch 法”は SNO 化部位を還元し遊離したチオール基を Biotin で標識後、抗体やビーズを用いて検出する手法である。しかし、この手法は定量解析が困難な点など、いくつかの欠点があげられる。そこで、我々はタンパク質蛍光標識技術を用いることで SNO 化タンパク質を高感度かつ定量的に解析できるのではないかと考えた。本研究では蛍光色素を用いた SNO 化タンパク質検出法の検討と最適化、そして本手法を用いて肺癌細胞における SNO 化タンパク質の解析を行った。
【方法】肺癌細胞由来の A549 細胞ライゼートに S-ニトロソグルタチオン (GSNO)を処理し試験管レベルで SNO 化を誘導後、CyDye-Maleimide を用いた”CyDye-Switch 法”による SNO 化タンパク質検出法の検討と最適化を行った。次に、S-ニトロソシステイン (CysNO)を細胞に処理することで細胞内タンパク質の SNO 化を誘導し、TUCD Buffer (8 M Urea, 30 mM Tris-HCl pH7.4, 2 % CHAPS, 2 % *n*-Dodecyl-β-D-Maltoside, 1 mM DTPA)で可溶化後、CyDye-Switch 法にて SNO 化部位を蛍光標識し、SDS-PAGE および二次元電気泳動を行うことで細胞内における SNO 化タンパク質の検出を行った。その後、MALDI-TOF/MS (Bruker)を用いた PMF 法によって検出された SNO 化されたタンパク質の同定を行った。
【結果・考察】蛍光色素を用いた SNO 化タンパク質検出方法を比較したところ、今回我々が検討した方法において効果的に SNO 化タンパク質が検出されていることが確認された。本研究では TUCD Buffer を用いることでタンパク質分子内にある SNO 化部位を Sodium Ascorbate と Cu^{2+}によって還元、新規に生成した遊離 SH 基を CyDye-Maleimide によって特異的に標識することができた。また、本手法を用いて A549 細胞における SNO 化タンパク質の動態を捕えることができ、タンパク質の同定の結果、SNO 化が報告されているタンパク質を同定することができた。本研究で確立した CyDye-Switch 法と二次元電気泳動を用いた SNO 化タンパク質の解析は SNO 化タンパク質の機能解析や SNO 化タンパク質を標的とした機能性化合物の評価方法に応用可能であることが示唆された。

S-nitorosylation, 2-Dimentional Electrophoresis, CyDye-Switch Method

講演番号：3F12p19
講演日時、会場：3 月 28 日 17:48～ F 校舎 12 会場

マウス酸性哺乳類キチナーゼの触媒ドメインの大腸菌での発現とその性質

Expression of the Catalytic Domain of Mouse Acidic Mammalian Chitinase in *E.coli* and Characterization of Its Properties

○小山 文隆、樫村 昭徳、木村 将大、大川 一明、鈴木 博隆、浮田 淳史、脇田 悟誌、岡崎 香奈、大野 美紗、坂口 政吉、菅原 康里（工学院大学工）
○Fumitaka OYAMA, Akinori KASHIMURA, Masahiro KIMURA, Kazuaki OKAWA, Hirotaka SUZUKI, Atsushi UKITA, Satoshi WAKITA, Kana OKAZAKI, Misa OHNO, Masayoshi SAKAGUCHI, Yasusato SUGAHARA (Kogakuin Univ.)

キチナーゼは，甲殻類，昆虫，真菌類の主な構成要素であるキチンの β-1-4 グリコシド結合を加水分解する。ほ乳類はキチンとその合成酵素を生産しないが，活性のある二種類のキチナーゼ，キトトリオシダーゼ (chitotriosidase, Chit1) と酸性ほ乳類キチナーゼ (acidic mammalian chitinase, AMCase) を発現している。これらのほ乳類キチナーゼはゴーシェ病，アルツハイマー病，喘息などのいくつかの病態状況で発現が増加するので，注目されている。しかし， Chit1 と AMCase がそれらの病気の病態生理にどのくらい寄与するかは未決定のままである。

マウス AMCase は N 末領域の触媒ドメイン (CatD) と C 末領域のキチン結合ドメイン (CBD) から構成されている。我々はマウス AMCase の CatD を融合タンパク質 Protein A-CatD-V5-His として大腸菌で発現し，その性質を完全長 AMCase と比較した。

組換え CatD は，4-nitrophenyl *N, N'*-diacetyl-β-D-chitobioside を基質とした場合，比活性，至適 pH，至適温度，pH 安定性そして温度安定性において，完全長 AMCase とほぼ同等だった。この組換え CatD は pH 2.0 でキチンビーズに結合し，*N*-acetylglucosamine 六量体，コロイダルおよび結晶性キチンそしてエビの殻を分解し，主として *N, N'*-diacetylchitobiose 断片を生成した。これらの結果は，CatD が CBD の非存在下でキチンを認識し，分解できることを示している。

acidic mammalian chitinase, catalytic domain, chitin

講演番号：3F12p20
講演日時、会場：3 月 28 日 17:59～ F 校舎 12 会場

RNASeq による木材穿孔性二枚貝キクイガイの代謝経路解析
Metabolic pathway analysis of wood boring bivalves *Xylophaga* by RNASeq
○西 真郎[1]、芳賀 拓真[2]、小林 樹和[1]、小林 英城[1]、臼井 けい子[1]、開 俊樹[3]、鶴若 祐介[1]、秦田 勇二[1] ([1]海洋研究開発機構、[2]国立科学博物館、[3]自治医科大学)
○SHINRO NISHI[1], TAKUMA HAGA[2], KIWA KOBAYASHI[1], HIDEKI KOBAYASHI[1], KEIKO USUI[1], TOSHIKI HIRAKI[3], YUSUKE TSURUWAKA[1], YUJI HATADA[1] ([1]JAMSTEC, [2]National Museum of Nature and Science, [3]Jichi Medical University)

【背景・目的】
キクイガイ(Xylophaga)は進化の過程で機械的穿孔能を獲得した、海洋の主に深海に棲息する木材穿孔性二枚貝である。穿孔性二枚貝は、中生代中頃の捕食者の爆発的な出現に対抗し、対捕食者戦略として「穿孔する」棲息姿勢を獲得し、進化を加速させたといわている。キクイガイを含むそのなかの一部が、他貝が化学的穿孔を行うのとは対照的に、物理的に基質を剥離する「機械的穿孔」に特化したため木材にも適応が可能となった。このようにしてキクイガイは、海中の木材(流木・沈木)という不安定な棲息環境へ高度に適応し、沈木生物群集の代表的構成者として繁栄し続けている。この特殊な行動様式を持つキクイガイの木質分解経路を中心とした代謝経路を解明するため、RNASeqにより発現遺伝子の網羅的な取得を行った。
【方法・結果】
キクイガイから totalRNA を抽出後、poly-A 配列を持つホスト(真核)由来の mRNA を増幅した。これを鋳型とし、Hiseq2000 のシーケンシングにより 4.7Gb の mRNA 配列を取得した。アセンブルにより得られた 41.5Mb の contig 配列から遺伝子を取得し、木質分解経路を中心としたキクイガイが持つ代謝経路の精査を行った。その結果、複数の GH9 cellulase やβ-glucosidase の検出と、Glycolysis 経路が確認された事から、キクイガイは木材を分解･資化している可能性が示唆された。本大会ではさらなる詳細な解析内容について報告する。

Xylophaga, RNASeq, wood decomposition

講演番号：3F22a02
講演日時、会場：3 月 28 日 09:11～ F 校舎 22 会場

発芽米抽出物の血管内皮細胞に対する効果

Effect of the germination unpolished rice extract on microvascular endothelial cell.

○田畑 優子、桜井 哲人、粂井 貴行（ファンケル総合研究所）
○YUKO TABATA, TETSUHITO SAKURAI, TAKAYUKI KUMEI (Fancl Research Institute)

【目的】

発芽玄米は発芽する際に酵素が活性化し、出芽のために栄養を玄米内部に増やすため、玄米と比べ栄養価が高いのが特長である。機能面では、高血圧、高脂血症、血糖値を改善する作用があり、食品分野では高機能食品として着目されている。また、我々はこれまで、発芽玄米に LDL コレステロール値を抑えるなど、血管老化に関する作用を確認してきた。

血管は加齢によりより面積が減少し、機能が衰えることが知られている。加齢と共に皮膚色は、赤みが減り、明度が下がる傾向との報告もあり、加齢と血流低下の関連が示唆されている。

そこで本研究では、発芽玄米の化粧品への応用として、発芽玄米水溶性エキスと、水溶性エキスでは含有していないγ-オリザノールや発芽玄米ステロール配糖体（以下：ASG）に着目した。皮膚血流への影響を評価するため、ヒト皮膚由来血管内皮細胞に対する影響を確認した。

【方法】

被験物として玄米（*Oryza sativa* subsp. *japonica*）を発芽させ、加水分解処理を行ったものを発芽玄米水溶性エキスとし、発芽玄米から得られた油溶性エキスを ASG、更にγ-オリザノールを検体とした。正常ヒト新生児包皮由来微小血管内皮細胞を hFGF-B 不含培地を用いて播種後、翌日各試料含有培地を追添加し、さらに 3 日培養を行った。細胞の増殖活性、代謝活性への影響を確認した。

【結果・考察】

発芽玄米エキスを血管内皮細胞に供した結果、水溶性エキス、油溶性の成分である ASG、γ-オリザノール共に代謝活性促進作用が確認された。細胞増殖作用については ASG、γ-オリザノールのみ増殖作用が確認され、水溶性エキスには認められなかった。ASG、γ-オリザノールの代謝活性が高い値となったのは、細胞の増殖作用によるものである可能性が示唆される。また、水溶性エキスの成分を分析した結果、ASG の含有は認められず、糖質、アミノ酸を多く含むことが判った。血管内皮細胞の代謝活性へは、これら成分が影響を与えている可能性が示唆された。

germination unpolished rice, microvascular endothelial cell

講演番号：3F22a03
講演日時、会場：3 月 28 日 09:22～ F 校舎 22 会場

与那国島産ボタンボウフウの血管内皮細胞に対する保護作用

Protective effects of Peucedanum japonicum in human endothelial cells

深田 楓子、○長谷川 達也、作田 智洋、田村 亜紀子、鈴木 良治 ((株)資生堂　新領域研究センター)
Kaedeko FUKADA, ○Tatsuya HASEGAWA, Tomohiro SAKUTA, Akiko TAMURA, Yoshiharu SUZUKI (Shiseido Innovative Science Research & Development Center)

【背景】
与那国島産ボタンボウフウは、長命草とも呼ばれ、古くから「一株食べると一日長生きする」と言い伝えられ、伝統的な島野菜や民間薬として使用されている。これまでに、ボタンボウフウには抗糖尿病作用、抗肥満作用やむくみ改善作用などが報告されているが、血管系に対する効果はほとんど知られていない。そこで我々は、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC；Human umbilical vein endothelial cell) を用いて与那国島産ボタンボウフウエキスの血管内皮保護作用について検討した。
【方法】
HUVEC を用いて、血管内皮に対する保護作用が知られている Sirtuin-1 の発現や、eNOS(endothelial nitric oxide synthase)の遺伝子発現および活性化（リン酸化）に対するボタンボウフウエキスの作用を RT-PCR、Western blot 法にて評価した。さらに、H_2O_2(100 μM)によって誘導された HUVEC の細胞老化に対するボタンボウフウエキスの作用を老化マーカーとして知られている Senescence associated-β galactosidase(SA-βgal)活性を指標に評価した。
【結果】
HUVEC において、ボタンボウフウエキス(10, 50 μg/ml)を 48 時間処置することにより、Sirtuin-1 の発現促進作用が確認された。さらに、ボタンボウフウエキス(10, 50 μg/ml)を 24 時間処置することにより、eNOS の mRNA 発現促進作用の確認、ならびに、ボタンボウフウエキス(10, 50 μg/ml)を 15 分間処置することにより eNOS のリン酸化が促進されることも合わせて確認された。
また、HUVEC に H_2O_2(100 μM)を 1 時間処置し、その後 5 日間培養を続けると、SA-βgal 陽性細胞の割合が増加したのに対して、H_2O_2 処置後ボタンボウフウエキス(1, 10 μg/ml)を処置することで、SA-βgal 陽性細胞の割合が減少することが確認された。
【考察】
与那国島産ボタンボウフウには、血管内皮細胞において、長寿遺伝子 Sirtuin-1 の発現促進作用、eNOS の遺伝子発現促進および活性化作用、ならびに、酸化ストレスにより誘導される細胞老化に対して抗老化作用を有する可能性が示唆され、本研究を通して、与那国島産ボタンボウフウには血管内皮に対する保護作用を有することが期待された。

Peucedanum japonicum, Endothelial cells, Sirtuin-1

講演番号：3F22a04
講演日時、会場：3 月 28 日 09:33～ F 校舎 22 会場

芍薬由来成分の血管内皮細胞における機能解析
Beneficial effects of Paeoniflorin and Paeonol in Paeonia lactiflora on vascular endothelial cells.
○鈴木 志織[1]、関 浩一[2]、宮崎 均[1]([1]筑波大学生命環境、[2](株)茎崎観光農園)
○Shiori SUZUKI[1], Hiroichi SEKI[2], Hitoshi MIYAZAKI[1] ([1]Tsukuba Univ., [2]Kukizaki Tourist Farm Co.,Ltd.)

【背景・目的】
芍薬は中国を原産地とするボタン科の植物で、その根皮は生薬として利用され、様々な漢方薬に含まれる。芍薬の根皮には、薬用成分としてペオニフロリンとペオノールが含まれ、鎮痛・鎮静・婦人病改善・血行促進などの作用を持つことが知られている。一般に芍薬の栽培には大量の農薬が使用されるが、(株)茎崎観光農園では土壌改良により無農薬で栽培することに成功した。この技術開発により、従来は農薬汚染により利用されなかった地上部の健康機能性食品としての利用が可能となった。一方、動脈硬化の発症・進展には、過剰に産生される活性酸素種(ROS)が血管内皮細胞(EC)に傷害を与えることが深く関与する。つまり、動脈硬化の予防・改善には、傷害を受けた EC の治癒能力を高め、EC に ROS への抵抗性を与えることが重要と言える。本研究は、ペオニフロリン、ペオノール、芍薬(葉・根)抽出物の EC に対する機能、及びそれに至るシグナル経路を解析することを目的とする。
【方法】
EC はブタ胸部大動脈から調製し、継代数 6～10 までを用いた。各実験前には、EC を 3.5 ㎝ディッシュに播種し、10%FBS を含む DMEM で 7 時間培養した後、1%FBS を含む DMEM で 16 時間同調培養を行った。創傷治癒法では、各化合物(ペオニフロリン、ペオノール)を添加し、チップの先端を用いて擬似的な傷を作り、24 時間後に顕微鏡で治癒状態を観察した。阻害剤を用いた実験では、各化合物添加の 1 時間前に阻害剤を添加した。生存率測定では、各化合物を添加し、24 時間後に H_2O_2 を添加し、さらに 24 時間後、Trypan blue により染色し細胞数を計測した。
【結果・考察】
ペオニフロリンとペオノールは EC において創傷治癒を促進し、それらは L-NMMA(NO 合成酵素阻害剤)、ZnPP IX(HO-1 阻害剤)、3AT(Catalase 阻害剤)により抑制された。また、芍薬(葉・根)抽出物も創傷治癒を促進することが確認された。H_2O_2 添加により低下した生存率はペオニフロリンとペオノールの添加により有意に回復した。
以上の結果より、ペオニフロリンとペオノールは一酸化窒素 NO、抗酸化酵素 HO-1、Catalase を介して傷害を受けた EC の治癒能力を向上させ、EC に ROS への抵抗性を付与することで、動脈硬化の発症・進展の予防・改善効果を持つ可能性が示唆された。

Paeonia lactiflora, Paeoniflorin, vascular endothelial cells

講演番号：3F22a05
講演日時、会場：3 月 28 日 09:44～ F 校舎 22 会場

メチル化カテキンの血管内皮細胞に及ぼす影響
Effect of (-)-epigallocatechin-3-*O*-(3-*O*-methyl)-gallate on vascular endothelial cells function
○吹野 成美[1]、宮崎 均[2]、吉田 滋樹[2] ([1]筑波大院・生命環境系、[2]筑波大・生命環境系)
○Narumi FUKINO[1], Hitoshi MIYAZAKI[2], Shigeki YOSHIDA[2] ([1]Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, [2]Fac. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)

【目的】動脈硬化は生活習慣や喫煙などによって体内で過剰に産生される活性酸素種（ROS）が、血管壁を構成する血管内皮細胞（Endothelial cell, EC）に傷害を与えることに起因し、これが日本人の死因の 3 割を占める心疾患、脳血管疾患の根底病変となっている。緑茶中のカテキンの一種である EGCG は、この ROS により傷害を受けた EC の創傷治癒力を向上し、動脈硬化の発症、進展を抑制する作用を有することが知られている。一方、「べにふうき」などの一部の茶品種に含まれるメチル化カテキン［(-)-Epigallocatechin-3-*O*-(3-*O*-methyl)-gallate , EGCG3”Me］は抗アレルギー効果などが報告されており近年注目されているが、動脈硬化に対する効果は明らかではない。そこで本研究では、EGCG3”Me の動脈硬化抑制作用の有無を明らかとするため、「べにふうき」から EGCG3”Me を精製し、EC の培養細胞に対する影響の検討を行った。
【方法】EGCG3”Me は「べにふうき」緑茶粉末から 80%EtOH で抽出し Diaion HP20 を用いたカラムクロマトグラフィーで分画後、分取 HPLC により精製した。EC はブタの胸部大動脈由来のものを用い、10%FBS, 1 g/L Glc を含む DMEM 培地で継代して、実験には 6 代から 10 代までの細胞を用いた。生細胞数は Trypan Blue を添加し血球計算盤を用いて測定した。創傷治癒の評価はディッシュに接着させ培養した EC にチップの先端で擬似的な傷を作り、8 時間および 24 時間後に顕微鏡下で写真撮影して遊走した細胞数を計測する Wound healing assay により行った。一酸化窒素（NO）産生量の測定は DAF-2DA を用いて蛍光強度を測定した。創傷治癒への NO の影響は NO 合成酵素阻害剤である L-NMMA の共存下で Wound healing assay を行った。
【結果】EGCG と EGCG3”Me をそれぞれ培地に添加して EC の増殖に与える影響を検討した結果、両化合物ともに濃度依存的に EC の増殖を促進し、終濃度 10 μM におけるその効果はそれぞれ 120%と 140%であり EGCG よりも EGCG3”Me の方が高かった。次に、両化合物が EC の創傷治癒力に与える影響について検討した結果、両化合物共に EC の創傷治癒を有意に促進し、終濃度 10 μM では EGCG3”Me が EGCG の約 1.2 倍の効果を示した。さらに、EC の創傷治癒には NO が関与しているため、両化合物による　NO 産生量を測定した結果、両化合物は NO 産生を促進し、その効果も創傷治癒力と同様に、EGCG よりも EGCG3”Me で強いことが明らかとなった。また、両化合物により有意に促進された創傷治癒は、L-NMMA によって抑制されたことから、両化合物による創傷治癒の促進は NO を介して行われることが明らかとなった。

catechin, EGCG3"Me, endothelial cell

講演番号：3F22a06
講演日時、会場：3 月 28 日 10:05～ F 校舎 22 会場

ツルレンゲ種子抽出物による視機能低下抑制作用

The effect of *Astragalus complanatus* seed extract on eye function

○屋敷 圭子、寒林 里美、大戸 信明、高柿 了士、中原 達雄（丸善製薬）
○Keiko YASHIKI, Satomi Kanbayashi, Nobuaki Ohto, ryouji Takagaki, Tatsuo Nakahara (Maruzen Pharmaceuticals Co.,Ltd.)

【目的】ツルレンゲ（ツルゲンゲ、*Astragalus complanatus* R.Br. Ex Bunge.）は、主に中国、内モンゴルに自生するマメ科の多年性の植物である。その種子を沙苑子（シャエンシ）といい、目の保養や強壮、解毒等の作用を期待して飲食されている。近年では紫外線量増加などの環境変化やストレス、老化などによる活性酸素の発生が、視機能の低下を引き起こすと報告されている。本研究では、ツルレンゲ種子の抽出物を用いて、抗酸化作用および視神経細胞保護作用などの視機能の低下抑制について検討した。
【方法】*in vitro* 試験；ORAC 法の他、各種抗酸化活性評価を実施した。また、アルドースリダクターゼ活性阻害作用、紫外線ダメージ回復作用、ルテインの光分解防止効果について評価した。*in vivo* 試験；ラットの前眼房内へ圧力負荷により、網膜虚血・再還流モデルを実験的に作出し[1)]、ツルレンゲ種子抽出物を経口投与し、眼球を摘出した。視神経乳頭部を通る横断面での組織切片を作製し、網膜障害の組織学的検討を行った。
【結果】*in vitro* 試験；ツルレンゲ種子抽出物は抗酸化活性を有することが確認された。また、アルドースリダクターゼ活性阻害作用、紫外線ダメージ回復作用、ルテインの光分解防止効果が確認された。*in vivo* 試験；ツルレンゲ種子抽出物の経口摂取により、網膜虚血に伴う視神経細胞の障害の低減および細胞減少の抑制作用が認められた。以上の結果より、ツルレンゲ種子抽出物には目の機能を維持、改善する作用を有することが示唆された。

1）赤池照紀、足立　圭、金田勝幸　日薬理誌（Folia Pharmacol. Jpn.）**111**, 97-104（1998）

eye function, *Astragalus complanatus*, optic nerve cell

講演番号：3F22a07
講演日時、会場：3 月 28 日 10:16～ F 校舎 22 会場

低濃度 EGCg がマウス膵β細胞に及ぼす影響

The effect of low concentration EGCg on pancreatic beta-cell line

○山下 さやか、望月 和樹（山梨大院）
○Sayaka YAMASHITA, Kazuki MOCHIZUKI (Yamanashi Univ.)

【背景・目的】

緑茶中の主要なポリフェノールであるエピガロカテキンガレート（EGCg）は，抗酸化作用を有し代謝性疾患の予防に効果があるという報告が数多くされている。その一方で EGCg は自身が酸化されると過酸化水素などの活性酸素種の産生を誘導するため，過剰摂取による有害事象の増加も懸念されている。特にインスリン分泌に関与する膵β細胞などの培養細胞を用いた実験では，低濃度の EGCg（10μM 以下）の投与においても細胞死が誘導されることが報告されている。しかしながら、低濃度 EGCg 投与による膵β細胞の細胞毒性誘導機序の詳細はいまだ明らかではない。そこで本研究では、膵β細胞株を用い低濃度 EGCg 投与による細胞傷害誘導機序を明らかにすることを目的とした。

【方法】

マウス膵β細胞株である Mouse Insulinoma 6（MIN6）細胞を用い，終濃度 5μM になるように EGCg を添加し 48 時間培養した。培養後細胞を回収し，炎症・活性酸素種除去関連遺伝子の mRNA 発現をリアルタイム PCR により調べた。

【結果・考察】

5μM の EGCg を添加培養した MIN6 細胞では,活性酸素除去関連遺伝子(グルタチオンペルオキシダーゼ，スーパーオキシドディスムターゼなど）および炎症を誘導する転写因子である NF-κB の mRNA 発現が，対照細胞と比較し顕著に高かった。

これまでの研究によって、培養細胞への高濃度の EGCg 添加（50μM 以上）は過酸化水素の産生を増大させることが報告されている。本研究においても活性酸素種除去関連遺伝子の発現が EGCg 添加によって増大したことから，膵β細胞株においては，低濃度の EGCg 添加（5μM）においても過酸化水素の産生が増大した可能性が考えられた。また，NF-κB の mRNA 発現も顕著に増大したことから，膵β細胞への EGCg の暴露は低濃度であっても炎症反応を増大させ、細胞傷害を誘導する可能性が考えた。

pancreatic beta-cell, EGCg, prooxidative effect

講演番号：3F22a08
講演日時、会場：3 月 28 日 10:27～ F 校舎 22 会場

マガキ由来抗酸化物質の Keap1-Nrf2 経路活性化による肝臓保護作用

Hepatoprotective effect of antioxidant from Pacific oyster via activation of Keap1-Nrf2 pathway

○布田 博敏[1]、渡邉 貢[2]、上甲 紗愛[1]、惠 淑萍[1]、武田 晴治[1]、渡邉 孝之[2]、千葉 仁志[1]([1]北海道大学大学院　保健科学研究院、[2]渡辺オイスター研究所)
○Hirotoshi Fuda[1], Mitsugu Watanabe[2], Sae Joko[1], Shu-Ping Hui[1], Seiji Takeda[1], Takayuki Watanabe[2], Hitoshi Chiba[1] ([1]Faculty of Health Sciences, Medical Laboratory Sciences, Hokkaido University, [2]Watanabe Oyster Laboratory Co. Ltd.)

【背景と目的】生体は内外で発生する活性酸素種(ROS)に対する防御機構を備えているが、ROS が過剰に産生され処理しきれない場合、酸化ストレスを生じる。この酸化ストレスの蓄積が、がん、動脈硬化性疾患、虚血/再灌流障害、慢性関節リウマチ、糖尿病、アルツハイマー病やパーキンソン病の神経障害などの様々な疾患や老化の一因であると考えられている。非アルコール性脂肪肝炎等の肝疾患においても、酸化ストレスが重要な要因の一つと推測されていることから、抗酸化酵素を活性化する食品の摂取は肝疾患の予防の観点からも重要であると考えられる。
転写因子 Nrf2 は刺激のない状態では、細胞質に局在するタンパク質 Keap1 と結合し、速やかに分解される。細胞に酸化ストレスや親電子性物質等の刺激が加わると、Nrf2 は Keap1 より分離し核内に移動後、プロモーター領域の Antioxidant Responsive Element(ARE)に結合して、薬物代謝第 2 相酵素群や抗酸化遺伝子群等を活性化する。既知の抗酸化物質(sulphoraphane、isoliquiritigenin など)における抗酸化能の一部は、Keap1-Nrf2 経路を介した抗酸化遺伝子群の発現によると考えられている。先に我々はペルオキシルラジカル発生剤(2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride、AAPH)を用いて、肝臓の株化細胞（C3A）に酸化ストレスを発生させた。マガキ由来の抗酸化物質（3,5-dihydroxy-4-methoxybenzyl alcohol、DHMBA）は濃度依存的にこれを抑制し、既存の抗酸化物質であるクロロゲン酸は抑制しなかった(日本農芸化学会、2014）。今回、我々は DHMBA の肝臓保護作用における Keap1-Nrf2 経路の関与について検討した。
【方法】ARE を有するプロモーターとレポーター遺伝子としてルシフェラーゼが配置されたベクターを用いた Reporter Gene Assay を行った。C3A に上記ベクターを遺伝子導入し、DHMBA とクロロゲン酸を添加後、ルシフェラーゼ活性を測定した。
【結果】DHMBA においては Keap1-Nrf2 経路の活性化が濃度依存的に観察されたが、クロロゲン酸においては観察されなかった。
【考察】DHMBA は Keap1-Nrf2 経路を活性化することにより、クロロゲン酸よりも細胞レベルで高い抗酸化能を示すと考えられた。これまでの我々の研究結果を総合すると、DHMBA はラジカル消去能、両親媒性、そして Keap1-Nrf2 経路の活性化により強い抗酸化能を発揮すると考えられる。

antioxidant, Pacific oyster, Keap1-Nrf2

講演番号：3F22a09
講演日時、会場：3 月 28 日 10:38～ F 校舎 22 会場

桂皮酸誘導体への炭素鎖導入による HSP70 発現増強効果
Enhanced HSP70 Expression Induction of Cinnamic Acid Derivatives by Carbon Chains Introduction
○丹治 典子、片山 茂、清水 綾乃、中村 宗一郎（信州大農）
○Noriko TANJI, Shigeru KATAYAMA, Ayano SHIMIZU, Soichiro NAKAMURA (Shinshu Univ.)

【背景・目的】現在，日本は超高齢化社会を迎え，加齢による疾病のリスクを軽減する対策が求められている。特に，アルツハイマー病をはじめとする神経変性疾患は社会的な問題となっている。神経変性疾患は，酸化ストレス等により変性したタンパク質が凝集体を形成し，神経細胞に沈着して細胞死を誘導することで生じる。そのため，タンパク質品質管理機構の中心で分子シャペロンとして機能する HSP が治療・予防の標的として注目されている。天然中に存在する桂皮酸誘導体は，抗酸化作用などの機能性が報告されており，本研究室でも，エステル化によってアルツハイマー病原因タンパク質であるアミロイドβの凝集阻害活性が上昇することを確認している [1)]。特に，フェルラ酸エステルおよびカフェ酸エステルにおいて高い凝集活性が示された [1)]。そこで本研究室では，HSP70 発現誘導に着目し，エステル化桂皮酸誘導体の神経細胞保護効果を検討した。
【方法】桂皮酸誘導体のエステル化は次のようにして行った。①まず，酸触媒による脱水縮合を利用して桂皮酸誘導体メチルエステルを調製した。②次に，炭素鎖長の異なるアルキルアルコールを用い，固定化リパーゼ(Novozyme 435，リパーゼ PS IM アマノ)によるエステル交換反応を利用して，様々な鎖長の炭素鎖（C3，C4，C6，C8，C16)を導入した。得られた新規化合物は HPLC（カラム:Inertsil ODS-3，溶媒:45-100 % メタノールグラジエント)を用いて分析・精製した。新規化合物の HSP70 発現誘導効果をヒト神経芽細胞腫 SK-N-SH 細胞を用いて，リアルタイム PCR 法で測定した。
【結果・考察】桂皮酸誘導体とアルキルアルコールの酵素反応により，C1，C3，C4，C6，C8，C16 の炭素鎖を有する桂皮酸誘導体エステルが得られた。HPLC 分析において，炭素鎖の導入により保持時間が後方に移動したことから，疎水性の上昇が示された。得られたフェルラ酸エステルを SK-N-SH 細胞へ添加し，リアルタイム PCR 法で HSP70 発現誘導効果を調べた。その結果，フェルラ酸は HSP70 の発現を誘導することが示され，フェルラ酸に中鎖（C4 および C6)を導入することで HSP70 発現誘導効果が顕著に上昇した。このことから，最適な炭素鎖長の導入は，フェルラ酸が有している HSP70 発現誘導能を高めることが明らかとなった。現在はフェルラ酸以外のフェノール酸のエステル化にも成功しており，本発表では構造活性相関についても報告する予定である。

1) Kondo *et. al.* Biotechnology and Applied Biochemistry, 61, 401-407, 2014.

neuroprotective effect, HSP70, cinnamic acid derivatives

講演番号：3F22a10
講演日時、会場：3 月 28 日 10:49～ F 校舎 22 会場

ザクロ由来ポリフェノールによる SIRT3 の活性化

Pomegranate-derived polyphenols activate SIRT3

○小野 友愛[1]、坂口 武則[2]、藤田 幸佑[1]、伊東 秀之[3]、西田 典永[4]、長友 暁史[4]、松浦 洋一[4]、片倉 喜範[5] ([1]九大院シス生、[2]九大院生資環、[3]岡山県大保福、[4]森下仁丹株式会社、[5]九大院農院)
○ Tomomi ONO[1], Takenori SAKAGUCHI[2], Kousuke FUJITA[1], Hideyuki ITO[3], Norihisa NISHIDA[4], Akifumi NAGATOMO[4], Youichi MATSUURA[4], Yoshinori KATAKURA[5] ([1]Grad. Sch. Sys. Life. Sci., Kyushu Univ., [2]Grad. Sch. Agr. Biores. Bioenv. Sci., Kyushu Univ., [3]Grad. Sch. Health. Welfare Sci., Okayama Prefectural Univ., [4]Morishita Jintan Co.,Ltd., [5]Dept. Biosci. Biotech., Fac Agr., Kyushu Univ.)

【目的】
カロリー制限を行うと生体内ではサーチュイン遺伝子が活性化され、これが様々な抗老化機能を発揮する重要な因子であるとして注目されている。哺乳類では SIRT1～SIRT7 のサーチュインファミリーが存在しており、近年カロリー制限下で SIRT3 がミトコンドリア局在型の抗酸化酵素である SOD2 を活性化させ、酸化ストレスを抑制することが報告されるなど、その機能に注目が集まってきている。そこで本研究では、SIRT3 を活性化する食品の探索とその機能性を評価することを目的とし、腸管上皮のモデルであるヒト結腸がん由来 Caco-2 細胞を用いて、SIRT3 活性化食品のスクリーニングシステムを開発するとともに、機能性食品成分の探索・同定を行い、それらの機能性を明らかにすることを目的とした。
【方法】
ヒト SIRT3 遺伝子のプロモーター領域を EGFP 発現ベクター中の CMV プロモーターと置換したレポーターベクター pSIRT3p-EGFP を作製し、これを Caco-2 細胞に導入することで、Caco-2(SIRT3p-EGFP)細胞を樹立した。この細胞に、22 種類のポリフェノールを添加して培養した後、イメージングサイトメーターにより EGFP 蛍光強度を定量化することで 1 次スクリーニングを行った。活性の高かった食品成分については、定量 real-time PCR 法によって内在性 SIRT3 の発現量に対する効果を検証した。さらに、同定した SIRT3 活性化食品の SOD2 酵素活性に対する効果を検証した。
【結果と考察】
1 次スクリーニングの結果、7 種類のポリフェノールを SIRT3 活性化食品として同定した。これらの食品成分について、定量 real-time PCR 法により内在性 SIRT3 発現に対する効果を検証したところ、ポリフェノール 5 種類で内在性 SIRT3 増強効果が認められた。これらの食品成分の中で、2 種類のポリフェノールについて Caco-2 細胞における SOD2 酵素活性に対する効果を検証した結果、いずれのポリフェノールも、SOD2 活性を増強する効果があることが明らかとなった。
以上の結果から、この 2 種類のポリフェノールが SIRT3 の活性化を通じた SOD2 の活性化を介して、活性酸素の発生を抑制することで抗老化を実現するものと予想された。

SIRT3, anti-aging, pomegranate

講演番号：3F22a11
講演日時、会場：3 月 28 日 11:10～ F 校舎 22 会場

ザクロ葉エキスの血糖値上昇抑制作用とその作用成分

Inhibitory effect of the extract of leaves from pomegranate on postprandial blood glucose level in mice, and α-glucosidase inhibitors from the leaves

○河辺 聡子、赤井 衣里阿、加藤 奈々、我如古 菜月、伊東 秀之 (岡山県大 保健福祉 栄養)
○Satoko Kawabe, Iria AKAI, Nana KATO, Natsuki GANEKO, Hideyuki ITO (Okayama Pref. Univ.)

【目的】近年、日本人の食生活が変化したことにより、肥満や糖尿病の罹患率が急激に増加するなか、これらを改善する目的で α-glucosidase 阻害薬があり、臨床で医薬品としてボクリボースやアカルボースが使用されている。植物由来の α-glucosidase 阻害薬としては、茶ポリフェノールや桑の葉などが知られている。そこで、我々は α-glucosidase 阻害活性成分探索の一環として、様々な植物エキスについてスクリーニングを行った結果、ザクロ葉エキスに強い阻害活性を有することを見出した。そこで本研究では、マウスにおける糖負荷後のザクロ葉エキスの血糖値上昇抑制活性およびザクロ葉に含まれる α-glucosidase 阻害活性成分の探索を目的として実験を行った。
【方法】BALB/c マウス（6 週齢、オス）を予備飼育後、対照群としてアラビアゴム懸濁液投与群、ザクロ葉エキス投与群、ポジティブコントロールとしてボクリボース投与群（各 n=5）に分け、被験サンプル投与後、マルトース溶液を投与し、糖負荷後 120 分までの血糖値を経時的に測定した。一方、活性成分を特定するために、ザクロ葉を含水アセトンでホモジナイスし、濃縮後，ジエチルエーテル、酢酸エチル、*n*-ブタノールで順次抽出し、各画分および水移行部を得た。各画分について α-glucosidase 阻害活性を測定し、活性画分について各種カラムクロマトグラフィーによる分離、精製を行い、阻害活性成分の特定を行った。
【結果および考察】マウスにおける糖負荷試験では、α-glucosidase 阻害活性を有するザクロ葉エキス投与群では、ボクリボースと同様に対照群よりも有意な血糖値上昇抑制作用を示した。以上のことからザクロ葉の血糖値上昇抑制作用の一因として、α-glucosidase の阻害活性が考えられた。そこで、ザクロ葉の α-glucosidase 阻害活性成分を探索するために、ザクロ葉を含水アセトンでホモジナイズを行い、濃縮後，各種有機溶媒による抽出を行い、各エキスを得た。各エキスの α-glucosidase 阻害活性を測定した結果、酢酸エチルエキスに最も強い阻害活性が示された。そこで酢酸エチルエキスについて各種カラムクロマトにより分離、精製を行い、４種の化合物を単離し、各種スペクトル解析の結果に基づき、エラジタンニンの granatin A, B および punicafolin と pentagalloylglucose であると同定した。これら単離した化合物の α-glucosidase 阻害活性を測定した結果、４種の化合物のうち granatin A および granatin B が強い阻害活性を示し，それぞれ IC_{50} 値は、70.7 および 130 μM であった。以上の結果から，ザクロ葉エキスには血糖値上昇抑制活性を有することが明らかとなり、さらにその活性成分は granatin A および granatin B であることが示唆された。

pomegranate, postprandial blood glucose level, α-glucosidase

講演番号：3F22a12
講演日時、会場：3 月 28 日 11:21～ F 校舎 22 会場

緑茶カテキン EGCG は 67LR を介して抗血栓因子 TFPI の産生を促進する

EGCG enhances the production of TFPI through 67LR-dependent pathway.

○上崎 浩克[1]、高倉 卓也[1]、山下 修矢[1]、立花 宏文[1,2] ([1]九大院農院・生機科、[2]九大食品機能デザイン)
○Hirokatsu KANZAKI[1], Takuya TAKAKURA[1], Syuya YAMASHITA[1], Hirofumi TACHIBANA[1,2] ([1]Department of Bioscience and Bioscience and Biotechnology, Kyushu University, [2]Food Functional Design Research Center, Kyushu University)

【背景および目的】
世界全体の死因の第一位と第二位はそれぞれ虚血性心疾患及び脳卒中と血管系疾患が長年占めているが（*Lancet,* 380,2095-2128 (2012))、これら血管系疾患は主として血栓の形成により血管が閉塞する病態、すなわち血栓症に起因する。血液凝固は主に組織因子による外因系凝固反応により開始・亢進するが、組織因子を制御する分子として組織因子経路インヒビター（Tissue factor pathway inhibitor:TFPI）が知られている。一方、緑茶の摂取頻度が高い人は、低い人に比べて血管系疾患による死亡リスクが低いことが報告されている(*JAMA,*296,1255-1265 (2006))。また、緑茶の主要な成分である(-)-epigallocatechin-3-*O*-gallate(EGCG)は、その生体内感知レセプターである 67-kDa laminin receptor(67LR)(*Nat. Struct. Mol. Biol.*380-381(2004))を介して様々な生理作用を発現することが明らかにされている。しかしながら、血液凝固と EGCG の関係は不明であった。そこで本研究では、血液凝固及び TFPI 産生に及ぼす EGCG の影響ならびに 67LR の関与について検討した。
【方法および結果】
11 週齢 ICR 雄性マウスを 2 群に分け、Control 群には水を投与し、EGCG 投与群には EGCG を 10 mg/kg body weight/day となるように経口投与した。7 日間経口投与した後、プロトロンビン時間を測定し、血液凝固時間について評価した。その結果、EGCG 投与群の血漿凝固時間は Control 群に比べ高値を示した。ELISA 法により、血漿中の TFPI 濃度を測定したところ、EGCG 投与群の血漿 TFPI 濃度は Control 群と比べ高値を示した。大動脈における TFPI の mRNA およびタンパク質発現量をそれぞれリアルタイム PCR 法及びウエスタンブロット法により測定したところ、EGCG 投与群では TFPI の mRNA 及びタンパク質発現量ともに Control 群に比べ高値を示した。EGCG の TFPI 発現誘導作用における 67LR の関与について正常ヒト臍帯静脈内皮細胞 HUVEC を用い検討した。EGCG 処理により HUVEC の TFPI 発現量は増加したが、抗 67LR 抗体の処理下では EGCG は TFPI 発現量に影響を及ぼさなかった。さらに、血管内皮特異的に 67LR を過剰発現させた遺伝子改変マウス(67LR endothelial overexpression mouse:67LR-EO マウス)を作製し、血漿中 TFPI 濃度に及ぼす EGCG の影響について検討したところ、野生型マウスに比べ、67LR-EO マウスでは EGCG による TFPI 産生誘導作用が増強された。
以上の結果より、EGCG は 67LR を介して血管内皮における TFPI の産生を誘導し、血液凝固活性を低下させる可能性が示された。

Epigallocatechin-3-O-gallate, 67-kDa laminin receptor, Tissue factor pathway inhibitor

講演番号：3F22a13
講演日時、会場：3 月 28 日 11:32～ F 校舎 22 会場

タマネギケルセチンの生体利用性に対する食べ合わせの効果―同時摂取食材がケルセチン血漿濃度に与える影響―

Effect of combination meal consumption with fried onion on the bioavailability of quercetin in humans

高橋 正子[1]、庄野 裕美[1]、向井 理恵[1]、井出 晋太郎[2]、朝武 宗明[2]、濱田 康弘[1]、○寺尾 純二[1]([1]徳島大院ＨＢＳ、[2]ハウスウェルネス(株))
Masako Takahashi[1], Hiromi Shono[1], Rie Mukai[1], Shintaro Ide[2], Muneaki Tomotake[2], Yasuhiro Hamada[1], ○Junji Terao[1] ([1]Tokushima Univ., [2]HOUSE WELLNESS FOODS CORP.)

（目的）代表的な野菜フラボノイドであるケルセチンは多彩な生理活性を有することから、生活習慣病予防効果が期待されている、日常摂取するタマネギはケルセチンの主な摂取源であり、タマネギそのものを摂取したヒトにおけるケルセチンの吸収代謝経路や生体利用性は明らかになりつつある。しかし、日常の食事におけるタマネギ加工調理や食べ合わせがケルセチンの生体利用性に与える影響に関しては不明な点が多い。食事由来ケルセチンの健康に関わる機能を正しく評価するためには、日常の食事におけるケルセチンの生体利用性を明らかにする必要がある。タマネギの単回摂取によるヒト血漿中のケルセチン濃度は、フライ調理により有意に上昇することをわれわれはすでにみとめた。そこで本研究は、フライ調理したタマネギを用いて、タマネギと同時に摂取する食材が血漿ケルセチン濃度に与える影響を明らかにすることにより、タマネギケルセチンの生体利用性に対する食べ合わせの効果に関する知見を得ることを試みた。
（方法と結果）健常人男性（20-22 歳）6 名にフライ調理タマネギ約 200ｇ（ケルセチンアグリコン当量 100 ㎎）を摂取させた。摂取直前、摂取後 1.5 時間および 3 時間に血液を採取し、常法により血漿中の抱合体代謝物を脱抱合化後、HPLC 分析により血漿ケルセチン総量を測定した。食べ合わせ食材として①鶏ささ身（たんぱく質食品）、②豚ばら肉（脂質食品）、③さつまいも（糖質食品）それぞれをレンジ加熱調理後、タマネギと同時に 100ｇ摂取させた。フライ調理タマネギを単独摂取させた場合の血漿ケルセチン総量の濃度は 1.5 時間後で 1.2±0.3μM、3 時間後で 0.8±0.3μM であり、①②においては概ね同様の血漿濃度であったが、③を同時摂取した場合には 1.5 時間後で 0.3±0.1μM、3 時間後で 0.3±0.2μM であり、著しく血漿濃度が低下した。すなわち、タマネギ摂取による血漿ケルセチン濃度の上昇に対して、同時摂取した①および②は影響を与えないが、③は抑制することが明らかになった。
（考察）タマネギ摂取によるケルセチンの生体吸収において、糖質の多いさつまいもをタマネギと同時摂取すると、ケルセチンの吸収が抑えられることによりその生体利用性が低下することが示唆された。したがって、食事由来ケルセチンの有効性を評価するためには、食べ合わせに留意する必要があると考えられる。
(謝辞)本研究は農研機構「機能性を持つ農林水産物・食品開発プロジェクト」の支援により実施した。

quercetin, bioavailability, combination meal consumption

講演番号：3F22a14
講演日時、会場：3 月 28 日 11:43～ F 校舎 22 会場

フラボノイドがコレステロール腸管吸収トランスポーター発現に与える影響
Effect of flavonoids on the expression of intestinal cholesterol transporters
○小川 真奈[1]、猫橋 茉莉[1]、山梨 義英[2]、高田 龍平[2]、阿部 啓子[1,3]、小林 彰子[1] ([1]東大院農、[2]東大病院薬、[3]KAST)
○Mana Ogawa[1], Mari Nekohashi[1], Yoshihide Yamanashi[2], Tappei Takada[2], Keiko Abe[1,3], Shoko Kobayashi[1] ([1]Grad. Sch. Agri. Life Sci., UTokyo, [2]Dept. of Pharm., UTokyo Hosp., [3]KAST)

【目的】過剰な食事性コレステロールの腸管吸収を抑制することは、高コレステロール血症の予防・治療のターゲットとなる。これまでに我々は、ヒト小腸吸収モデル細胞 Caco-2 を用い、食品ポリフェノールの中からコレステロールの腸管吸収阻害成分をスクリーニングし、ルテオリンとケルセチンがコレステロールの吸収を抑制すること、およびコレステロール負荷食を摂餌したラットにおいて血中コレステロール上昇抑制効果があることを見出した。さらにその抑制機構の一つとして、ルテオリンとケルセチンがコレステロールトランスポーター（Niemann-Pick C1 Like 1 Protein, NPC1L1）の mRNA 発現を抑制することを見出した。本研究では、ルテオリンおよびケルセチンによる転写因子を介した NPC1L1 発現低下機構を検討した。
【方法】NPC1L1 は転写因子 SREBP2-HNF4α 経路および PPARα-RXRα 経路による正の転写調節を受ける（Iwayanagi et al., 2011, *Pharm Res.*）。そこで HepG2 細胞にルシフェラーゼ遺伝子配列の上流に hNPC1L1 promoter を組み込んだルシフェラーゼレポーターベクターおよび転写因子 SREBP2−HNF4α、PPARα−RXRα を共導入し、ルテオリンまたはケルセチンとともに 24 時間インキュベート後、ルシフェラーゼアッセイにより hNPC1L1 promoter の活性を測定した。タンパク質発現に与える影響をウエスタンブロッティングにより検討した。
【結果と考察】hNPC1L1 promoter の活性は、ルテオリンとのインキュベートにより、SREBP2-HNF4α 経路で低下した一方、PPARα-RXRα 経路では変化が見られなかった。ケルセチンとのインキュベートではいずれの経路においても上昇した。以上の結果から、ルテオリンは SREBP2-HNF4α 経路による NPC1L1 の正の転写調節を抑制し、NPC1L1 の mRNA 発現を低下させることが明らかとなった。また、ケルセチンは SREBP2-HNF4α 経路および PPARα-RXRα 経路による NPC1L1 の正の転写調節を促進していたが、これまでの我々の検討においては NPC1L1 の mRNA 発現は低下していたことから、ケルセチンは今回検討した転写活性経路とは別の機構で NPC1L1 の発現を低下させることが推察された。別の機構として mRNA の分解促進の可能性を考え、現在、3’UTR を導入したコンストラクトによるルシフェラーゼアッセイを行っている。

本研究の一部は，総合科学技術・イノベーション会議の SIP（戦略的イノベーション創造プログラム）「次世代農林水産業創造技術」によって実施された。

cholesterol, flavonoid, transporter

講演番号：3F22p01
講演日時、会場：3 月 28 日 14:00～ F 校舎 22 会場

ライチ由来ポリフェノールを低分子化した Oligonol のコレステロール低下作用の検証

Cholesterol lowing effect of orally administrate Oligonol having low molecular procyanidins in rats.

○林 洪太[1]、日野原 顯[1]、河合 咲紀[1]、長田 恭一[1]、高成 準[2]、北舘 健太郎[2] ([1]明治大農、[2]アミノアップ化学)
○kota HAYASHI[1], ken HINOHARA[1], saki KAWAI[1], kyoichi OSADA[1], jun TAKANARI[2], kentarou KITADATE[2] ([1]Meiji Univ, [2]Amino Up)

＜目的＞

高分子のプロシアニジン化合物を低分子化してバイオアベイラビリティーを高めた Oligonol の脂質代謝制御作用について、ラードを与えて肥満を誘発したラットに与えた場合のコレステロール代謝に与える効果を検証した。

＜方法＞

3 週齢の Wistar 系雄性ラットを予備飼育後、コーン油 5%を含む AIN76 純化基礎飼料を与えて 14 日間飼育した群を NC 群、基礎飼料に 5%ラード添加飼料を与えた群を C 群とした。また、C 群について、給餌 2 時間後に Oligonol を 1000 mg/Kg･体重のレベルで経口投与した群を O 群とし、上記条件で 14 日間飼育した。なお、NC 群と C 群には生理食塩水を経口投与した。飼育後、麻酔を施して動脈より採血死させて各脂質パラメータを測定した。

＜結果＞

体重 100g 当たりの肝臓重量は、NC 及び C 群と比べて O 群は有意に低くなった。盲腸重量は、NC 及び C 群よりも O 群は有意に高くなった。肝臓コレステロールレベルに有意な変化はなかったが、血漿コレステロールレベルは C 群と比べて O 群は有意に低くなった。肝臓 FXR の mRNA レベルは NC 群よりも O 群は有意に高くなった。肝臓の SREBP2 および HMG-CoA 還元酵素の mRNA レベルは、NC 及び C 群と比べて O 群は有意に高くなった。排泄された糞重量は、NC 及び C 群よりも O 群は有意に高くなった。糞中ステロイド排泄量について、中性ステロイドレベルは NC 群と比べて O 群が有意に高くなったが、酸性ステロイドレベルには有意な差は認められなかった。

＜考察＞

本研究では、ラットにラード添加飼料を与えた条件で、Oligonol を経口投与した場合に、血漿コレステロールレベルが低くなることが明らかになった。これは、Oligonol の経口投与で糞中へのコレステロール排泄レベルが増大したことが影響したと考えられる。また、Oligonol の投与により肝臓のコレステロール合成に関する酵素の遺伝子発現が上昇したが、これは体内コレステロールの減少に伴うコレステロール恒常性維持機能が働いたためであると思われる。なお、肝臓のコレステロール異化に関する酵素の遺伝子発現に関しては現在検討中である。

polyphenol, obese, cholesterol

講演番号：3F22p02
講演日時、会場：3 月 28 日 14:11～ F 校舎 22 会場

グァーガム酵素分解物添加は飲料中の自由水を減少させ、腸管での水や陽イオン吸収を穏やかにする
Partially hydrolyzed guar gum decrease free-water in beverages and delay water and cation absorption in the intestine

○高橋 徹[1]、安川 然太[2]、森田 麻友美[2]、徳永 誠[2]、三ツ矢 隆之[2]、徳永 美希[1]([1]福岡女子大学、[2]太陽化学（株））
○ Toru TAKAHASHI[1], Zenta Yasukawa[2], Mayumi Morita[2], Makoto Tokunaga[2], Takayuki Mitsuya[2], Miki Tokunaga[1] ([1]Fukuoka Women's University, [2]Taiyo Kagaku Co., Ltd.)

【目的】水分補給は栄養素の補給、代謝物の排出などの生命活動にとって重要である。スポーツにおいてもパフォーマンスを維持向上させることが期待できるが、競技によっては水の補給を頻繁に行えないことが多い。また、高齢者は慢性的な脱水症状であることが多いとされるが、この場合も同様の課題がある。急激な水の吸収を抑えることで、体内への水の取り込みを緩やかに持続させ、課題の解決が期待できる。本研究では、体内への水の吸収速度を制御するために飲料中の自由水に着目した。自由水の制御にはグァーガム酵素分解物（商品名：サンファイバー、太陽化学㈱製、以下 PHGG）を用い、PHGG が消化管における水や陽イオンの吸収、分泌、および残留に与える影響を意識下の動物での試験を用いて明らかにすることを目的とした。

【方法】試験液の自由水は、磁気共鳴画像（MRI、Hitachi）を用いて測定した。水分吸収に関する動物試験は、蒸留水にミネラル混合物添加の有無と PHGG1％添加の有無を要因とした 2×2 の二元配置で、8 週齢 SD 系雄ラット 24 匹を用いた。ポリエチレングリコール 4000（PEG）2 g/L を各々添加し、試験液とした。24 時間絶食および 3 時間絶水した 8 週齢 SD 系雄ラットの胃に、各試験液 9 ml を経口ゾンデ経由で意識下で注入した。試験液は注入直前に恒温スターラーで加温し投与した。注入 8 分後に胃と小腸の内容物を採取した。PEG 濃度を基に胃や小腸での水や陽イオンの吸収や分泌などを計算した。グルコース濃度は酵素法、Li、Na、K、Mg イオン濃度はイオンクロマトグラフ（761 Compact IC、Metrohm）、浸透圧は氷点降下法浸透圧測定器（OM6020、アークレイ）を用いて測定した。

【結果】PHGG を添加した飲料は、無添加の飲料に比べて自由水が減少した。PHGG 添加は胃での水分泌量を増加させ（P=0.04）、小腸への流入水量を増加させるが（P=0.007）、小腸での残存水量を増加させ（P=0.01）、消化管内から消失した水の量を減少させた（P=0.01、Two-way ANOVA）ことから、水分吸収を緩やかにすることが示された。また、PHGG 添加は、小腸での Na イオン吸収量を緩やかにすることも示された（P=0.04）。樹木モデルによる分析の結果、消化管内から消失した水の量を緩やかにする最も大きな要因は、胃での水分泌量が多いことであることが示された。PHGG は飲料中の自由水を減少させることで、胃での水分泌量を増加させて、みかけの水吸収を遅くすることが示唆された。

Partially hydrolyzed guar gum, free water, ORS

講演番号：3F22p03
講演日時、会場：3 月 28 日 14:22～ F 校舎 22 会場

難消化性デキストリンの消化管内動態および長期摂取時の内臓脂肪量への影響

Gastrointestinal fate of resistant maltodextrin and its long-term effect on the visceral fat accumulation

○近藤 位旨[1]、鈴木 魁[2]、日野 真吾[1]、森田 達也[1]([1]静岡大院・農、[2]静岡大学・農)
○Takashi Kondo[1], Kai Suzuki[2], Shingo Hino[1], Tatsuya Morita[1] ([1]Shizuoka Univ., [2]Shizuoka University)

【目的】低カロリー食品素材として汎用されている難消化性デキストリン (ND) やポリデキストロース (PD) には, 整腸作用や糖および脂質の吸収抑制作用などが報告されている。現在, ND や PD の小腸消化率は食物繊維定量法 (酵素/HPLC 法) から推定されており, 生体位での小腸消化率は検討されていない。本試験では, 回-直腸吻合ラットおよび正常ラットを用いた出納試験から, ND と PD の消化管内動態 (小腸消化率と大腸発酵効率) を解析し, これら素材のカロリー値を推定すると同時に, 長期間摂取させたときの内臓脂肪蓄積量を推定カロリー値から考察した。
【方法】① 5 週齢の SD 系雄ラットに手術を施し, 回-直腸吻合ラットを作製した。試験はラット回復後に実施し, セルロースを 5%添加した対照飼料および対照飼料に ND または PD を 5%添加した飼料を 10 日間自由摂取させた (1 群 6 匹)。また, 0.1%ネオマイシン水溶液を飲料水として与えた。試験最終 3 日間に糞便を回収し, 酵素/HPLC 法により ND および PD の重合度 3 (DP3) 以上のいわゆる食物繊維画分 (DP ≧3) を測定し, 摂取量と糞便排泄量から ND および PD の小腸消化率あるいは *in vivo* 食物繊維量を算出した。② 8 週齢の SD 系雄ラットを用い (1 群 6 匹), 実験①と同様の飼料を 28 日間摂取させた。飼育 8~10 日目 (飼育期間や体重は可能な限り実験①に対応させた) に糞便を回収し, ①と同様に DP≧3 の回収率を測定し, 全消化管消化率を算出した。28 日目には絶食下で解剖し, 盲腸内容物有機酸濃度, 内臓脂肪量および, 肝臓, 血中脂質濃度を測定した。③ 標準飼料を 10 日間以上摂取した SD 系ラットの小腸から, 常法に従い小腸刷子縁膜画分を調製した。ND を酵素/HPLC 法に従い消化した後, 1/10 スケールとし, これにマルターゼ活性として 1000-4000 unit の小腸刷子縁膜画分を加え, 37℃で 16 時間反応させ, 残存する ND 量を分析した。
【結果・考察】*In vivo* での小腸回収率, すなわち食物繊維量は 57% (ND), 56% (PD)を (①), 消化管全体での回収率は 13% (ND), 36% (PD) を示した (②)。①と②から推定される大腸発酵効率は 77% (ND), 36% (PD)であった。正常ラットで 4 週間飼育した時の血中脂肪濃度に群間で差はなかったが, 内臓脂肪重量では PD でのみ対照に比べ有意な低下が観察された(②)。また, ND の短鎖脂肪酸および総有機酸濃度は, 対照および PD に比べ有意に高い値を示していた。刷子縁膜酵素処理により ND の食物繊維含量は酵素/HPLC 法に比べ, さらに 16%低下した(③)。以上から, ND や PD は *in vitro* 定量値 (酵素/HPLC 法) に比べ, *in vivo* ではさらに消化が進むと推定される。また, ラットでの出納試験結果から推定したカロリー値は, ND や PD を長期摂取した時の内臓脂肪量を反映する結果となった。

resistant maltodextrine

講演番号：3F22p04
講演日時、会場：3 月 28 日 14:33～ F 校舎 22 会場

イヌリン型フルクタン摂取時のラット盲腸ムチン濃度とムチン分解細菌の関連性
Relevance of Mucin Degrading Bacteria to Cecal Mucin Concentration in Rats Fed Inulin Type Fructan.

○伊藤 謙[1]、源田 知美[1]、近藤 位旨[1]、日野 真吾[1]、園山 慶[2]、福島 道広[3]、森田 達也[1]([1]静岡大院・農、[2]北大院・農、[3]帯畜大・食品科学)
○Yuzuru Ito[1], Tomomi Genda[1], Takashi Kondo[1], Shingo Hino[1], Kei Sonoyama[2], Michihiro Hukushima[3], Tatuya Morita[1] ([1]Shizuoka Univ., [2]Hokkaido Univ., [3]Obihirochikusan Univ.)

【目的】フルクタンの短期摂取は盲腸内容物のムチン濃度を上昇させるが，この作用は摂取期間の延長に伴い減弱する。ムチンは腸粘膜バリアの主成分で，*Akkermansia muciniphila* などのムチン分解細菌はこれを分解することから，腸粘膜の変容が関与する病態との関連性が示唆されている。一方，ムチン分子はその構成糖により中性，シアロおよびサルフォムチンに分類されるが，イヌリンの長期摂取は盲腸上皮のサルフォムチン陽性杯細胞の割合を増加させることが報告されている。本試験では，フルクタン摂取時のムチン分泌応答と糞ムシナーゼ活性および *A.muciniphila* との関連性を解析した。また，盲腸内容物ムチンの硫酸根およびシアル酸の分析と盲腸組織染色により，フルクタン摂取がムチン糖鎖に与える影響を解析した。**【方法】**6 週齢の Wistar 系雄ラットを用い (n=8) ，対照飼料，高重合度イヌリン (IN) またはフラクトオリゴ糖 (FOS) を 6%添加した飼料で 2 または 8 wk 飼育した。解剖前 3 日間の糞便を全量採取しムチン量を測定した。この間，新鮮便の一部はムシナーゼ活性の測定に供した。解剖時には，盲腸内容物のムチン量，pH ならびに有機酸濃度を測定した。盲腸組織は二分割し, 一方はムチン遺伝子発現量の測定に, 他方は組織染色に供した。**【結果・考察】**2wk の FOS, IN 群のムチン濃度は対照の 2 倍以上で有意な高値を示した。8wk では，FOS 群のムチン濃度は対照と差がなかったが，IN 群は盲腸，糞ともに依然高値を維持していた。また，*Muc2* (分泌型ムチン種) 遺伝子発現量は 2，8wk ともに群間で差がなかった。2wk の糞ムシナーゼ活性は FOS，IN 群ともに対照の 1/4 程度まで有意に抑制されていたが，8wk では FOS 群でのみ有意な抑制が認められた。2, 8wk を通して糞ムシナーゼ活性は盲腸内容物の pH と高い相関を示した（$r=0.69$, $p<0.01$）。一方，*A. muciniphila* は 2wk の FOS，IN 群で顕著な増加を示したが，8wk では IN 群の糞でのみ有意な高値を示した。FOS および IN 摂取時の盲腸ムチン濃度の変動は，pH の低下によるムシナーゼ活性の抑制を介したものであり，*A. muciniphila* 自体の盲腸ムチン濃度への影響は小さいと考えられた。なお，8wk の FOS，IN 群では *Muc3* (膜結合型ムチン種) 遺伝子発現量が対照の 5 倍になるという興味深い結果が得られた。また，2wk の盲腸組織染色から，FOS，IN 群はクリプトカラムの伸長とともにサルフォムチン陽性杯細胞数が有意な増加を示し，一方，シアロムチン陽性杯細胞数は一定であった。*Gal3ST4* (硫酸基転移酵素) は 2, 8wk ともに対照と比較して IN 群で有意に低い値を示し, *Siat4C* は 2wk では FOS, IN 群で対照の 8 倍，8wk でも FOS 群は対照の 3 倍，IN 群で 8 倍の高値を示した。つまり，組織染色像は過去の報告に準ずる結果となったが，ムチン糖鎖修飾酵素の発現パターンは異なる変動を示した。

fructan, mucin, *Akkermansia muciniphila*

講演番号：3F22p05
講演日時、会場：3 月 28 日 14:44～ F 校舎 22 会場

イソマルトデキストリンによるラット大腸水素生成と腸内細菌叢の変化

Change in generation of colonic hydrogen and colonic microbiota by isomaltodextrin feeding in rats

○西村 直道、田邊 宏基、山本 達朗（名寄市大保健福祉）
○Naomichi NISHIMURA, Hiroki TANABE, Tatsuro YAMAMOTO (Nayoro City Univ.)

【目的】酸化ストレスの上昇や腸内細菌叢の構成変化(Firmicutes/Bacteroidetes(F/B)の変化等)はメタボリックシンドロームの発症に関与している。演者らはこれまでに難消化性糖質(NDS)由来の大腸 H_2 が、生体内で酸化ストレスを軽減することを明らかにした[1,2]。これは難消化性糖質による大腸 H_2 生成の亢進がメタボリックシンドロームの抑制につながることを示唆する。本研究では、デンプン由来の多分岐α-グルカンであるイソマルトデキストリン(IMD)を与えたラットの大腸 H_2 生成と腸内細菌叢の変動を他の難消化性糖質と比較した。

【方法】実験１：結合様式の異なるグルカンの H_2 生成と腸内細菌叢への影響を明らかにするため、ラットを 4 群に分け、コントロール(C)食、IMD 食、高アミロースデンプン (HAS)食、難消化性デキストリン (ID)食を 14 日間与えた。各 NDS の消化率（IMD, 70%; HAS, 52%; ID, 43%)を考慮し、大腸に飼料中の 5%量が供給されるよう NDS を飼料に添加した。**実験２**：H_2 生成と腸内細菌叢に対する IMD の用量依存性を明らかにするため、ラットを 5 群に分け、C 食、3.3～16.7%IMD 食を 14 日間与えた。**実験３**：IMD とフラクトオリゴ糖(FOS)の H_2 生成と腸内細菌叢に対する作用を比較するため、ラットを 3 群に分け、C 食、IMD 食、FOS 食を 14 日間与えた。実験 1 同様、大腸に飼料中の 5%の NDS 量が供給されるよう飼料に添加した。14 日間の(呼吸＋放屁)H_2 排出量を測定し、試験最終日に麻酔下で門脈および盲腸内容物を採取し、H_2 濃度、腸内細菌叢、盲腸内短鎖脂肪酸等を測定した。

【結果・結論】実験１：H_2 排出量の AUC_{0-14d} は、C 食群より ID 食群で最も高く、IMD 食群と HAS 食群の 2 倍だった。IMD 食群の F/B 比は C 食群と ID 食群より有意に低かった。C 食群に比べ、IMD 食群と HAS 食群の *Bifidobacterium* は有意に高く、ID 食群で変化はなかった。IMD の用量依存的に F/B 比は低下し、*Bifidobacterium* は増加した。**実験２**：H_2 排出量の AUC_{0-14d} と盲腸内酪酸濃度は IMD の用量に依存して高かった。**実験３**：H_2 排出量の AUC_{0-14d} は IMD 食群で C 食群の 66 倍、FOS 食群で 30 倍高かった。IMD 食群の盲腸内酪酸濃度は C 食群より有意に高く、FOS 食群で有意差はみられなかった。F/B 比は IMD 食群で C 食群の 0.05 倍、FOS 食群で 4.2 倍だった。*Bifidobacterium* は IMD 食群で C 食群の 500 倍、FOS 食群で 8100 倍高かった。*Bifidobacterium* 増殖刺激能は FOS より IMD で低いが、大腸 H_2 生成量は IMD の方が多いことがわかった。以上より、IMD は F/B 比を低下させ、大腸 H_2 生成促進能や *Bifidobacterium* 増殖刺激能を有するグルカン素材であることがわかった。

[1] Nishimura N et al, *Br J Nutr* **107**: 485-492 (2012); [2] Nishimura N et al, *J Nutr* **143**: 1943-1949 (2013)

isomaltodextrin, hydrogen, colon

講演番号：3F22p06
講演日時、会場：3 月 28 日 15:05～ F 校舎 22 会場

まるごと濃縮かきエキスによる消化管からのエタノール吸収抑制作用

The inhibitory effect of whole oyster extract on ethanol absorption from gastrointestine

○佐藤 敬、上野 栞、北村 整一、山口 和也、高垣 欣也（株式会社　東洋新薬）
○Kei Sato, Shiori Ueno, Seiichi Kitamura, Kazuya Yamaguchi, Kinya Takagaki (Toyoshinyaku)

【目的】牡蠣（かき）はタウリンや亜鉛、グリコーゲンを豊富に含有するほか、必須アミノ酸、不飽和脂肪酸を含有し、古くから滋養強壮作用を期待して食品として用いられてきた。近年、牡蠣に関して抗疲労作用をはじめとして抗酸化作用、免疫賦活化作用、脂質代謝改善作用などが報告され、牡蠣の有する健康機能の側面が明らかにされている。牡蠣はタウリン、亜鉛、グリコーゲンを含有することから、肝機能亢進を期待して摂取されているがものの、これまで牡蠣と肝機能に関する報告例は少ない。そこで我々は高圧下で牡蠣肉を酵素分解したまるごと濃縮かきエキス（WOE）を用いてエタノール性肝障害およびエタノール代謝に対する有効性を検討した。
【方法】本試験検討では以下の 3 つの試験により行われたを実施した。＜試験1＞雄性Wistarラットに WOE を経口投与し、30 分後にエタノール（EtOH）を経口投与した。EtOH 投与後に血液を採取し、血中 EtOH 濃度、血中 GPT 値を測定した。＜試験 2＞雄性 Wistar ラットに WOE を 1 日 1 回、7 日間反復経口投与し、EtOH 経口投与後の肝臓細胞質中アルコール分解酵素（ADH）、肝臓ミトコンドリア中アセトアルデヒド分解酵素（ALDH）活性を測定した。＜試験 3＞雄性 Wistar ラットに WOE を経口投与し、30 分後に EtOH 腹腔内投与後の血中 EtOH 濃度を測定した。
【結果】＜試験 1＞WOE 投与により血中 EtOH 濃度の低下が認められ、さらに肝臓障害を示す血中 GPT 値は有意に低下した。＜試験 2＞WOE の 7 日間連続経口投与により、コントロールに比べて血中 EtOH 濃度の有意な低下がみられた。一方で、肝中 ADH および ALDH 活性は、WOE 投与で変動していなかった。＜試験 3＞WOE 投与による EtOH 腹腔内投与後の血中 EtOH 濃度の低下は認められなかった。
【考察】WOE は血中エタノール濃度上昇を有意に抑制したがものの、肝臓中 ADH、ALDH 活性を亢進させなかったこと、並びにエタノール腹腔内投与ではエタノール濃度抑制が認められなかったことから、WOE のエタノール濃度上昇抑制作用は消化管におけるエタノールの吸収阻害に起因することが示唆された。

Alchol absorption, oyster extract

講演番号：3F22p07
講演日時、会場：3 月 28 日 15:16～ F 校舎 22 会場

トマトがカルシウムの吸収効率に与える影響について

The effect of tomatoes on calcium absorption

○山本 侑、砂堀 諭、菅沼 大行（カゴメ株式会社研究開発本部）
○YU YAMAMOTO, SATOSHI SUNABORI, HIROYUKI SUGANUMA (Research & Development Division KAGOME CO.,LTD.)

【目的】

カルシウムは、骨粗鬆症およびロコモティブシンドローム予防の観点から、若年期から継続して十分な量を摂取する必要がある。摂取したカルシウムは主に小腸において吸収されるが、そのためにはカルシウムが小腸内で可溶化した状態で存在しなければならない。食事から摂取したカルシウムは、胃の中で胃酸により可溶化した状態となるが、その後、大部分が小腸内で食品中に含まれるリン酸やシュウ酸と塩を形成し、不溶化する。そのため、食事から摂取したカルシウムの吸収率は 20～40%程度しかない。トマトには、カルシウムとキレート錯体を形成し可溶化させるクエン酸等の成分が含まれている。そこで、カルシウムと一緒にトマトを摂取することで、小腸内でのカルシウムの可溶化が促進され、その結果、小腸におけるカルシウムの吸収効率が高まるという仮説を立てた。この仮説を検証するために、カルシウム標品（リン酸カルシウム）と一緒にトマトを投与することで、カルシウムの吸収効率が高まるか否かを動物で検証した。

【方法】

動物は 10 週齢 Wister ラットを用いた。予備飼育後、各群の平均体重が均一になるようにトマトジュース（TJ）投与群、リン酸カルシウム溶液投与群、リン酸カルシウム溶液＋TJ 投与群、リン酸カルシウム溶液＋クエン酸溶液投与群の 4 群に分けた。リン酸カルシウム溶液は、リン酸三カルシウムの 0.6%懸濁液とし、またクエン酸溶液におけるクエン酸濃度は、TJ 中のクエン酸濃度に合わせた。18 時間の絶食後、イソフルラン麻酔下で門脈にカニューレを挿入・固定した。カニューレより門脈血を採取した後に各群の被験物をゾンデで胃内投与し、投与 15 分後、30 分後、1 時間後における門脈血を経時的に採取し、門脈血中のカルシウム濃度を測定した。

【結果】

リン酸カルシウムを投与した全ての群において、投与後の門脈血中のカルシウム濃度の上昇が認められ、小腸からカルシウムが吸収されたことが確認された。また、リン酸カルシウム溶液＋TJ 投与群およびリン酸カルシウム溶液＋クエン酸溶液投与群において、リン酸カルシウム溶液投与群と比較し、投与後の門脈血中のカルシウム濃度の上昇量が有意に多かった。

以上の結果より、トマトと一緒にカルシウムを摂取することで、カルシウムの吸収効率が高まることが示唆された。

tomato, calcium

講演番号：3F22p08
講演日時、会場：3 月 28 日 15:27～ F 校舎 22 会場

黒大豆種皮抽出物の血管に対する作用

The effect on blood vessel of black soybean seed coat extract

○難波 文男、日下 里菜、戸田 登志也（フジッコ株式会社）
○Fumio NANBA, Rina KUSAKA, Toshiya TODA (Fujicco Co., Ltd.)

【背景と目的】黒大豆は様々な効能を有すると言われており、多くの漢方書には活血（血流改善）効果が記載されている。実際、黒大豆の煮汁の摂取により血流の促進、高血圧や狭心症が改善したという臨床報告もある。しかし、そのメカニズムについてはほとんどわかっていない。そこで本研究では黒大豆種皮抽出物（ＢＥ）の血管あるいは血流に対する作用とそのメカニズムについて検証することを目的とした。【方法】①血管内皮細胞の NO 産生に与える影響：ウシ大動脈内皮細胞を、ＢＥを添加したグルコース含有培地で培養した。培養後、培地上清中の NO 代謝産物量を測定し、リアルタイム PCR によって NOS（NO 合成酵素）遺伝子の発現量を測定した。②ヒトの NO 産生能に与える影響：健常な男女 20 名を対象に、ＢＥ100mg を一週間摂取させた。摂取前後での尿を採取し、尿中の NO 代謝産物量を測定した。③血管内皮細胞の Tie2 活性に与える影響:マウス pro-B 細胞(Ba/F3)に human Tie2 を過剰発現させた細胞（Ba/F3-human Tie2） を、ＢＥを含有する培地で培養し、細胞抽出液を SDS ゲルに電気泳動した。抗リン酸化-Tie2 抗体を用いてウェスタンブロットを行ない、バンド強度を測定した。④ヒトの下肢部のむくみに与える影響：むくみを自覚する女性 20 名を対象に、単盲検でクロスオーバーの投与試験を行なった。試験食としてはＢＥ100mg、プラセボ食としてはデキストリンを用い、試験日の正午～１３時の間に摂取させた。試験日の朝 9 時と夕方 17 時に下肢部の体積をアクリル水槽を用いて測定した。【結果】①ＢＥを添加することで、培地上清中の NO 代謝産物量が増加し、NOS 遺伝子の発現が上昇した。このことから、ＢＥは内皮細胞の NO 合成能を遺伝子レベルで上昇させることがわかった。②20 名中 15 名の尿中 NO 代謝産物濃度が摂取前と比較して上昇し、統計的に有意な差が確認された。このことから、ＢＥの NO 産生促進作用はヒトにおいても有効であることが確認された。③ウェスタンブロットにかけた結果、ＢＥを添加した細胞でリン酸化型 Tie2 が検出され、ＢＥは Tie2 を活性化する作用を有することが示された。④ＢＥを摂取した場合、朝から夕方にかけての下肢部体積の増加量（むくみ）がプラセボと比較して有意に抑制された。これらのことからＢＥは血管の細胞に作用し Tie2 の活性化を介して、むくみを抑制または改善する可能性が示唆された。

Black soybean, Tie2, edema

講演番号：3F22p09
講演日時、会場：3 月 28 日 15:38～ F 校舎 22 会場

水溶性製剤化によるルテインの血中移行に及ぼす影響

Improvement of lutein absorption by water-soluble formulation

○小林 純也[1]、冨永 悦子[1]、宮崎 聡子[1]、黒野 昌洋[1]、小関 誠[1]、大久保 勉[1]、仲川 清隆[2]、宮澤 陽夫[2] ([1]太陽化学株式会社、[2]東北大院農　機能分子解析)
○Junya KOBAYASHI[1], Etsuko TOMINAGA[1], Satoko MIYAZAKI[1], Masahiro KURONO[1], Makoto OZEKI[1], Tsutomu OKUBO[1], Kiyotaka NAKAGAWA[2], Teruo MIYAZAWA[2] ([1]Taiyo Kagaku Co. Ltd., [2]Tohoku Univ.)

【背景・目的】カロテノイドの吸収効率は他の脂溶性食品成分に比べて低いことが知られている。これはカロテノイドの持つ高い疎水性と常温で固体という特徴から、分散性が低下するためと考えられている。よってカロテノイドの溶解度（水への分散性）を制御することで生体利用性の向上が期待される。ここでは加齢黄斑変性（aged-related macular degeneration:AMD）の予防効果が期待されているカロテノイドであるルテインに注目し、開発した水溶化ルテイン製剤を用いて、ラットへの投与試験を行い、その血中移行への影響を検証した。
【方法】水溶性ルテインはグリセリン、ルテイン、乳化剤、酸化防止剤を用いて作製した。投与試験は SD 系雄ラット（11 週齢）を 5 匹ずつの 2 群に分けて行なった。2 週間の予備飼育、24 時間の絶食の後、水溶性ルテインまたは通常ルテインを経口ゾンデにより単回投与した。投与サンプルはルテインとして 15 mg/kg となるように、それぞれ水または油（MCT）に分散させた後に投与した。投与前と投与 1、2，4，6，24 時間後に採血を行い、血漿中のルテイン濃度を HPLC により測定した。
【結果・考察】絶食後のラット血漿中ではルテインは検出限界以下であり、ほとんど存在しないと考えられた。通常ルテインを投与しても血漿中のルテイン濃度は最大で 2 pmol/ml 程度であり、ルテインの血漿中への移行はほとんど認められなかった。しかし、水溶性ルテインの投与の場合、投与 1 時間後で血漿中でのルテインを検出でき、投与 6 時間後でルテイン濃度は 45.3 pmol/ml まで上昇した。また摂取 24 時間後でも 2.8 pmol/ml のルテインを検出した。よってラットにおいて水溶性ルテインは投与後 1 時間以内に血中に移行し、6 時間程度で最大となり、その後減少して、24 時間後まで検出されることが分かった。この結果から、水溶性化技術はルテインの吸収性を向上できることが示唆された。また現在ヒトにおいても水溶化製剤による吸収性試験を進行させており、この結果についての報告も予定している。

Absorption, Lutein, Formulation

講演番号：3F22p10
講演日時、会場：3 月 28 日 15:49～ F 校舎 22 会場

朝食時のリコピン吸収における摂食及び明暗リズムの影響の解明

Impact of feeding and light-dark rhythms on bioavailability of lycopene consumed at breakfast

○吉田 和敬[1]、小堀 暁美[1]、西田 由香[2]、加藤 秀夫[2]、砂堀 諭[1]、菅沼 大行[1]([1]カゴメ（株） 研究開発本部、[2]県立広島大 人間文化)
○Kazutaka YOSHIDA[1], Akemi KOBORI[1], Yuka NISHIDA[2], Hideo KATO[2], Satoshi SUNABORI[1], Hiroyuki SUGANUMA[1] ([1]Res. & Devel. Div., Kagome Co. Ltd, [2]Fac. of Human Culture and Science, Prefectural Univ. Hiroshima)

【目的】我々はこれまでに、トマトの摂取時間帯とリコピンの吸収との関係について検討をおこない、朝にトマトを摂取することで、昼、夜にトマトを摂取した時と比べてリコピンの吸収速度が速くなり、吸収量も増えることを動物試験で見出してきた。このような1日の時間帯におけるリコピン吸収性の違いの原因として、主に明暗と食餌のリズムの影響が考えられる。そこで本試験では、そのどちらが朝食時のリコピン吸収に影響しているかを明らかにすることを目的として検討を行った。

【方法】9 週齢の Wistar 系雄ラットは 9:00～21:00 を暗期とした明暗サイクル下で1ケージ 5 匹ずつ飼育した。通常群の摂餌タイミングは 9:00、13:00、17:00 とし、9:00 に試験飼料（トマト粉末 10%含有高脂肪・高砂糖飼料）を、13:00 と 17:00 に通常飼料（高脂肪・高砂糖飼料）を1匹あたり 6g ずつになるよう、ケージ単位で与えた。遅朝食群は食事の時刻を 4 時間後ろにずらし、13:00 に試験飼料を、17:00 と 21:00 に通常飼料を与えた。遅夕食群は夕食の時間を遅くし、9:00 に試験飼料を、13:00 と 21:00 に通常飼料を与えた。通常飼料と試験飼料は、エネルギー量およびタンパク質、脂肪、糖質のエネルギー比が等しくなるように調製した。上記の飼育方法で 4 週間飼育後、8:00、12:00、16:00、20:00、24:00 に採血を行い、血中のリコピン濃度を HPLC により測定した。また、同時刻に小腸粘膜を採取し、時計遺伝子 Bmal1、及び小腸でのリコピン輸送を担う SR-B1 の遺伝子発現量を Real time PCR により測定した。

【結果】遅夕食群は通常群より試験飼料摂取後の血中リコピン濃度の上昇が小さかった。明暗周期は変えず、夕食の時間を遅くしただけで朝食後のリコピン吸収量が減少したことから、明暗ではなく食餌のリズムが朝食後のリコピン吸収に影響を与えていることが示唆された。一方、遅朝食群は血中リコピン濃度のピークが通常群と比較して4時間後ろにずれていた。また、小腸の Bmal1 や SR-B1 の発現リズムも血中リコピン濃度と同様、遅朝食群で4時間程度発現リズムが後ろにずれていた。このことから、食餌のリズムが小腸の遺伝子発現リズムに影響を与え、それがリコピンの吸収に影響を与えていることが示唆された。

【結論】明暗ではなく食餌のリズムが小腸の遺伝子発現リズムを形成することで、朝食時のリコピン吸収に影響を与えていることが示唆された。

lycopene, circadian rhythms, bioavailability

講演番号：3F22p11
講演日時、会場：3 月 28 日 16:10～ F 校舎 22 会場

Caco-2 細胞を用いた小腸上皮透過性に及ぼすリン脂質消化産物の影響評価

Effects of lysophospholipids on Caco-2 monolayer permeability as a model of human intestinal epithelium

○室田 佳恵子[1,2]、熊本 舜[2]、福嶋 伸之[1,2]、徳村 彰[3]（[1]近畿大・理工、[2]近畿大院・総合理工、[3]安田女子大・薬）
○Kaeko MUROTA[1,2], Shun KUMAMOTO[2], Nobuyuki FUKUSHIMA[1,2], Akira TOKUMURA[3] ([1]Fac. Sci. Eng., Kinki Univ., [2]Grad. Sch. Sci. Eng. Res., Kinki Univ., [3]Fac. Pharm., Yasuda Women's Univ.)

【目的】腸管上皮の細胞間透過性は、有害物質に対する防御や栄養素の吸収調節に重要な役割を果たしているが、その制御機構は複雑でありさまざまな食品因子による影響が報告されている。本研究では、血管透過性を変化させるなどの報告がある脂質メディエーターであり、リン脂質の一種であるリゾホスファチジルコリン（LPC）とリゾホスファチジン酸（LPA）に着目した。これらのうち特に LPC は消化により日常的に食事性レシチンから生じており、腸管上皮に対しては透過性亢進に働くことが報告されている。そこで Caco-2 細胞をヒト小腸上皮モデルとして使用し、Caco-2 細胞層透過性に対する LPC と LPA の影響を比較した。
【方法】Transwell Plate 上で分化誘導させた Caco-2 細胞の apical 側へ、LPC（0.4 mM）を単独あるいは LPA（10 μM）と同時に添加し、経上皮電気抵抗（TER）値ならびに basolateral 側への Lucifer yellow の透過量を指標として細胞間透過性を評価するとともに、細胞内カルシウム濃度変化を調べた。リン脂質の Caco-2 細胞による代謝は、apical 側へ目的分子を添加し一定時間後に培地中に生じた消化産物を分析した。また RT-PCR を用いて LPA 受容体やリン脂質分解酵素の発現を調べた。
【結果・考察】Caco-2 細胞層の apical 側に LPC を添加すると、投与前に比べ有意な透過性の亢進がみられた。このとき細胞内カルシウム濃度の上昇が観察され、また ROCK 阻害剤の投与により減弱することが示唆された。一方 LPA の単独添加では 10 μM 添加時および LPC と同じ 0.4 mM を添加した場合でも TER 値は低下せず、コントロール群と同等以上の TER 値を示した。LPC と LPA の同時添加時には、LPC 単独添加時よりも透過性が抑制され、これは LPA 添加のタイミングには依存しなかった。このことから LPA は、LPC による透過性亢進作用とは別の経路で亢進した透過性を減弱させていることが示唆された。さらに、ホスファチジン酸（PA）の添加時にも LPA と同様の透過性亢進に対する減弱作用が観察された。Caco-2 細胞には PA-PLA2 酵素の発現がみられたことから、PA は本酵素により LPA へと変換されて効果を発揮したと考えられた。一方 LPC から LPA を生じる酵素である autotaxin（lysoPLD）の発現はみられず、LPC の細胞消化ではグリセロホスホコリンが生じた。以上のことから、食事性レシチンより生じる LPC には小腸上皮の透過性を亢進する作用がある一方、少量の LPA が消化により生ずることで過剰な透過性亢進は抑制されているのではないかと考えられた。Caco-2 細胞には LPA1、LPA2、LPA6 の 3 種の受容体の発現を見出しており、現在 LPA の作用機序について検討中である。

intestinal permeability, lysophosphatidylcholine, lysophosphatidic acid

講演番号：3F22p12
講演日時、会場：3 月 28 日 16:21～ F 校舎 22 会場

Caco-2 細胞単層膜におけるタイトジャンクションにおよぼすレクチンの影響

Effect of lectins on tight junctions in Caco-2 cell monolayers

根本 諒、永沼 孝子、小川 智久、○村本 光二（東北大院生命科）
Ryo Nemoto, Takako Naganuma, Tomohisa Ogawa, ○Koji Muramoto (Tohoku Univ.)

【目的】腸管上皮には有害物質を体内に侵入させないバリア機能と食品機能成分を吸収する透過機能の二面性がある。これらを制御している機構のひとつがタイトジャンクションであり、細胞間を密着させるように形成されたタンパク質複合体が開閉して細胞間隙の透過性を制御している。演者らは、食品などに含まれるいくつかのレクチンにはタイトジャンクションを開く作用があることを明らかにした。本研究では、腸管上皮の輸送系へのレクチンの作用機構をさらに詳しく解析するために、シロサケ未受精卵から単離した Lーラムノース結合特異性レクチン(CSL)に着目し、ヒト結腸ガン由来 Caco-2 細胞単層膜のタイトジャンクション機能に対する CSL3 の作用とその機構を調べることを目的とした。
【方法】Caco-2 細胞単層膜のタイトジャンクションの開閉へのレクチンの影響を経上皮電気抵抗(Trans Epithelial Resistance：TER)値を測定して調べた。細胞内のカルシウムイオン濃度を蛍光プローブ Fluo4-AM を用いて測定した。カバーガラス上で 18~21 日培養した Caco-2 細胞を CSL3 で 2 時間処理後に、洗浄、固定化後、抗βーアクチン抗体を加えた。さらに Alexa Fluor488 で蛍光標識した二次抗体を用いて、細胞骨格におけるβーアクチンを落射蛍光顕微鏡で観察した。
【結果】CSL3 は 2 時間で濃度依存的に TER 値を減少させ、その TER 値は 6 時間後までは維持された。次に、CSL3 処理 2 時間で TER 値が減少したことを確認後、CSL3 の特異糖である Lーラムノースを管腔側に投与したところ、投与 1 時間後に TER 値はコントロールの TER 値と同レベルまで回復した。CSL3 は濃度依存的に細胞内カルシウムイオン濃度を増加させたが、ラムノースを加えると 1 時間後には細胞内カルシウムイオン濃度の増加はみられなかった。レクチン未処理では明瞭なβーアクチンの蛍光が、CSL3 処理によって不鮮明となり、CSL 処理で細胞骨格が変化したことが分かった。また、CSL3 で 2 時間処理後にラムノースを加えて 1 時間後に観察をしたところ、βーアクチンが再度鮮明に染色された。分化した Caco-2 細胞に CSL3 を加えると TER 値が減少したことから、CSL3 にはタイトジャンクションを開く作用があることが確認できた。また、CSL3 存在下ではタイトジャンクションの開口は維持された。細胞内カルシウムイオン濃度や細胞骨格の変化から、CSL3 は細胞内カルシウムイオン濃度を増加させることで細胞骨格を変化させ、細胞骨格上に形成されたタイトジャンクションに影響を及ぼすと考えられる。

lectin, tight junction, Caco-2 cell

講演番号：3F22p13
講演日時、会場：3 月 28 日 16:32～ F 校舎 22 会場

蛍光マーカーを用いたゼブラフィッシュ胚の輸送機構解析

Analysis of the transport system of zebrafish embryos by using fluorescent markers

○大山 結香、後藤 優佳、小川 智久、村本 光二（東北大院・生命科）
○Yuka OYAMA, Yuuka GOTO, Tomohisa OGAWA, Koji MURAMOTO (Tohoku Univ.)

【背景・目的】モデル動物としてゼブラフィッシュ(*Danio rerio*)は、遺伝学や発生生物学などの幅広い研究分野で活用されている。さらに、胚および稚魚は透明であるため、顕微鏡下で観察することが可能である。また、発生初期のゼブラフィッシュ胚膜を様々な低分子化合物が透過するため、これら化合物の毒性や変異原性の試験にも用いられている。胚膜には ABC トランスポーターの存在が知られているが、その他の輸送機構についての知見は少ない。本研究では、輸送経路既知の蛍光マーカーを用いて発生初期の胚におけるトランスポーターの働きを調べることを目的とした。

【方法】ゼブラフィッシュは自然交配により受精・産卵させて回収し、胚培地に移した。受精後 6、9、12 時間(以下 hpf と表記)の胚を 10 個/グループとし、細胞間隙経路 Lucifer Yellow (LY)、モノカルボン酸輸送経路 Fluorescein (FL)、P-糖タンパク質輸送経路 Rhodamine123 (RH)で、それぞれ輸送されることが知られている蛍光マーカー(1.0 μg/mL) を含む胚培地で 10、30、60 分間、28℃でインキュベートした。胚を 3 回洗浄して胚表面に付着した蛍光試薬を除き、低張性溶解緩衝液中でホモジネートを調製した。8,000 rpm、5 分間遠心分離し、上清を蛍光強度測定、または蛍光 HPLC 分析に供した。濃度既知の蛍光マーカー溶液を用いて検量線を作成し、胚 1 個あたりの蛍光マーカー取り込み量を算出した。

【結果・考察】LY と RH の取り込み量は経時的に増加し、どちらも 12 hpf 胚における 60 分間処理で 1.20 ng/胚、0.48 ng/胚の最大値を示した。また 12 hpf までは、発生の進行に伴い取り込み量が増加した。一方、FL の取り込みは処理時間、hpf に関わらず 0.1 ng/胚 以下であった。上清を HPLC 分析したところ、それぞれの蛍光マーカーは単一ピークとして検出され、LY と RH の取り込み量は経時的に増加し、12 hpf、または 9 hpf における 60 分間処理で最大値 1.64 ng/胚、1.20 ng/胚 であった。また、FL の取り込みも経時的に増加する傾向にあったが、最大値は 9 hpf における 60 分間処理の 0.04 ng/胚であった。以上の結果から、ゼブラフィッシュ胚には複数の選択的透過輸送経路があり、それらは蛍光強度測定および蛍光 HPLC による測定法で評価できることが示された。

zebrafish, fluorescent marker, membrane transport

講演番号：3F22p14
講演日時、会場：3 月 28 日 16:43～ F 校舎 22 会場

大豆イソフラボンの腸管輸送因子の探索

Investigation of an intestinal transporter for soy isoflavones.

○鈴木 千尋[1]、安岡 顕人[2]、近藤 隆[2]、石井 剛志[3]、阿部 啓子[1,2]、小林 彰子[1]([1]東大院農、[2]KAST、[3]静県大食品)
○CHIHIRO SUZUKI[1], AKIHITO YASUOKA[2], TAKASHI KONDO[2], TSUYOSHI ISHI[3], KEIKO ABE[1,2], SHOKO KOBAYASHI[1] ([1]Grad. Sch. Agri. Life Sci., UTokyo, [2]KAST, [3]Univ. of Shizuoka)

【目的】大豆イソフラボンの主要な成分であるダイゼインは、腸内細菌によりエクオールに代謝される。エクオールは親物質であるダイゼインよりもエストロゲン活性が高く、抗酸化能も他のイソフラボン類に比べて高い。一方、大豆イソフラボンの小腸での吸収機構についてはほとんど明らかにされておらず、機能性と安全性に関する知見は確立されていないと言える。本研究ではダイゼインおよびエクオールの消化管内における挙動を *in vitro* および *ex vivo* の系で検討し、吸収機構や吸収動態を明らかにすることを目的とした。
【方法】ヒト結腸癌由来 Caco-2 で作製した小腸上皮様単層膜を用いて、ダイゼインおよびエクオールの透過試験を行った。また、9 週齢雄性 SD ラットの小腸を摘出し、反転腸管法により、これらのイソフラボンの吸収試験を行い、小腸における部位別の吸収性を比較した。さらに反転腸管法において、これらイソフラボンの吸収性で有意な差が認められた部位からそれぞれ小腸上皮のタンパク質を抽出し、ダイゼインおよびエクオール結合セファロースビーズを用いて、これらのビーズに結合するタンパク質を SDS-PAGE で比較した。
【結果】ダイゼインは Caco-2 単層膜において、吸収方向（管腔側から基底膜側）および排出方向（基底膜側から管腔側）の透過速度に差はなかったが、エクオールは排出方向よりも吸収方向の透過速度が高く、吸収方向に受動拡散以外の輸送経路が存在する可能性が示唆された。ラットの反転腸管法においては、ダイゼインおよびエクオールは共に、小腸下部である回腸周辺における吸収性が高いことが明らかになった。さらに、結合ビーズによる検討により、小腸下部においてダイゼインおよびエクオールに特異的に結合するタンパク質の存在が示唆された。ダイゼインからエクオールへの代謝は小腸では下部を中心に行われており、ダイゼインの経口摂取時にはエクオールが回腸末端部に多く分布していることなどから（Raewyn C., *Mol. Nutr. Foor Res.* 2009)、本研究でみられた下部で積極的に吸収が行われている現象は妥当な結果であると考えられた。現在、RNA-seq 法によるトランスクリプトミクスを実施し、小腸上皮の部位別に発現する遺伝子を網羅的に比較することにより、吸収性の差異に関与する因子を探っている。

本研究の一部は，総合科学技術・イノベーション会議の SIP（戦略的イノベーション創造プログラム）「次世代農林水産業創造技術」によって実施された。

isoflavone, intestinal permeability, transcriptomics

講演番号：3F22p15
講演日時、会場：3 月 28 日 16:54～ F 校舎 22 会場

安定同位体を用いたラット大腸管腔内プトレッシンの吸収及び組織への分布に関する研究

A study on absorption and tissue distribution of colonic luminal putrescine in rats by using stable isotope.

○中村 篤央、松本 光晴（協同乳業・技術開発）
○Atsuo Nakamura, Mitsuharu Matsumoto (Research Laboratories, Kyodo Milk Industry Co., Ltd.)

【背景および目的】ポリアミンは、核酸の合成や安定化、細胞の増殖や分化など多くの生理活性を有している低分子の塩基性物質である。哺乳類においてはputrescine(Put)、spermidine(Spd)、spermine（Spm）が主要なポリアミンであり、生体内ではPut→Spd→Spmの順で生合成される。ポリアミンは、オートファジーの誘導を介した線虫やショウジョウバエでの寿命伸長効果や、老年病の主要因である慢性炎症の抑制作用、老化と関連が深い異常メチル化の抑制作用を有していることから、健康寿命との関連性が注目されている。我々も腸内細菌叢により産生される大腸管腔内のポリアミン濃度上昇が、腸管バリア機能を充実させ炎症性サイトカインの誘導を抑制することにより、マウスにおける老化を遅らせることを報告して来た。また、大腸管腔内のPut濃度を増加させる物質としてarginine(Arg)を見出し、昨年、安定同位体ラベル化Argを用い、腸内細菌叢がArgからPutを産生することを報告した。本研究では、大腸管腔内のPutが大腸のみならず全身に影響を与えている可能性を探るため、大腸管腔内Putの吸収と血中及び組織への移行について明らかにすることを目的とした。
【方法】20 時間絶食させた雄性 Crj:CD（SD）ラットを isoflurane 麻酔下で開腹し、安定同位体ラベル化 $^{15}N_2$1,4diaminobutane-2HCl（98 atom %）を 27G の注射針を用い大腸管腔内に 0.66mg/kg weight 注入した。サンプリング箇所は、大腸、肝臓、腎臓、心臓血とし、サンプリング時間は、予備試験にて最も Put の濃度が高くなることが認められた注入 10 分後とした。組織はビーズを用いて破砕、心臓血は超音波を用いて処理した後、trichloroacetic acid にて除たんぱくを行いポリアミンを抽出した。得られたポリアミンは、ethyl chloroformate および trifluoroacetic anhydride による誘導体化を行い、ガスクロマトグラフィー質量分析装置にて濃度及び同位体比を測定した。
【結果および考察】大腸、肝臓、腎臓、心臓血すべてにおいて安定同位体でラベル化された Put が検出された。また、すべての組織、心臓血において安定同位体ラベル化 Put 由来と考えられる m/z +2 の Spd および Spm は天然存在比率以上には検出されなかった。以上より、大腸管腔内の Put は大腸組織より吸収され血流に入り、肝臓、腎臓に到達していることが確認され、大腸組織のみならず全身にその生理活性を波及させる可能性が示唆された。Put から Spd、Spm への生合成は確認できなかったが、これは若いラットを使用していた為、生体細胞内で十分なポリアミン合成が行われており、外因性のポリアミンに依存していなかった可能性が考えられる。

Polyamine, Stable isotope, Intestinal microbiota

講演番号：3F22p16
講演日時、会場：3 月 28 日 17:15～ F 校舎 22 会場

解毒代謝酵素の発現を誘導するゲニステインの作用機構解析

The mechanism of action of genistein that regulates detoxification enzymes

○大前 佑介[1]、戸塚 護[1]、清水 誠[2]、薩 秀夫[3] ([1]東大院・農生科、[2]東農大・応用生物科学・栄養科学、[3]前橋工大・工・生物工学)

○Yusuke Omae[1], mamoru Totsuka[1], makoto shimizu[2], hideo satsu[3] ([1]Grad. Sch. of Agric. and Life Sci., Univ. of Tokyo, [2]Dept of Nutri. Sci., Tokyo University of Agriculture Department of Nutritional Science, [3]Dept. of Biotech., Maebashi Institute of Technology Department of Biotechnology)

【背景と目的】

腸管は体内にありながら食品中に混入する外来異物に最もさらされやすい器官であるため、異物に対して様々な防御機構を発達させている。その 1 つに第一相～第三相からなる解毒代謝系があり、外来異物を酸化・抱合化して体外に排出することが知られている。我々はこれまでに、大豆イソフラボンの 1 つであるゲニステインが腸管上皮細胞において解毒代謝酵素の遺伝子発現及びタンパク質発現を亢進すること、また PXR や AhR といった核内受容体を介した転写活性を亢進することを明らかにしてきた。そこで、本研究ではゲニステインが解毒代謝酵素発現に働く際の作用メカニズムについて検討することとした。

【方法及び結果】

核内受容体である PXR は活性化されると核内へ移行することが知られているため、まずゲニステインが PXR の核内移行へ与える影響を検討することとした。腸管上皮モデル細胞である LS180 細胞にゲニステインを添加し、6 時間後に細胞の核画分を回収し、PXR のタンパク質発現量を Western blotting 法を用いて測定した。その結果、ゲニステインの添加によって核画分中の PXR タンパク質発現量は増加することが示され、実際に核内へ移行することが確認された。次に、ゲニステインが直接 PXR のリガンドとなっているかを検討するため、epoxy-activated sepharose ビーズにゲニステインを結合させたゲニステイン結合ビーズを作成し、LS180 細胞の whole cell lysate を用いて pull down assay を行った。その結果、ゲニステイン結合ビーズに PXR がトラップされることが明らかとなり、ゲニステインが PXR のリガンドであることが示唆された。

現在 PXR のリガンドバインディングドメイン (LBD)、及び LBD に変異を入れたリコンビナントタンパク質を作成し、ゲニステインとの直接的な相互作用を pull down assay を用いて検討を進めている。

genistein, intestinal epithelium, PXR

講演番号：3F22p17
講演日時、会場：3 月 28 日 17:26～ F 校舎 22 会場

ガーリック由来香気成分の抗血栓作用の解明

The effect of flavor compounds derived from garlic on thrombus formation

○矢口 真実、細野 崇、関 泰一郎（日本大院生資科）
○Manami Yaguchi, Takashi Hosono, Taiichiro Seki (Nihon Univ. Grad School)

【目的】我が国における血栓性疾患による死亡者数の総計は、がんによる死亡者数に匹敵し、予防法の確立が急務とされている。心筋梗塞などのアテローム性動脈硬化を基盤とした血栓性疾患は、外因系凝固の開始因子 Tissue Factor (TF) が起点となって発症する。また、TF 活性は Cys^{186} と Cys^{209} のアロステリックジスルフィド結合によって制御されている。ガーリックは抗血栓作用、抗炎症作用など様々な薬理作用を有することが報告されており、これらの作用にはガーリック由来のスルフィド類が重要な役割を果たしている。本研究では diallyl tirsulfide (DATS) をはじめとしたスルフィド類の抗血栓作用をフィブリンクロットアッセイにより評価し、さらにその作用メカニズムについて TF を中心に明らかにしようとした。
【方法】ヒト急性前骨髄球性血病細胞株 HL60 に PMA を添加培養して TF 発現を誘導した。この TF 発現 HL60 に *N*-ethylmaleimide (NEM), DATS, diallyl disulfide (DADS), diallyl sulfide (DAS), dipropyl trisulfide (DPTS)もしくは control として 0.2% dimethyl sulfoxide (DMSO) を添加後、$HgCl_2$ を用いた酸化反応により TF を活性化した。これらにさらに血漿を添加してフィブリンクロット形成時間を測定し、TF を起点とした凝固活性を評価した。また、精製組換え TF を DTT で還元し、NEM もしくは DMSO を添加後 $HgCl_2$ で酸化処理し、SDS-PAGE によってジスルフィド結合の形成、－SH 基の修飾状態について検討した。
【結果】TF 発現 HL60 に-SH 保護剤である NEM を処理すると、クロット形成時間は延長した。精製 TF を NEM 処理すると $HgCl_2$ によるアロステリックジスルフィド結合の形成は抑制され、NEM による Cys 残基の修飾により TF の活性化が抑制されることが示唆された。DATS はクロット形成時間を延長したが DADS および DAS は影響を及ぼさなかった。また、DATS の飽和型アナログ DPTS もクロット形成時間を延長した。DATS は標的タンパク質分子の特定の Cys 残基を修飾することから、TF のアロステリックジスルフィド結合の形成阻害によってクロット形成を抑制すること、Cys 残基との反応にはスルフィド分子中の硫黄原子の数が重要であることが示唆された。
【結論】DATS は外因系凝固を阻害し、血栓形成を抑制する可能性が明らかになった。

Tissue Factor, Garlic, Thrombosis

講演番号：3F22p18
講演日時、会場：3 月 28 日 17:37～ F 校舎 22 会場

高知県産ウバユリ（*Cardiocrinum cordatum*）が有するアンジオテンシン I 変換酵素阻害物質の単離と同定

Isolation and Identification of the Angiotensin I Converting Enzyme Inhibitor Found in Heartleaf Lily (*Cardiocrinum cordatum*) Collected in Kochi

○森本 ゆかり[1]、岡川 綺華[1]、松尾 茜[1]、陳 新陽[1]、柏木 丈拡[1]、金 哲史[1]、渡邊 高志[2]、渡邊 浩幸[3]、篠原 速都[4]、川北 浩久[4]、島村 智子[1]、受田 浩之[1]（[1]高知大農、[2]高知工科大環境理工、[3]高知県立大健康栄養、[4]高知工技セ）

○Yukari MORIMOTO[1], Ayaka OKAGAWA[1], Akane MATSUO[1], Xingyang CHEN[1], Takehiro KASHIWAGI[1], Chul-sa KIM[1], Takashi WATANABE[2], Hiroyuki WATANABE[3], Hayato SHINOHARA[4], Hirohisa KAWAKITA[4], Tomoko SHIMAMURA[1], Hiroyuki UKEDA[1] ([1]Kochi University, [2]Kochi University of Technology, [3]University of Kochi, [4]Kochi Prefectural Industrial Technology Center)

【目的】複雑な地形を有する高知県には亜熱帯地域から亜寒帯地域に分布するとされている多種多様な植物が自生している。これら未利用植物の有効利用を目的として、アンジオテンシン I 変換酵素(ACE) 阻害活性を指標にスクリーニングを行ったところ、ウバユリ（*Cardiocrinum cordatum*）水抽出液に強い ACE 阻害があることを見出した。本種はユリ科ウバユリ属の一回繁殖型多年草で、関東地方以西の本州、四国、九州に分布している。このウバユリに食習慣があることから、日常的に摂取することで血圧上昇の抑制が可能な食材の開発を目指し、ウバユリが持つ ACE 阻害活性成分の単離・同定を試みた。

【方法】乾燥したウバユリ 200 g を水で抽出し、濃縮乾固後、1.0 g 当量/mL に定容したものをウバユリ水抽出液とした。ウバユリ水抽出液中の ACE 阻害活性は ODS 中圧カラムクロマトグラフィー、NH_2 中圧カラムクロマトグラフィー、逆相系 HPLC、順相系 HPLC で順次分画し、追求した。ACE 阻害活性は ACE Assay Kit-WST (同仁化学研究所製) を用いて、各濃度における阻害率で評価した。

【結果及び考察】ウバユリ水抽出液の ACE 阻害活性を測定した結果、高い ACE 阻害活性（5.0 mg 当量/mL: 65.7%）が認められた。ODS 中圧カラムクロマトグラフィーにより分画した結果、この活性は ODS 水溶出部に局在することが明らかとなった（50 mg 当量/mL: 87.9%)。活性のあった ODS 水溶出部を NH_2 樹脂中圧カラムクロマトグラフィーで分画した結果、70% CH_3CN/H_2O 画分及び 80% CH_3CN/H_2O 画分に活性が認められた。さらに 80% CH_3CN/H_2O 画分を HPLC に供し、保持時間に従って 6 つのフラクションに分画したところ、複数の画分に活性が認められた。従って、ウバユリが示す ACE 阻害活性には複数の成分が関与していることが明らかとなった。活性に関与する化合物の構造を明らかにするために、活性の認められた画分を HPLC で分画し、単一のピークで比較的高い活性画分から化合物 A (400 mg 当量/mL: 45.7%) を単離した。この化合物を各種機器分析に供したところ、化合物 A はサイクリトールの一種である *myo*-inositol と同定された。定量を行った結果、ウバユリ 1.0 g 当たり *myo*-inositol は 0.46 mg 含まれていることが明らかとなった。

Angiotensin I Converting Enzyme Inhibitor, *Cardiocrinum cordatum*, *myo*-inositol

講演番号：3F22p19
講演日時、会場：3 月 28 日 17:48～ F 校舎 22 会場

社会的敗北ストレス負荷がマウスの胆汁酸産生に及ぼす影響
Effect of social defeat stress on bile acids production in mice
○麻生 愛花[1]、一法師 克成[2]、山岸 直子[3]、守谷 直子[3]、青木（吉田） 綾子[3]、後藤 達彦[4]、豊田 淳[4]、山本（前田） 万里[2]、鈴木 チセ[1,3] ([1]東大院農生・応動科、[2]農研機構・食総研、[3]農研機構・畜草研、[4]茨城大農・生物生産科)
○Manaka Asou[1], Katunari Ippousi[2], Naoko Yamagisi[3], Naoko Moriya[3], Ayako Aoki-Yoshida[3], Tatuhiko Goto[4], Atushi Toyoda[4], Mari Yamamoto-Maeda[2], Chise Suzuki[1,3] ([1]Tokyo Univ., [2]NFRI, [3]NILGS, [4]Ivaraki.Univ)

【背景・目的】脳と腸管および腸内細菌は相互に影響し合っていると考えられている。私たちはこれまで社会的敗北ストレスがマウス腸管に及ぼす影響を解析してきた。盲腸内容物のメタボローム解析の結果、ストレスを負荷したマウスではコール酸が有意に増加していた。本研究ではマウスにストレスを与えた後に採材した糞便中の胆汁酸の解析を行い、ストレスが各種胆汁酸生成量に与える影響を明らかにする。

【方法】C57BL/6JJmsSlc (B6)マウス 13 頭をそれぞれ試験区 7 頭、対照区 6 頭に分け、試験区のマウスは 1 日目に 5 分間、一頭ずつ攻撃性の高い Slc:ICR (ICR)マウス一頭がいるケージに投入し ICR マウスからの攻撃に暴露することで社会的敗北ストレスをかけ、その後 2 頭のマウス間に小さな穴の空いた透明な仕切りを設置して 24 時間視覚的・嗅覚的ストレスを与えた。攻撃は 10 日間継続し、攻撃時間は一日毎に 30 秒ずつ短くし、10 日目は攻撃時間を 30 秒とした。終了したところで試験区、対照区の一晩分の糞を採材し、乾燥後、胆汁酸の抽出を行った。胆汁酸の抽出は、糞を一晩エタノールに浸漬した後、エタノール中、乳鉢乳棒で粉砕し内部標準としてノルデオキシコール酸 (500μM) を 50μl 加えた。遠心して上澄みだけを取り出し乾燥後、メタノールで溶解した。固相抽出カラムにより前処理を行ったものをメタノールで再溶解し、Hagio らの方法(Methods Mol Biol, 708:119-129(2011))に基づいて UPLC-MS により解析した。

【結果】12 種の胆汁酸を定量した結果、試験区マウスは対照区マウスよりもケノデオキシコール酸(CDCA)、リトコール酸(LCA)が増加傾向にあったが、有意な増加を示したのはデオキシコール酸(DCA)のみであった。CDCA は一次胆汁酸、DCA と LCA は二次胆汁酸に分類されるが、ストレスにより変化した腸内細菌叢の影響により二次胆汁酸の産生が増加したと考えられる。

bile, social defeat, feces

講演番号：3F22p20
講演日時、会場：3 月 28 日 17:59～ F 校舎 22 会場

小麦全粒粉の消化に伴うアルキルレゾルシノールの可溶化

Solubilization of alkylresorcinols by digestion of whole wheat flour

○牧田 美希[1]、福田 真人[1]、菊池 洋介[1]、福留 真一[1]、小竹 英一[2]、長尾 昭彦[2] ([1]日清製粉グループ本社・基礎研、[2]（独）農研機構・食総研)
○ Miki MAKITA[1], Masato FUKUDA[1], Yosuke KIKUCHI[1], Shinichi FUKUDOME[1], Eiichi KOTAKE[2], Akihiko NAGAO[2] ([1]Nisshin Seifun Group Inc., [2]NFRI, NARO)

【目的】

小麦の外皮に含まれるアルキルレゾルシノール（ARs）は長鎖アルキル基を有する疎水性物質であり、抗肥満作用、抗糖尿病作用等を有することが知られている（Oishi *et al.* J.Nutr. in press ）。この小麦 ARs の消化管内での可溶化率（バイオアクセシビリティ）を高めることが、小麦全粒粉食品の摂取による健康の維持・増進には重要であると考えられる。
そこで、小麦 ARs の生体内利用率向上を目的として, in vitro における消化性評価試験系を用いて小麦全粒粉の消化に伴う ARs の可溶化について検討を行った。

【方法】

微粉砕した小麦全粒粉および小麦ふすまに水（適量）および油脂を加えて 80℃で 30 分間加熱処理した。比較対照として粗粉砕群、油脂未添加群についても同様の処理を行った。その後、0.5%ペプシン溶液、次いで 0.4%パンクレアチン、2.5%胆汁酸抽出物溶液を添加して試験管内で模擬消化反応を行った。消化物の遠心上清画分の ARs 量を HPLC 分析し可溶化量を評価した。

【結果及び考察】

小麦全粒粉は微粉砕することで ARs 可溶化量が有意に増大した。また対粉 5%～35%の油脂添加によって可溶化量がさらに向上した。小麦ふすまについても同様の傾向を示した。
以上の結果から、穀粉の微粉砕と油脂添加の組み合わせによって小麦 ARs の可溶化が進み、生体内利用率向上につながる可能性が示唆された

alkylresorcinols, bioaccessibility, whole wheat flour

講演番号：3F26a01
講演日時、会場：3 月 28 日 09:00～ F 校舎 26 会場

機能性環状ジペプチドの一括分析法の確立とプーアル茶中含有量の定量把握

A new analytical method of cyclic dipeptides and quantitative confirmation of them from pu-erh tea.

○林 未季[1]、山本 憲司[1,2]、村上 由佳[3]、荒木 陽子[1]、柏木 丈拡[1]、島村 智子[1]、受田 浩之[1]（[1]高知大農、[2]サントリーグローバルイノベーションセンター（株）、[3]サントリービジネスエキスパート（株））
○Miki Hayashi[1], Kenji Yamamoto[1,2], Yuka Murakami[3], Yoko Araki[1], Takehiro Kashiwagi[1], Tomoko Shimamura[1], Hiroyuki Ukeda[1] ([1]Kochi Univ., [2]Suntory Global Innovation Center Limited, [3]Suntory Business Expert Limited)

【背景・目的】環状ジペプチドは、直鎖ジペプチドの N 末端および C 末端が脱水縮合したジケトピペラジン構造を基本骨格とし、タンパク質を構成する 20 種のアミノ酸の組合せで、D・L 体を区別しない場合、210 の種類が存在する。一部の環状ジペプチドは生体内でも存在し、また、発酵食品・焙焦食品などから検出されるという報告もある。特徴の一つとして、直鎖ペプチドにはないユニークな生理活性を有するという点が挙げられ、近年注目されている化合物群である。しかしながら、食品における機能性成分として環状ジペプチドに着目し、一括定量分析系を確立した報告はほとんどない。そこで本研究では、機能性成分として期待される 31 種の環状ジペプチドを選択し、それらの一括定量分析系の確立を目指した。また、立ち上げた分析系を用いて、微生物発酵茶であるプーアル茶中の環状ジペプチド含量の定量を行った。
【方法】分析対象とする環状ジペプチドとして、各種生理活性が期待されるものを中心に 31 種を選択した。茶葉材料としては中国で生産された微生物発酵茶のプーアル茶を選択した。乾燥茶葉 2 g に対して 200 g の熱湯を加え 10 分間撹拌して調製したものを茶葉抽出物とした。環状ジペプチドの分析には Waters Atlantis T3 (2.1 mm I.D.× 150 mm) カラム、溶媒に Acetonitrile と 0.1% Formic acid/water、LC-MS/MS 装置 (Waters 社製) を用いた。各環状ジペプチドの$[M+1]^+$をプリカーサーイオンとし、検出感度の良好なフラグメントイオンをプロダクトイオンとし、MRM で測定した。コリジョンガスにはアルゴンを用い、コーン電圧、コリジョンエネルギーを環状ジペプチドごとに検討した。また 31 種の環状ジペプチドを同時分析するため LC のグラジエント条件を決定した。確立した測定条件を用いて茶葉抽出物の定量分析を行った。
【結果】31 種の環状ジペプチドに対して、一括で定量分析を実施できる分析系を確立した。本分析系を用いて、プーアル茶中の環状ジペプチドの含有量を測定したところ、18 種の環状ジペプチドが含まれていることが明らかになった。今後は、環状ジペプチドの生成機構や各種生理活性に関する検討を進める予定である。

cyclic dipeptides, fermented tea, lc-ms/ms

講演番号：3F26a02
講演日時、会場：3 月 28 日 09:11～ F 校舎 26 会場

ショウガプリンの凝固メカニズムについて
milk clotting mechanism of ginger pudding
○西山 友貴、荒木 朋洋（東海大農）
○Yuki NISHIYAMA, Tomohiro ARAKI (Tokai Univ.)

【目的】牛乳にショウガ粗抽出液を加え，加熱すると凝固し，ショウガプリンになる．このショウガプリンが凝固する凝固メカニズムは，牛乳に含まれるタンパク質がショウガに含まれるシステインプロテアーゼにより分解され，凝固すると報告されている．牛乳に含まれるタンパク質の 80%はカゼインであり，κ-カゼインがα-カゼインやβ-カゼインを包み込むような構造をしている．一般的に牛乳の凝固作用はチーズが知られており，κ-カゼインの親水性のドメインにより維持されているが，切断されることによりミセルが崩壊し，凝固することが報告されている．植物由来プロテアーゼも同様のメカニズムで凝固していることが報告されている．しかし，実際のショウガプリンを使用して分析を行なわれた例は少ない．生乳中で同様なメカニズムで凝固しているのかを明らかにすることを目的として検討を行った．
【方法，結果】ショウガはおろし金を用いてホモゲナイズ後，ガーゼを用いて搾汁した．得られた溶液は遠心分離（12,000rpm，30 分間，4℃）し，上清をショウガ粗抽出液として用いた．牛乳はジャージー牛乳を使用した．凝固反応は，牛乳 1ml に対してショウガ粗抽出液 100μl を加え，撹拌後 60℃で 0-90 分間加熱した．それぞれ反応時間の異なるサンプルは SDS-PAGE 及び逆相 HPLC により分析を行った．SDS-PAGE により得られたタンパク質バンドは 6 つのメインバンドが確認された．得られたタンパク質バンドはκ-カゼインに相当するバンドが時間ごとに減少していることが確認された．このことから，κ-カゼインがショウガに含まれるシステインプロテアーゼにより切断され，牛乳が凝固したと考えられた．したがって，チーズと同様の反応メカニズムにより凝固していると考えられた．また，サンプルに等量の 5% TCA を加え，撹拌後，遠心分離（12,000rpm，5 分間，4℃）を行い，除タンパク質を行った．得られた，上清は逆相 HPLC により分析を行った．その結果，いくつかのピークが加熱時間ごとに増大していることが確認された．

ginger, milk, protease

講演番号：3F26a03
講演日時、会場：3 月 28 日 09:22～ F 校舎 26 会場

小麦粉から調製した酸可溶性画分中のω-グリアジンの製パン性に対する効果

Effect of omega-gliadin within acid-soluble fractions of flour on the beking quality

○岡 大貴[1]、野口 智弘[1]、高野 克己[2] ([1]東京農大応生・食加技セ、[2]東京農大応生・化学)
○Daiki OKA[1], Tomohiro Noguchi[1], Katsumi Takano[2] ([1]FPC, Fac. Biosci., Tokyo Univ. Agric., [2]Dept. Appl. Biol. Chem., Fac. Biosci. Tokyo Univ. Agric.)

【目的】

酸可溶性画分 (ASP) は製パン改良効果を示すが、その効果は品種によって異なり、その差異の詳細な要因は不明である。我々は、タンパク質含量が同程度の国内産小麦粉の製パン性の差異にω-グリアジン量比が関与することを報告[1)] した。また、ASP においても、ω-グリアジン量比が製パン性に関与することが示唆された[2)]。しかし、ASP にはグリアジン以外のタンパク質や酸化還元物質が含まれていることが考えられ、それらの作用も製パン性に関与することが推察される。そこで本報告では、ASP からグリアジンを分画し、そのグリアジンのω-グリアジン量比と製パン性との関係性について検討を行った。

【方法】

ASP には品種が異なる小麦粉より分画された 2 種 (ASP-A、-B) を用い、70%エタノールにてグリアジンを抽出 (G-A、-B) し、両者を用いて製パン試験を行った。小麦粉には強力粉 (カメリア、日清製粉社製) を用い、小麦粉に対し ASP 3%に相当する G-A、G-B を加えストレート法にてパンを調製した。パン比容積 (cm^3/g) は 3D 体積計測装置 (ASTEX 社製)、クラムの硬さは 50%圧縮時の荷重 (N) を圧縮型物性測定機 (インストロン社製) にて測定した。また、分画した両グリアジンを RP-HPLC (Inertsil WP300 C8) に供し、それぞれω-グリアジンの定量を行った。

【結果】

ASP 中のグリアジン含量は、製パン改良効果に優れる ASP-A では 54.8%、改良効果が乏しい ASP-B は 45.1%を示した。そこで、ASP-A から分画した G-A を 1.64% (ASP 3%に相当する量) およびその倍量 (3.28%) を添加し製パン試験を行ったところ、無添加ではパン比容積 (cm^3/g) は 5.74、硬さ (N) は 1.21 を示したのに対し、1.64%添加では 6.18、0.94、3.28%添加では 6.52、0.90 と添加量に従い製パン性が向上した。そこで、改良効果が乏しい ASP-B から分画した G-B も同様に 1.64%添加し、製パン試験を行ったところ、比容積は G-A 6.14 に対し、G-B では 5.99、硬さはそれぞれ 1.13、1.29 と、グリアジン量が同量であるにもかかわらず G-A の方が良好であった。そこで、両グリアジンの組成を比較したところ、製パン性に関与するω-グリアジン量 (%) が、G-A では 15.2±1.4 (±SD)、G-B では 11.8±1.1 を示した。

1) 日本食品科学工学会第 60 回大会講演要旨集, p73　2) 日本農芸化学会 2014 年度大会, 2B03p10

omega-gliadin, baking quality, acid-soluble-protein

講演番号：3F26a04
講演日時、会場：3 月 28 日 09:33～ F 校舎 26 会場

加熱および塩化マグネシウム添加が白ナタマメタンパク質に与える影響

Effect of heating and adding magnesium chloride on white sword bean protein.

○西澤 果穂[1]、竹中 康之[2]、升井 洋至[3]、有井 康博[3]([1]武庫女大院・生活環境、[2]神戸松陰大・人間科学、[3]武庫女大・生活環境)
○Kaho Nishizawa[1], Yasuyuki Takenaka[2], Hironori Masui[3], Yasuhiro Arii[3] ([1]Graduate School of Human Environmental Sciences, Mukogawa Women's Univ., [2]Kobe Shoin Women's Univ., [3]Mukogawa Women's Univ.)

【目的】白ナタマメは高温地域での作付けが好く、病害に強いという特長を示す。単位面積あたりの収穫量もダイズに匹敵する。また、脂質含量が少ない（ダイズ比約 17%）一方で、タンパク質含量は多い（ダイズ比約 74%）ので、タンパク質源として利用が可能であると期待している。しかしながら、加工食品に利用された例はほとんどない。また、食品科学的観点から白ナタマメのタンパク質について解析した報告もほとんどない。本研究では、豆乳の加工法を模倣し、白ナタマメのタンパク質を抽出する方法を確立する。また、加熱や $MgCl_2$ の添加が白ナタマメ抽出液中のタンパク質に与える影響を明らかにする。更に、熱および $MgCl_2$ 感受性タンパク質を探索する。
【方法】白ナタマメの乾燥豆を 20℃の水に 18 時間浸漬し、乾燥豆の 8 倍量の新たな水を加え、氷上でハンドブレンダーを用いて摩砕した。摩砕液を 100℃で 3 分間加熱後にさらしで搾出し、抽出液 A とした。また、摩砕液を加熱することなく、さらしで搾出し、抽出液 B とした。更に、抽出液 B を 100℃で 3 分間加熱後にさらしで搾出し、抽出液 C とした。抽出液 A、B および C のタンパク質濃度について、ウシ血清アルブミンを標準タンパク質として Bradford 法により測定した。次に、ナタマメタンパク質の加熱温度に対する安定性を調べるために、抽出液 B を用い、加熱温度を変化させて上清タンパク質の濃度と沈殿率を算出した。また、ナタマメタンパク質の $MgCl_2$ 感受性を明らかにするために、$MgCl_2$ を添加し、沈殿形成の有無を調べた。更に、加熱および $MgCl_2$ 添加によるタンパク質分子の挙動について、SDS 電気泳動を用いて検討した。
【結果】抽出液 B のタンパク質濃度が抽出液 A と C に比べて 10 倍以上高い結果となり、加熱することでタンパク質が凝集し、搾出により凝集物が失われることが分かった。抽出液 B を SDS 電気泳動に供した結果、ダイズとは異なる泳動パターンが示された。また、抽出液 B を加熱温度を変えて加熱すると、加熱温度の上昇に伴い、タンパク質濃度は低下し、沈殿率は上昇した。加熱温度が 90℃の時に抽出液中の約 90%のタンパク質が沈殿した。また、25℃、50℃、75℃で加熱した抽出液 B に $MgCl_2$ を添加すると、沈殿形成が促進され、タンパク質濃度は低下した。各条件における上清を SDS 電気泳動に供した結果、加熱温度 100℃ではほとんどのバンドが消失し、25℃、50℃、75℃では $MgCl_2$ 添加によって約 47 kDa のバンドが消失した。以上の結果からナタマメ抽出液中のタンパク質は 90℃以上の加熱によってほとんどが沈殿すること、ナタマメ抽出液中にも豆乳と同様に $MgCl_2$ によって沈殿するタンパク質が含まれることが分かった。

food material, protein precipitation, sword bean

講演番号：3F26a05
講演日時、会場：3 月 28 日 09:44～ F 校舎 26 会場

鶏卵貯蔵中における卵白塩基性様タンパク質（OVAX）の構造変化

Structural changes of the egg white basic protein(OVAX) during the storage of hen egg

○赤澤 隆志、小川 雅廣、早川 茂（香川大農）
○Takashi AKAZAWA, Masahiro OGAWA, Shigeru HAYAKAWA (Kagawa Univ.)

【目的】鶏卵白から、分子量約 50 kD・等電点 9.7 の塩基性タンパク質 chicken Basic Protein Large (cBPL)を当研究室で新たに単離精製した。この cBPL はプロテアーゼ阻害活性や抗菌活性などの生理活性を示さず、生理的役割は分かっていない。cBPL の部分アミノ酸配列は ovalbumin-related protein X（OVAX）の内部アミノ酸配列と一致したことから、cBPL は OVAX と推定される。さらに OVAX の全長アミノ酸配列はオボアルブミンと 61.6 %と高い相同性を示すことから、cBPL はオボアルブミンと類似した性質を持つことが予想される。オボアルブミンは鶏卵を長期貯蔵することによって、熱安定な S-オボアルブミンへと構造変化することが報告されている。また、S-オボアルブミンは人為的に高温でアルカリ処理することによっても生成されることが知られている。そこで本研究では、卵の貯蔵中やアルカリ処理によって cBPL がどのような挙動を示すのか検討した。
【方法および結果】（1）アルカリ処理実験：強陽イオン交換クロマトグラフィー（SP Sepharose）により精製した cBPL を炭酸緩衝液（pH 10）中で、55 ℃、12 時間インキュベートすることでアルカリ処理を行った。アルカリ処理した cBPL を、示差走査熱量計（micro-DSC）により測定したところ、未処理 cBPL のピーク（72 ℃）の他に新たに 94 ℃のピークが検出された。アルカリ処理後の cBPL をイオン交換クロマトグラフィーにかけたところ、酸性画分と塩基性画分の 2 つに分かれて溶出された。酸性画分と塩基性画分を SDS-PAGE にかけたところ、どちらも未処理 cBPL の分子量と同じ約 50 kD にバンドが見られた。両画分について、MALDI-TOF-MS/MS で部分アミノ酸配列を調べたところ、酸性画分、塩基性画分共に OVAX の内部アミノ酸配列と一致した。これらの事から、両画分はどちらも OVAX すなわち cBPL であることが考えられた。よって酸性画分を酸性型 cBPL、塩基性画分を塩基性型 cBPL とした。（2）卵の貯蔵実験：卵を 37 ℃（相対湿度 65 %）で約 1 か月貯蔵した。各貯蔵時間の卵の cBPL を分析した結果、貯蔵 0 日目(産卵日)では酸性型 cBPL と塩基性型 cBPL の比率は約 1：7.5 で、塩基性型 cBPL が多く存在していた。しかし、時間経過に伴い、酸性型 cBPL の割合が増加し、塩基性型 cBPL は減少していった。以上の事より、cBPL は卵白中に酸性型と塩基性型の両方で存在しており、貯蔵するにつれて塩基性型から酸性型へと構造転換されることが示唆された。

egg white protein, ovalbumin related protein x

講演番号：3F26a06
講演日時、会場：3 月 28 日 10:05～ F 校舎 26 会場

米胚乳酵素活性量を利用したコシヒカリ近縁品種の比較分析

Comparative analysis of Koshihikari closely cultivars using the rice endosperm enzyme activity

○辻井 良政、高野 克己（東京農大応生・化学）
○Yoshimasa TSUJII, Katsumi TAKANO (Dept.Appl.biol.chem.,Tokyo University of Agriculture)

【目的】

我々は，これまでに精白米中に澱粉分解酵素や細胞壁多糖分解酵素の活性量を検出および定量し，米飯食味や炊飯中の澱粉および細胞壁多糖部分分解物との関係について明らかにしてきた。本研究では，品種，産地および生産年の異なる精白米の各酵素活性量を定量し，得られた酵素活性量を変数としてケモメトリクス解析を行うことで，米胚乳酵素活性量の様相について新しい知見を得られたので報告する。

【試料および方法】

2006 年産はコシヒカリおよび形質の異なる 9 品種計 17 点、2007 年産はコシヒカリ、はえぬき、ひとめぼえおよびあきたこまちの 4 品種計 28 点、2008 年産はきらら397およびヒノヒカリを加えたに 6 品種計 48 点を分析した。各試料 0.5ｇに 10mMDTT を含む 20mMPIPES-NaOH 緩衝液(pH7.0)を 1.0ml 添加し浸漬(4℃、90min)後、マルチビーズショッカー(安井機械社製)にて破砕後同緩衝液を 200μl 添加して攪拌抽出(1,300rpm、4℃、60min)を行い、遠心分離(13,200rpm、4℃、20min)で得られた上澄液を 1.0ml に定量したものを粗酵素液とした。酵素活性の測定は，α および β-amylase，α-glucosidase，β-glucanase，β-galactosidase，α-mannosidase，β-xylanase 活性量を敏速に測定できる合成基質を用いて，高感度に定量した。得られた活性量を変数としてケモメトリックス解析を行った。

【結果】

米胚乳酵素活性は、2006 年産ではコヒシカリの β-galactosidase 活性量は 67.9～36.6U/g であり，変動係数（標準偏差／平均値)が 0.215 と最大となった。形質の異なる 9 品種を含めた場合、活性量は 79.4～33.0U/g であり変動係数が 0.260 とコシヒカリ群内よりも大きくなり、品種間差に比べるとコシヒカリの地域間差異は小さいと示唆された。これらの酵素活性量を変数として統計解析ソフト Pirouette(GL science)を用いて主成分分析を行うと，酵素活性量の様相は品種ごとに異なる分布を示し，品種の違いを反映していると考えられた。

2007 と 2008 年産のコシヒカリ近縁種間でも酵素活性量に差異があり、α および β -amylase，β-galactosidase 活性量の差異に明確な傾向があった。主成分分析の結果，品種ごとに分布し酵素活性量の様相が異なっていることがわかった。はえぬきは，コシヒカリに近い位置に近接して分布していた。しかし，きらら 397 は，コシヒカリから最も離れた位置に分布していた。以上，品種の特性を各糖質関連酵素活性量の様相で比較することができた。

Endosperm enzyme activity, Cultivars, Rice

講演番号：3F26a07
講演日時、会場：3 月 28 日 10:16～ F 校舎 26 会場

鶏肉中での高グルタミン酸生成におけるアスパルチルアミノペプチダーゼの寄与

Contribution of aspartylaminopeptidase to high-production of free glutamic acid in chicken meat

○大谷 彰、吉澤 瞳、股野 麻未、柏木 豊、前橋 健二 (東京農大院醸造)
○ Akira OHTANI, Hitomi YOSHIZAWA, Mami MATANO, Yutaka KASHIWAGI, Kenji MAEHASHI (Dept. Fermentation Sci. Technol. Tokyo Univ. Agriculture)

【目的】

鶏肉は、牛肉や豚肉に比べて熟成に伴う遊離アミノ酸の増加が大きく、これは鶏肉の呈味形成の特徴であることが知られている。演者らはこれまでの研究で鶏肉中にグルタミン酸を特異的に遊離させるアミノペプチダーゼの存在を見出し、精製して諸性質を明らかにした。さらに、本酵素をアスパルチルアミノペプチダーゼ（DNPEP）と同定し、大腸菌発現系にて組換えニワトリ DNPEP を作製し性質の検討を行った。しかし DNPEP は鶏肉に限らず牛肉他の食肉中に広く存在していると考えられており、鶏肉の高グルタミン酸生成能との関連は未だ明らかにされているとは言えない。鶏肉の高グルタミン酸含量に着目した調味料素材としての利用のためには、その生成機構に興味が持たれる。

そこで本研究では、鶏肉の加熱に伴うグルタミン酸生成において DNPEP がどのように寄与しているか明らかにすることを目的とし、鶏肉と牛肉について DNPEP の含量、及び性質の比較検討を行った。

【方法及び結果】

ニワトリ（ブロイラー、60 日齢）筋肉及び肝臓から RNA を抽出し、ニワトリ DNPEP cDNA をクローニングした。ウシ DNPEP については市販ウシ筋肉 cDNA より PCR にてウシ DNPEP cDNA をクローニングした。大腸菌 pET システムを用い、ニワトリ及びウシ由来組換え DNPEP をそれぞれヒスチジンタグ融合タンパク質として発現させ、菌体破砕液からアフィニティクロマトグラフィーにて精製を行った。得られたニワトリ及びウシ DNPEP について酵素的諸性質の比較を行った結果、ウシ DNPEP がアスパルチル-*p*ニトロアニリド(*p*NA)をよく分解したのに対しニワトリ DNPEP はグルタミル *p*NA に対して最も良く作用し、両 DNPEP の基質特異性は明らかに異なっていた。また、両 DNPEP に共通のエピトープを認識する抗体を用いてウェスタン解析を行い鶏肉と牛肉の DNPEP 含量を推定した。

chicken meat, aspartyl aminopeptidase, glutamic acid

講演番号：3F26a08
講演日時、会場：3 月 28 日 10:27～ F 校舎 26 会場

大豆品種間による GABA 生成量の違いに関する研究

Comparision of GABA Amount Producing each Soy Bean Variety.

○宮澤 拓巳[1]、金内 誠[1]、石田 光晴[1]、津志田 藤二郎[1]、長田 隆[2] ([1]宮城大食産、[2]トーアス株式会社)

○ TAKUMI MIYAZAWA[1], MAKOTO KANAUCHI[1], MITSUHARU ISHIDA[1], TOJIRO TSUSHIDA[1], TAKASHI OSADA[2] ([1]Miyagi Univ., [2]TOASU CO.)

【緒論】γ-アミノ酪酸(GABA)は、生体内の代謝物質として知られている。特に神経伝達物質として働くことにより、交感神経活動を抑制し血圧の上昇を抑えると報告されている。一方、GABA の生成においては米や大豆、乳酸菌などの微生物においても報告されており、特に米や大豆などの発芽時に生成されることが知られている。大豆の発芽プロテアーゼによって大豆タンパク質がアミノ酸に分解され、その中のグルタミン酸がグルタミン酸脱炭素酵素(GAD)によって GABA が生成される。国産大豆種子の GABA 含量は乾物大豆 100g 中に 7.4mg 含有されたのに対し、国産大豆の発芽後の大豆では 321.9mg まで上昇し、発芽によって約 43 倍増加した。これまで大豆における GABA の高生産について多くの報告はあったが大豆の品種間、系統の違いによる GABA 生成量や GAD の活性は明らかになっていない。そこで、本研究では GABA 生成の品種とその生成条件を検討するために、正確かつ簡易な酵素法で GABA 定量を行い、大豆の GAD の特性を明らかにし GABA 効果が期待される食品の開発に寄与することを目的とした。

【方法】国産主要大豆品種 17 種を用いた。これらそれぞれをは 30 分次亜塩素酸殺菌した後、浸漬 8 時間、水切り 16 時間、浸漬 24 時間を行い発芽させた。24 時間の浸漬終了後を発芽 1 日目とし、4 日目まで経時的にノギスを用いて芽の長さを測定し、また GABA の測定も行った。GABA の測定には GABA 分解酵素 GABase を使用し、反応によって生成される NADPH をマイクロプレートリーダーで測定し、各発芽大豆種子の GABA 生成量を比較した。

【結果及び考察】発芽時の GABA 生成は系統間で違いが見られた。比較対象とした国産大豆種子 17 種のうち、東山系大豆は早いタイミングで GABA 濃度のピークを迎えたが、十系、在来種の大豆は GABA 濃度のピークを迎えるのが遅かった。東山系大豆は芽の長さと GABA 濃度の間に相関が見られたが、十系、在来種には相関が見られなかった。この結果よりまず、東山系のオオツルから GAD を精製した。オオツルから精製した至適 pH は 6.0 であり植物であるスクウォッシュ、茶葉から精製された GAD の至適 pH はそれぞれ 5.8、6.0 と類似していた。一方、動物である人間、サルの脳から精製された GAD の至適 pH はそれぞれ 6.8、7.0 であり、植物に比べ至適 pH 高い結果となった。

soybeans, γ- aminobutyric acid, gultamate decarboxylase

講演番号：3F26a09
講演日時、会場：3 月 28 日 10:38～ F 校舎 26 会場

ヨーグルト酒中の GABA 生産機構の解析

Analysis of the production mechanism of GABA in yogurt liqueur

○田原 愛華、大島 敏久、大森 勇門（大工大工）
○Manaka TAHARA, Toshihisa OHSHIMA, Taketo OHMORI (Osaka Institute of Technology)

【目的】乳酸菌は多様な発酵食品の生産に寄与し，食材に様々な風味や栄養価を与えている．また，乳酸菌は種々の生理活性物質を生産することが知られており，その一つにγ-アミノ酪酸（GABA）がある．GABA は抑制性の神経伝達物質として機能しており，また経口摂取により，血圧降下作用やストレス低減作用を示すことが報告されている．これらの機能を食品に付加させることを目的とした GABA 含有食品の開発が進められており，その展開が注目されている．本研究では日本酒とヨーグルトをブレンドしたヨーグルト酒などの酒類の GABA 分析を行った. またそれらの酒類における GABA の生産機構について検討した.

【方法】ヨーグルト酒といくつかの酒類に含まれる GABA は超高速液体クロマトグラフィー（UPLC）により定量分析した．また，加熱処理されていないヨーグルト酒からは，乳酸菌を培養・単離し，分離した乳酸菌の同定を 16S rDNA の塩基配列の分析から行った．単離した乳酸菌については，GYP 液体培地やスキムミルク培地における GABA 生産の経時的変化を分析した．また GABA を高濃度生産する乳酸菌を用いて，実験的にヨーグルト酒を作製して GABA 生成性の経時的変化を分析した．

【結果・考察】先ず，市販の 25 種類の日本酒，焼酎，梅酒，ヨーグルト酒の GABA 分析を行った．その結果，GABA は焼酎には含まれないが，ほとんどの種類の日本酒とヨーグルト酒に含まれていることが分かった．またヨーグルト酒でも，九州地方で生産されている焼酎をベースとしたヨーグルト酒には GABA が含まれないこと，及びある酒造会社の日本酒とそれを原料にしたヨーグルト酒の解析ではヨーグルト酒とすることで，高濃度の GABA が含まれ，代わりに L-Glu 濃度が低くなることが明らかになった．このことは，単にヨーグルトを添加するだけでなく，日本酒中の L-Glu 含有量が GABA の高生産につながることを示唆している．そのことを確認する目的で GABA 含有量が最も高かったヨーグルト酒から乳酸菌を単離し，ヨーグルト酒を実際に製造し，その変換を分析した．すなわち GYP 培地，または L-Glu を添加した GYP 培地を用い，分離菌の中から培養液中への GABA 生産性の最も高い乳酸菌を選抜，スキムミルク培地を用いてヨーグルトを製造し，市販の日本酒と混合して，ヨーグルト酒を調製した．またその際，L-Glu を添加した日本酒を用い GABA 生産の経時変化を分析した．その結果，L-Glu の添加量と GABA 生産量に相関があること，また生産された GABA の顕著な減少が認められないことが分かった．これらの知見は，今後 GABA 含有酒を製造するうえで，有用である．

GABA, Lactic acid bacteria, Fermented food

講演番号：3F26a10
講演日時、会場：3 月 28 日 10:49～ F 校舎 26 会場

タウリンによる TXNIP 発現制御機構の解析

The study on the regulation of TXNIP expression by taurine

○嶋中 花[1]、権藤 祐輔[1]、戸塚 護[1]、清水 誠[2]、薩 秀夫[3] ([1]東大院・農生科、[2]東農大・応用生物科学・栄養科学、[3]前橋工大・工・生物工学)
○Hana Shimanaka[1], Yusuke Gondo[1], Mamoru Totsuka[1], Makoto Shimizu[2], Hideo Satsu[3] ([1]Grad. Sch. of Agric. and Life Sci, Univ. of Tokyo, [2]Dept. of Nutri. Sci., Tokyo University of Agriculture, [3]Dept. of Biotech., Maebashi Institute of Technology Department of Biotechnology)

【目的】遊離のアミノ酸の 1 つであるタウリンは、魚介類に多く含まれ、食品として摂取される。生体内に取り込まれたタウリンは各組織において抗酸化作用・抗炎症作用・浸透圧調節作用といった多彩な生理作用が知られているものの、その詳細な分子レベルでの作用機序についてはほとんど明らかとなっていない。演者らはこれまでヒト結腸ガン由来 Caco-2 細胞においてタウリンが thioredoxin interacting protein (TXNIP) の mRNA 発現量を顕著に誘導し、さらに転写活性レベルにおいても亢進することを見出した。さらに、タウリンによる TXNIP 転写活性の誘導には TXNIP プロモーター配列中の+143 / +256 領域が重要である可能性を報告してきた。本研究ではさらに、タウリンによる TXNIP mRNA 発現亢進機構の解明を主な目的として研究を進めた。
【方法】TXNIP プロモーター中のタウリン応答配列を同定するために、+122 / +256 領域を含むレポーターベクターを構築した。また+122 / +256 領域を 3 分割した配列(+122 /+178,+162 /+218,+211 / +256)、さらに+162 / +218 領域を 3 つに分割した配列(+174 / +191, +187 / +204, +200 / +218)をそれぞれ含むレポーターベクターを構築した。これらのベクターを Caco-2 細胞に遺伝子導入した後、タウリンを添加し 24 時間後にレポーターアッセイをおこない転写活性を調べた。
【結果】タウリンが TXNIP プロモーター部分配列を含むレポーターベクターに及ぼす影響を検討したところ、タウリン添加によって有意な転写活性の亢進がみられた。次に、+122/+178, +162/+218, +211/+256 のプロモーター配列について検討したところ、+162/+218 でのみ増加がみられた。さらに +174/+191, +187/204, +200/+218 のプロモーター配列についてそれぞれタウリンの応答を解析したところ、+200/+218 を含むベクターのみ有意なレポーター活性の増加がみられた。以上より、タウリンによる TXNIP 転写活性の亢進には、TXNIP プロモーター配列中の+200/+218 領域が重要であることが示された。

taurine, TXNIP, Caco-2

講演番号：3F26a11
講演日時、会場：3 月 28 日 11:10～ F 校舎 26 会場

グリセルアルデヒド由来後期段階生成物「GLAP」による RAGE を介した細胞毒性

RAGE mediated cytotoxicity of glyceraldehyde-derived advanced glycation end products, GLAP

○長谷川 俊樹[1]、藤野 峻行[1]、臼井 照幸[1,2]、渡辺 寛人[1]、早瀬 文孝[1] ([1]明治大農、[2]女子栄養大)
○ Toshiki HASEGAWA[1], Takayuki FUJINO[1], Teruyuki USUI[1,2], Hirohito WATANABE[1], Fumitaka HAYASE[1] ([1]Meiji Univ., [2]Kagawa Nutrition Univ.)

【目的】メイラード反応は、タンパク質などのアミノ化合物と、還元糖などのカルボニル化合物との間で起こる非酵素的褐変反応であり、Advanced glycation end products (AGEs) が生成する。グリセルアルデヒド（GLA）による修飾を受けたウシ血清アルブミンが神経グリア細胞の一種であるオリゴデンドロサイトに対して細胞死を誘導することから、GLA 由来の AGEs はアルツハイマーやパーキンソン病などの神経変性疾患などに関与することが推測される。前回、GLA 修飾タンパク質中に多く生成するピリジニウム型 AGE の GLAP が、単独でも細胞毒性を有することを報告した[1]。したがって、GLA 由来のメイラード反応生成物が、各種疾患の発症に密接に関与していることが示唆され、その作用機序の解明が望まれる。本研究では、GLA 修飾タンパク質および GLA 由来 AGEs を用いた細胞毒性試験を行い、細胞毒性の作用機序を解明することを目的とした。
【方法】GLA 修飾ウシ血清アルブミン（GLA-BSA）および GLA 由来 AGEs を用いて PC12 細胞（ラット褐色腫由来細胞株）に対する細胞毒性試験を行った。5×10^5 cells/ml の細胞培養液を 24well プレートに播種し、そこに GLA-BSA および各種 AGEs を添加した。72 時間培養後、一定量の細胞培養液を 0.4%トリパンブルー生理食塩水と等量混合した後、顕微鏡観察し生細胞数を血球計算板で測定した。また、GLA 由来メイラード反応生成物とともに、抗酸化剤（NAC）、活性酸素種関連酵素阻害剤 (Acetovanillone、Oxypurinol、Diclofenac、L-NAME）、MAPK 阻害剤（SB 203580、PD 098059）、抗 Receptor for AGE (RAGE) 抗体を添加し、細胞毒性への影響を測定した。
【結果】GLA-BSA を用いた細胞毒性試験の結果、濃度依存的な生細胞数の減少が確認された。また、GLA 由来の AGEs の GLAP に細胞毒性が確認された。GLA-BSA や GLAP とともに抗酸化剤および活性酸素種関連酵素阻害剤、MAPK 阻害剤を添加することにより、細胞毒性はスーパーオキシドおよび一酸化窒素による酸化ストレスが原因となり、p38 が活性化したことによることが明らかとなった。また、これらの細胞毒性は、抗 RAGE 中和抗体の添加により抑制されたことから、GLA-BSA による細胞毒性は AGEs の RAGE への結合により引き起こされるものであること、GLAP は遊離型の状態でも RAGE に認識されることが明らかとなった。

[1] 山岸理、臼井照幸、渡辺寛人、早瀬文孝　日本農芸化学会，2A15p14 (2013)

glycation, glyceraldehyde, RAGE

講演番号：3F26a12
講演日時、会場：3 月 28 日 11:21～ F 校舎 26 会場

アルギニンおよびアルギニン高含有ペプチドによる 膵腺房細胞 mTOR 活性化の作用機構解析

The mechanism of mTOR activation by arginine and arginine-rich peptide in pancreatic acinar cell

○吉田 和馬、原 博 (北大農)
○KAZUMA YOSHIDA, HIROSHI HARA (Hokkaido Univ.)

【目的】 食事たんぱく質摂取に応じて、大量の消化酵素を合成・外分泌する組織である膵腺房において、タンパク質翻訳促進因子である mammalian target of rapamycin (mTOR) が、アルギニン (Arg) により強く活性化されることを、ラットおよびラット膵腺房細胞株 AR42J において見いだした。これまでの研究で、Arg が細胞外から作用するか調べるため、Arg 高含有ペプチドである Protamine を用い検討したところ、強い mTOR 経路活性作用が見られた。しかし、Arg と Protamine が同じ機構で mTOR 経路を活性化しているかは明らかではない。本実験では Protamine 用量依存性と Arg との相加ないし相乗作用、およびこれらが作用する mTOR 上流因子を、AR42J を用いて探った。
【方法】 プレートに播種した AR42J を 48 時間 MEM 培地で培養、分化させた後、アミノ酸濃度を MEM 培地の 1/5 にした低アミノ酸培地で 2 時間培養した。その後、対照群 (低アミノ酸培地)、Arg 群 (4.5 mM) 、Protamine 群 (0.145 mM, 0.0725mM, 0.0362 mM)、および Arg(4.5 mM) +Protamine(0.145 mM, 0.0725mM, 0.0362 mM) 群に分け、30 分培養後に細胞を回収した。Western blot 法により、mTOR, S6K1, 4EBP1 リン酸化の程度を調べた。また、低アミノ酸培地で 1.5 時間培養したのち各種阻害剤 (PI3K 阻害剤: LY294002、mTOR 阻害剤: Rapamycin) を添加し、30 分後に対照群 (低アミノ酸培地)、Protamine 群(0.145 mM)、及び各種阻害剤添加群に分け、上記と同様に mTOR 経路のリン酸化を調べた。
【結果】 AR42J 細胞において、Protamine 添加濃度の上昇に伴い mTOR 経路リン酸化が増加し、0.145 mM 添加した際に Protamine による mTOR 経路リン酸化は最大活性を示した。また Protamine と Arg の同時添加により、全ての Protamine 濃度でさらにリン酸化が上昇した。Protamine の最大活性に対して Arg が付加作用を示したことから、Protamine は Arg と別経路で mTOR 経路を活性化させるという予想外の発見となった。また mTOR 上流因子 PI3K の阻害は、Protamine の mTOR 経路リン酸化に影響を与えず、Protamine は PI3K を介さないで mTOR 経路を活性化することがわかった。Protamine, Arg の他の細胞への作用なども合わせて報告する。

mTOR, Arginine, Protamine

講演番号：3F26a13
講演日時、会場：3 月 28 日 11:32～ F 校舎 26 会場

ペプシン可溶化エラスチンが脂肪細胞の分化及び脂肪蓄積に与える影響

Effects of pepsin-solubilized elastin on differentiation and lipid accumulation of adipocytes

○坂野 僚、好田 正、服部 誠（東京農工大学）
○RYO SAKANO, TADASHI YOSHIDA, MAKOTO HATTORI (Tokyo Univ. Agric. Tech.)

【目的】肥満とは、脂肪細胞に脂肪が過度に蓄積された状態であり、主に過食や運動不足に起因するエネルギー摂取、消費の不均衡により起こる。肥満の程度を表す指標として Body Mass Index（BMI）が用いられ、BMI の値の上昇と高血糖、脂質異常症などの疾患との関連性が示唆されている。脂肪細胞は、細胞内の脂肪滴に余剰なエネルギーをトリグリセリド（TG）の形で貯蔵することに加え、レプチンやアディポネクチン、腫瘍壊死因子（TNF）α といった生理活性物質を分泌する内分泌細胞としての役割を果たしている。脂肪細胞が TG を蓄積し大型化すると、これら生理活性物質の発現及び分泌が変化しインスリン抵抗性を惹起することが明らかになっている。これらの背景から、脂肪細胞の分化、脂肪の蓄積を制御することは重要である。エラスチンは大動脈、項靭帯、皮膚などの弾性繊維を構成する主要タンパク質であり、ペプシンにより加水分解することで疎水性のアミノ酸を多量に有するペプチドを得ることが出来る。以前より、疎水性のアミノ酸を有するペプチドが抗肥満活性を有することが示唆されている。これらの背景から本研究では、エラスチンのペプシン分解物(Pepsin-Solubilized Elastin: PSE）が脂肪細胞の分化、脂肪蓄積に与える影響を明らかにすることを目的とした。
【方法】PSE は、エラスチンとペプシンを重量比で 20 : 1 の割合で 0.5 M 酢酸中に混合し、39 ℃で撹拌することで調製した。得られた PSE を SDS-PAGE に供し、CBB 染色を行うことで、エラスチンの加水分解の進行の確認を行った。抗肥満活性は、マウス胎児由来の株化細胞である 3T3-L1 細胞に PSE を添加して 10 日間培養し、脂肪滴を Oil Red O で染色し、490 nm における吸光度を測定することで評価した。
【結果】エラスチンをペプシンで加水分解することで、PSE を得ることが出来た。また、PSE を添加して 3T3-L1 細胞を培養すると、490 nm における吸光度がコントロールと比較して有意に減少していた。細胞観察でも、コントロールと比較し、脂肪滴の量が減少していることが確認できた。
以上の結果から、PSE は脂肪細胞の分化、脂肪蓄積に対して抑制効果を有する可能性が示唆された。

Obesity, Pepsin-solubilized elastin, 3t3-l1

講演番号：3F26a14
講演日時、会場：3 月 28 日 11:43～ F 校舎 26 会場

コラーゲンペプチドによる骨格筋肥大効果について

Effect of collagen peptides on skeletal muscle hypertrophy

○坂本 知隆[1]、小川 真弘[1]、井上 直樹[2]、片岡 綾[2]、杉原 富人[2]、原田 直樹[1]、山地 亮一[1]([1]大阪府大院・生命環境、[2]新田ゼラチン（株））
○Tomotaka SAKAMOTO[1], Masahiro OGAWA[1], Naoki INOUE[2], Aya KATAOKA[2], Humihito SUGIHARA[2], Naoki HARADA[1], Ryoichi YAMAJI[1] ([1]Osaka Prefecture Univ. Life and Environmental Sciences, [2]Nitta Gelatin Inc.)

【目的】骨格筋は体重の約 40%、総エネルギー消費の約 50%を占める組織である。骨格筋量の減少（筋萎縮）は加齢や運動不足により引き起こされ、転倒・骨折のリスクを増大させるため、寝たきりの原因となる。コラーゲンペプチドは酸処理により抽出したゼラチンを酵素処理により加水分解することで、断片化したペプチドである。近年、コラーゲンペプチドは関節疾患や骨代謝を改善するといった報告がされているが、骨格筋における報告はほとんどない。そこで本研究では、コラーゲンペプチドの新たなターゲットとして骨格筋に注目し、コラーゲンペプチドの骨格筋量に及ぼす影響について検討することを目的とした。
【方法・結果】骨格筋は、筋芽細胞の融合により多核な筋管細胞に分化し、筋管細胞が成長して筋繊維となる。骨格筋量は筋線維のサイズに依存しており、筋線維においてタンパク質合成が亢進すると筋肥大し、タンパク質分解が亢進すると萎縮する。マウス筋芽細胞株である C2C12 細胞をコラーゲン由来のジペプチドおよびトリペプチド存在下で筋分化誘導を行ったところ、ヒドロキシプロリルグリシン（OG）存在下で骨格筋マーカータンパク質であるミオシン重鎖（MyHC）およびトロポミオシン（TM）の発現が増加したことから、我々は OG に注目した。OG は濃度依存的に MyHC および TM を増加させ、筋分化を亢進したが、OG の構成アミノ酸であるヒドロキシプロリンとグリシンの混合物（O+G）では影響が見られなかった。OG による筋肥大促進効果を検討するため、C2C12 細胞を OG または O+G 存在下で筋分化誘導し、MyHC 抗体を用いた蛍光免疫染色法により筋管細胞の短径を測定した。その結果、OG は濃度依存的に筋肥大を亢進したが、O+G は影響を及ぼさなかった。OG が筋肥大を促進したことから、タンパク質合成の主要な経路である mTOR 経路の関与について検討したところ、OG 存在下で mTOR の下流に位置する p70S6K のリン酸化の増加が見られた。次に、OG の細胞内への取り込みに関わる膜輸送体について検討したところ、C2C12 細胞および骨格筋組織ではペプチドヒスチジントランスポーター1（PHT1）の発現が高いことが判明した。そこで OG による p70S6K のリン酸化の亢進に PHT1 による OG の取り込みが関与しているのかについて検討した。PHT1 の基質の一つであるヒスチジン存在下で OG による p70S6K のリン酸化を検討したところ、ヒスチジンは濃度依存的に OG による p70S6K のリン酸化を阻害した。これらの結果から OG は PHT1 を介して細胞内に取り込まれ、筋分化を促進すること、また mTOR シグナルを介してタンパク質合成を促進して筋肥大を誘発することが示唆された。

skeletal muscle, collagen peptide, hypertrophy

講演番号：3F26a15
講演日時、会場：3 月 28 日 11:54～ F 校舎 26 会場

ex vivo 試験を用いた降圧ペプチドの組織 ACE 阻害特性の検討
Investigation of tissue ACE inhibitory property of antihypertensive peptide using *ex vivo* assay system
○小山 正浩、興津 翔、渡辺 旭、早崎 大輔、石田 竜也、中村 浩蔵 (信州大農)
○Masahiro KOYAMA, Sho OKITSU, Akira WATANABE, Daisuke HAYASAKI, Ryuya ISHIDA, Kozo NAKAMURA (Shinshu Univ.)

【目的】ソバスプラウト乳酸発酵物から単離された降圧ペプチドの降圧メカニズム検討のため，*in vitro*，*in vivo* および *ex vivo* 試験により単離ペプチドのアンジオテンシン I 変換酵素（ACE）阻害活性を評価した。単離ペプチドの *in vitro* ACE 阻害活性は弱く，IC_{50} 値は 0.69-56 mM であった。しかし，*in vitro* 活性は必ずしも降圧作用に反映されないという報告がある。そこで，*in vitro* 活性から予測された投与量（30-300 mg/kg）よりも低い 10 mg/kg 用量で単離ペプチドを高血圧自然発症ラット（SHR）へ単回経口投与し生体組織中の ACE 活性を *in vivo* 試験により調べたところ，有意な組織 ACE 阻害活性を示した。SHR 由来胸部大動脈を用いた *ex vivo* 試験においては *in vivo* 結果と相関性の高い結果が得られ，単離ペプチドのアンジオテンシン (Ang) II 由来血管収縮 50%抑制濃度 (EC_{50}) は 36.8-85.1 μM であった。得られた *ex vivo* および *in vivo* 結果は *in vitro* 結果と有意な相関を示さず，単離ペプチドの組織 ACE 阻害活性には ACE との結合力以外の要素が関与すると推測された。そこで本研究では，*ex vivo* 試験系を利用して単離ペプチドの生体組織における ACE 阻害特性を調査することを目的とした。

【方法】*ex vivo* 試験には，雄性 13 週齢 SHR 由来胸部大動脈から作製した血管内皮除去リング標本を用いた。リング標本は，栄養液を満たしたマグヌス実験装置にセットして平衡化させ，化学合成した単離ペプチドを栄養液に添加後，一定時間インキュベートした。この操作で血管組織と単離ペプチドを十分に相互作用させた。その後，基質として Ang I を添加した。生成 Ang II による血管収縮がプラトーに達した後，栄養液および血管組織を回収し，両者に含まれているペプチドを LC/MS により検出，定量した。

【結果】添加した単離ペプチドは，短時間のインキュベートでそのほとんどが栄養液中から消失していた。そこで，血管組織中の単離ペプチドおよび単離ペプチドのアミノ酸配列から推測されるフラグメントペプチドを定量した。その結果，血管組織ホモジネート中から添加した単離ペプチドに加えて，*in vitro* および *ex vivo* ACE 阻害活性を持つ複数のフラグメントペプチドが検出され，ACE を十分に阻害可能な組織中濃度に達していた。以上の結果から，*in vitro* 活性が弱くとも，ACE 阻害ペプチドおよび生体酵素により生成したフラグメントペプチドが生体組織へ蓄積することで効果的に組織 ACE を阻害できることが示唆された。

tissue ACE inhibition, accumulation into tissue, antihypertensive peptide

講演番号：3F26p02
講演日時、会場：3 月 28 日 14:11～ F 校舎 26 会場

植物の色はダイクロマティズムにより変化する　～サフラン・ライスは何故黄色いのか？～
Dichromatism changes plant colors. ~Why does saffron rice have yellow color?~
○笠島 一郎、佐々木 克友（農研機構・花き研究所）
○Ichiro KASAJIMA, Katsutomo SASAKI (NARO Inst. Floricultural Sci.)

植物の色相（hue）は食品や園芸植物の品質を決める基本的要素の一つであるが、植物体の色が様々に異なる原理は未だ良く分からない部分があり、解析事例も多くない。植物の色は複雑な物理化学的原理によって決定されているように思われ、そうした原理を明らかにしてゆく必要がある。パンプキン・シード・オイルの色相が溶液の厚さ（光路長）により変化する現象が 2007 年に報告されている。古くは、黄や緑の合成色素の色相が濃度により変化するとの記述も見られる。これらの例において、色素自体の分光学的性質（吸光係数スペクトル）は光路長や濃度により変化しないと考えられる。この一見不自然な**ダイクロマティズム**と呼ばれる現象はランバート・ベールの法則（$A = -\log(I/Io) = \varepsilon cl$）を可視光スペクトルに適用し、異なる光路長や濃度の同一色素溶液の透過スペクトルを色彩照合関数（Color Matching Function）により色座標に変換することで説明可能である。今回、我々は植物の葉（クロロフィル）や赤系のスパイス（カロテノイド）の色相がダイクロマティズムにより変化することを発見したので報告する。

茶色の枯葉や黄・赤の老化葉等は別にして、健康な状態の**植物の葉**は薄い黄緑色から濃い緑色まで一連の異なる色を持っている。物体の色は明度（lightness)、彩度（saturation)、色相（hue）の三要素により規定されるが、様々な植物の葉の色を見比べると明度と色相に一定の相関がある。即ち、明度が高い（明るい・薄い）色の葉は黄緑の色相を持ち、明度が低い（暗い・濃い）色の葉は緑の色相を持つ。これは、同一植物個体の若い葉と成熟した葉の比較でも同様である。実際に数種の植物の葉の色を色彩計で測定すると、明度と色相に明確な負の相関が認められた。ジメチルホルムアミドでクロロフィルを抽出し希釈系列の吸光度を測定すると、吸光係数スペクトルは濃度により変化しなかった。一方で、透過スペクトルの赤、緑、青色光の割合はクロロフィル濃度により変化していた。クロロフィルは短波長に大きな吸光ピーク、長波長に小さな吸光ピークを持つ。その結果、高濃度溶液は中波長の緑付近の色のみを透過するが、低濃度溶液は緑に加え赤付近の色を部分的に透過し、この差異が色相の変化をもたらす。カロテノイドにより赤・橙の色を示すパプリカ、唐辛子、ターメリック、サフランについても解析した。これらの色素は短波長にのみ吸光ピークを持っていた。この結果低濃度溶液は黄ないし橙であるが、高濃度になるに従い橙や赤に色が変化した。サフランは光学的色素濃度が最も高く、希釈により赤から黄へと色が変化した。**ラー油**の橙、**サフラン・ライス**の黄もダイクロマティズムによる。　Kasajima and Sasaki (in press) Color Research and Application

Beer-Lambert law, dichromatism, saffron

講演番号：3F26p03
講演日時、会場：3 月 28 日 14:22～ F 校舎 26 会場

赤ワインに含まれる高分子色素重合体の呈味

Sensory characterization of polymeric pigments in red wines

○久本 雅嗣、鈴木 淳平、斉藤 史恵、奥田 徹（山梨大・ワイン研）
○Masashi HISAMOTO, Junpei SUZUKI, Fumie SAITO, Tohru OKUDA (Enol. Vitic. Univ. Yamanashi)

【目的】赤ワインを長期熟成すると、高分子色素重合体は赤ワイン中の赤色色素成分の中で徐々に占める割合が多くなり、赤ワインの色調に大きく影響を及ぼしている。しかしながら、高分子色素重合体の詳細な生成機構やその化学構造と呈味との相関、さらにその呈味の質の評価については未だ不明な点が多い。本研究は、アントシアニン誘導体の中でも瓶内で熟成中に生成する高分子色素重合体について、化学構造とその呈味について明らかにすることを目的とした。

【方法】赤ワインは、山梨大学ワイン科学研究センターで製造し、15℃で 1.8 L のガラス瓶中に保存している Cabernet Sauvignon（CS）のワインを試験試料とした。高分子色素重合体は、2000 年から 2010 年に製造したワインを各種クロマトグラフィーで分離し、高分子色素重合体を得た。分画した高分子色素重合体の分子量の測定方法は、GPC（ゲル浸透クロマトグラフィー）分析を行った。カラムは、PLgel（5 μm, 100 Å, 300×7.5 mm, Agilent 社）を 2 本直列に接続して使用し、検量線から高分子色素重合体の分子量を算出した。高分子色素重合体の呈味の調べるために、味認識装置（TS-5000Z・インテリジェントセンサーテクノジー社）を用いた測定とヒトによる官能評価を行った。また、ヒトによる官能評価では、熟練のパネラーによって複数の高分子色素重合体の渋味の強弱だけでなく、渋味の質の評価も行った。

【結果】各製造年別で赤ワインから各種クロマトグラフィーによって高分子色素重合体を分離し、GPC を用いて分子量を測定した。その結果、高分子色素重合体の分子量は約 5,000～50,000 の間で分布し、高分子色素重合体の間で差があることが示唆された。味認識装置やヒトによる高分子色素重合体の呈味の評価は、両結果とも高分子色素重合体には渋味があり、分子量の大きいものほど渋味が強い傾向が認められた。また、ヒトによる官能評価では高分子色素重合体の分子量が同じ程度でも、化学構造の違いにより、渋味の質が異なることが示唆された。

wine, polymeric pigments

講演番号：3F26p04
講演日時、会場：3 月 28 日 14:33～ F 校舎 26 会場

アスコルビン酸によるアントシアニン色素退色に対する各種化合物の影響

Effect of various reagents on anthocyanin degradation by ascorbic acid

○野口 治子[1]、江崎 正信[2]、津久井 亜紀夫[1]、高野 克己[1]([1]東京農大応生・化学、[2]東京農大院農・農化)
○Haruko NOGUCHI[1], Masanobu EZAKI[2], Akio TSUKUI[1], Katsumi TAKANO[1] ([1]Fac. Biosci., Tokyo Univ. Agri., [2]Grad. Sch., Tokyo Univ. Agri.)

【目的】　アントシアニンを主体とする赤色の果実は、その鮮やかな色彩が好まれ、様々な加工品へと利用されている。加工過程において果実は破砕されさらに加熱や殺菌工程を経ることで赤色度は大きく減少する共に、保存中にも退色は進行する。アスコルビン酸は各種食品の酸化防止剤として用いられているが、果実のように多量のアスコルビン酸とアントシアニンが共存すると、アントシアニンの退色が促進することが知られており、果実加工品においては赤色を長期間保つことができず問題となっている。当グループでは、アスコルビン酸を豊富に含むカムカム果汁の色調保持について研究を行い、還元剤を添加すると色調が保持されることを見出した。そこで本研究では食品中アントシアニンの色調保持を目指し、アスコルビン酸によるアントシアニン退色に対する還元剤の効果について検討を行った。
【方法】　パッションフルーツ果皮（サマークイーン）に 5%ギ酸溶液を加えた抽出液を Sep-Pac C18 カートリッジ(Waters 社製)に供し、固相抽出したものをアントシアニン溶液として用いた。アントシアニンの赤色度は色彩色査計（コニカミノルタ製）を用いて Lab 法と 510nm における吸光度にて測定した。還元剤としてシステイン、グルタチオンとフェルラ酸を用いた。アントシアニンにアスコルビン酸(0.1、1.0、10mg/ml)またはデヒドロアスコルビン酸(0.1、1.0、10mg/ml)と還元剤(15μmol/ml)を添加し、溶液の赤色度の変化を経時的に測定した。さらにこの溶液に 1%のゲル化剤(三菱商事フードテック社製)を添加し、ゼリー状食品におけるアスコルビン酸による退色と還元剤添加による抑制効果を検証した。試料は 4℃および 20℃暗所にて保存した。
【結果】　アントシアニン溶液にアスコルビン酸を添加するとその赤色度は経時的に退色した。0 日目のアントシアニン溶液の赤色度を 100%とすると 45 日目には 65%に減少した。こグルタチオン添加においては 85%，システインおよびフェルラ酸では 75%となり、アントシアニンの退色は抑制された。同様に，デヒドロアスコルビン酸を添加においても経時的に赤色は退色した。これに還元剤を添加するとシステインおよびグルタチオン添加では 45 日目の赤色度が大幅に減少し、フェルラ酸でのみ退色抑制効果がみられた。さらに、ゲル化剤を含むゼリー状食品を用いて検証したところ，アスコルビン酸とデヒドロアスコルビン酸どちらの場合も同様の傾向を示したが、その退色速度は溶液に比べて緩やかであった。

Anthocyanin, Ascorbic acid, color degradation

講演番号：3F26p05
講演日時、会場：3 月 28 日 14:44～ F 校舎 26 会場

アスコルビン酸によるアントシアニン退色機構の推定

Estimate of the anthocyanin discoloration mechanism with ascorbic acid.

○江崎 正信[1]、野口 治子[2]、辻井 良政[2]、津久井 亜紀夫[2]、高野 克己[2]([1]東京農大院農・農化、[2]東京農大応生・化学)
○ Masanobu EZAKI[1], Haruko NOGUCHI[2], Yoshimasa TSUJII[2], Akio TSUKUI[2], Katsumi TAKANO[2] ([1]Agrichem., Agr., Grad. Sch., Tokyo Univ. Agric, [2]Dept. Appl. Biol., Fac. Biosci. Tokyo Univ. Agric.)

【目的】

アントシアニン（AN）は高濃度のアスコルビン酸(AA)存在下では急激に退色する。このため AN と高濃度の AA を含む果実加工品においてはその赤色を長期間保つことができない。そこで本研究では食品中 AN の色調保持を目指し、AA による AN 退色機構の解明するための基礎的研究を行っている。本報では、AN 分解を引き起こすとされてきた AA 酸化生成物であるモノデヒドロアスコルビン酸(MDHA)、H_2O_2の影響の検討を行った。

【方法】

AN はシアニジン 3-グルコシド主体とするパッションフルーツ果皮（サマークイーン）より調製した。AN の定量(シアニジン 3-グルコシド換算)は pH-differential 法（Subramani et al. 2002）にて測定した。AA およびデヒドロアスコルビン酸(DHA)の定量は、HPLC（TSKgel ODS-80 Ts(4.6mmI.D.×25cm)、0.1% TFA、測定波長 245nm）により測定した。DHA 定量においてはホモシステインによる還元処理を行った。

【結果】

AN 溶液に AA および DHA(10μmol)をそれぞれ添加したところ、7 日目（暗所、20℃）には無添加と比べて AA 添加では AN 量が約 18%、AA 量が約 15%減少した。DHA 添加においては AN 量が約 20%、DHA 量は約 63%減少した。AA の減少は保存中の酸化反応によるものであり，一般的に AA の酸化反応ではH_2O_2が発生することから、AA(0.1, 1.0, 10.0 μmol)とH_2O_2(0.1μmol)が共存した際の AN 分解について検討した。その結果、H_2O_2 のみ添加した試料（6 時間保存）の AN 量が約 17%減少したのに対し、AA(0.1,1.0μmol)+ H_2O_2(0.1μmol) 添加では AN 量がそれぞれ約 18、24%減少とほぼ同様の減少率であった。しかし、AA(10μmol) + H_2O_2(0.1μmol) 添加では AN 量が約 53%と大きく減少した。

また、DHA をシステインにて還元して MDHA を調製し、AN に対する影響について検討した。すなわち AN と DHA(10μmol)を含むサンプルにシステイン(1μmol)を添加したところ、添加により AN 量が約 40%減少した。

Anthocyanin, Ascorbic acid

講演番号：3F26p06
講演日時、会場：3 月 28 日 15:05～ F 校舎 26 会場

界面活性剤によるクロロフィルのミセル化と光退色に対する効果

Effects on the micellization and the light-decoloration of chlorophyll by surfactant

○安田 みどり[1]、田端 正明[2] ([1]西九州大健栄、[2]佐賀大学理工)
○Midori YASUDA[1], Masaaki TABATA[2] ([1]Nishikyushu Univ., [2]Saga Univ.)

【目的】脂溶性の緑色色素であるクロロフィルは、光により低分子化合物に分解され、退色することが知られている。近年、ペットボトル入りの緑茶飲料の消費量が増加しているが、無色透明の容器であるため、光による退色が著しい。これまでの研究により、クロロフィルは溶媒（水-メタノール）の組成の違いにより凝集状態に変化がみられること、特に、水溶液中でクロロフィルは凝集体を形成し、光によるダメージを軽減できることが分かった。本研究では、水溶液中でクロロフィルの光による退色を防止することを目的として、界面活性剤を用いてクロロフィルの凝集状態を調べ、それが光に対してどのような影響を及ぼすかについて検討を行った。

【方法】クロロフィルは、クロロフィル-a を用い、0.1％界面活性剤水溶液(Triton X-100、10 mM Tris 緩衝溶液、pH7.5）に溶解した。これを用いて、異なる濃度の界面活性剤のクロロフィル溶液（最終濃度：1×10^{-5} M）を調製した。さらに、それぞれのクロロフィル溶液について可視光吸光スペクトル、蛍光スペクトル（Ex:430 nm、Em:300-800 nm)、円偏光二色性（CD）スペクトルを測定し、クロロフィルの凝集状態の違いを調べた。また、表面張力計にて、溶液中のミセル状態について調べた。光に対するクロロフィルの変化を調べるため、クロロフィル溶液に UV（365 nm）を照射し、その後の蛍光強度を測定し、クロロフィルの残存率を求めた。

【結果】クロロフィル溶液の可視光吸光スペクトルを測定した結果、743 nm と 669 nm にピークが検出された。界面活性剤の濃度が高いほど 743 nm の吸光度が低くなり、669 nm の吸光度が高くなったことから、クロロフィルのオリゴマー（凝集体）が減少し、モノマー（単分子）が多く形成されることが分かった。蛍光スペクトルや CD スペクトルの結果からも、界面活性剤の濃度増大とともにクロロフィルのモノマーの形成が増大することが確認された。また、表面張力の測定結果から、界面活性剤の濃度が 0.02%以上で急に表面張力が減少していることから、それ以下の濃度でオリゴマーのミセルが形成しているのではないかと考えられる。つまり、界面活性剤の濃度が高まるとともにクロロフィルは、よりモノマー状態のミセルになりやすくなることが明らかとなった。また、クロロフィルの光による退色作用について調べたところ、モノマーよりもできるだけオリゴマーである方が光に安定であることが示唆された。

chlorophyll, micelle, surfactant

講演番号:3F26p07
講演日時、会場:3 月 28 日 15:16～ F 校舎 26 会場

システイン・グルコース系メイラード反応溶液からの新規色素ピロロチアゾレート (pyrrolothiazolate) の単離、同定と生成条件について

Isolation, Identification and Formation of a Novel Maillard Pigment, Pyrrolothiazolate, from Cysteine-Glucose Model Solution

○野田 響子[1]、山田 眞二[2]、村田 容常[1] ([1]お茶大院ライフ・食品栄養、[2]お茶大院理・化学)
○Kyoko NODA[1], Shinji YAMADA[2], Masatsune MURATA[1] ([1]Department of Nutrition and Food Science, Ochanomizu Univ., [2]Department of Chemistry, Ochanomizu Univ.)

【目的】本研究室において、醤油中のメイラード反応低分子色素化合物として、2,4-ジヒドロキシ-2,5-ジメチル-3(*2H*)-チオフェノン (DHDMT) を同定し、システインを用いたモデル系によりその生成条件を明らかにしている。DHDMT は、メイラード反応中にシステインから遊離した硫化水素と、糖の加水分解物が反応して生成すると考えられている (1)。しかし、システイン系メイラード反応により生成する色素化合物の報告はほとんどない。そこで本研究では、システイン・グルコースのモデル反応溶液を用い、新たなメイラード色素を探索した。その結果、ピロロチアゾレート (pyrrolothiazolate) と命名した新規なメイラード反応生成物を見出したので、その単離、同定及び生成条件について報告する。
【方法】各反応溶液(システイン・グルコース、リジン・グルコース、システイン・リジン・グルコースを 0.5 M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) に溶解し、110 °C、3 時間加熱)を DAD-HPLC(カラム、ODS; 溶離液、MeOH・0.1 % AcOH 水溶液系; 検出、220-500 nm)で分析し、色素を探索した。精製においては、0.1 M システイン、0.03 M リジン、0.5 M グルコースを 0.5 M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) に溶解後、120 °C、3 時間加熱した反応溶液 (1.2 L) を用いた。反応溶液を酢酸エチルで洗浄後、水層を pH 2 以下に調整し、酢酸エチルで抽出した。抽出液を濃縮後、シリカゲルクロマトグラフィー(ジクロロメタン・酢酸系)ならびに分取 HPLC(ODS)により単離し、淡黄色の粉末約 76 mg を得、NMR と MS に供した。さらに本粉末を少量のメタノールに溶解後冷暗所に放置し、結晶を得、X 線構造解析に供した。
【結果】システイン・グルコース系反応溶液を DAD-HPLC 分析した結果、400 nm でモニターした時、DHDMT 以外に顕著なピークを認めた。本ピーク (N360) は 305 と 360 nm に極大吸収を示した。反応液にリジンを加えると、より顕著な N360 のピークを認めた。得られた物質の構造解析の結果、本物質を 6-ヒドロキシ-5[*S*],7α[*S*]-ジメチル-7-オキソ-2,3-ジヒドロピロール[2,1-b]チアゾール-3-カルボン酸と同定した。本物質はピロロチアゾールのカルボン酸誘導体で、ピロロチアゾレート (pyrrolothiazolate) と命名した。UV-Vis 吸収スペクトルは、酸性・中性溶液では 305 (ε=4000) と 360 nm (ε=6200) に、塩基性溶液では 320 (ε=2400) と 390 nm (ε=4400) に極大吸収を示した。ピロロチアゾレートはシステインとグルコースより生成するが、リジンの存在により生成量が 2 倍以上増加した。酢酸緩衝液では pH 6 付近、リン酸緩衝液では pH 6.5 付近で生成が最大となった。110℃で加熱した場合、生成は 2 時間で最大となり、加熱を続けると緩やかに減少した。

(1) *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **75**, 1240-1244 (2011); *Food Funct.*, **4**, 1076-1081 (2013)

cysteine, Maillard reaction, browning

講演番号：3F26p08
講演日時、会場：3 月 28 日 15:27～ F 校舎 26 会場

キシロース・リジン系メイラード反応における 4-ヒドロキシ-5-メチル-3(*2H*)-フラノン（HMFO）経由の褐変機構の提唱

A Suggestion of a Browning Mechanism via 4-Hydroxy-5-Methyl-3(*2H*)-Furanone in Xylose-Lysine Maillard Reaction

○見上 葉子[1]、山田 眞二[2]、村田 容常[1] ([1]お茶大院ライフ・食品栄養、[2]お茶大院理・化学)
○Yoko MIKAMI[1], Shinji YAMADA[2], Masatsune MURATA[1] ([1]Department of Nutrition and Food Science, Ochanomizu Univ., [2]Department of Chemistry, Ochanomizu Univ.)

【背景及び目的】キシロース・リジン系メイラード反応における色素形成に、pH がどのような影響を与えているのかを調べる過程で、285 nm に極大吸収を有する主要物質を HPLC 上に検出した。ここでは本物質を単離同定し、褐変との関連を検討し、本物質関与の褐変機構を提唱した。
【方法】糖（キシロース、アラビノース、リボース）とリジンを pH 6.0 から pH 8.0 の 0.2 M リン酸緩衝液に溶解し 100℃で加熱して、生成条件を検討した。逆相系 HPLC 分析は ODS カラム、DAD 検出器（250-500 nm）、MeOH-0.1 % TFA 水溶液系溶離液を用いて行った。0.3 M キシロースと 0.3 M リジンを 0.2 M リン酸緩衝液（pH 7.0）に溶解し、100℃で 60 分加熱した。反応溶液を酢酸エチルで抽出し、濃縮を行ったところ、赤色溶液中に結晶を認めたので分け取った。得られた結晶を NMR、MS、X 線構造解析に供し、構造解析を行った。本物質の褐変機構の検討のため、精製した本物質をリン酸緩衝液に溶解、加熱し、各種分析を行った。
【結果】生成条件の検討を行ったところ、本物質は 280 nm の検出でピークの総面積に対して、60-80 %程度の高い割合を示した。pH 6.5 で最大となり、経時的に生成量を調べると、 反応 pH 6.0 では加熱時間の延長に伴って生成量も増加したが、pH 7.0 では加熱時間 1 時間で生成量はピークとなり、その後減少した。そのため、加熱中に分解や重合が生じていることが示唆された。アラビノース、リボースからも生成を確認し、リボースで最も多く生成した。本物質を単離後、各種機器分析に供し、4-ヒドロキシ-5-メチル-3(2*H*)-フラノン (HMFO)と同定した。HMFO はキシロース 1 分子から生成するメイラード生成物質である。HMFO は濃縮段階で重合褐変が認められ、褐変の前駆体である可能性が示唆された。そこで、精製した HMFO 標品を用いて加熱したところ、黄色から茶色の着色が認められ、pH が高いほど早く色づいた。また、リジンの存在によって着色は抑制された。GPC-HPLC に供すると、高分子側にいくつかのピークが確認でき、それらの中には可視領域に吸収を持つ物質と持たない物質があった。複数の重合経路が想定されるが、*o*-フェニレンジアミンによって誘導体化された物質が確認されたため、HMFO から反応性の高いジカルボニルが形成され、重合が進行することが示唆された。

furanone, Maillard reaction, browning

講演番号：3F26p09
講演日時、会場：3 月 28 日 15:38～ F 校舎 26 会場

D-キシロース-グリシン系メイラード反応により生成する新奇青色色素化合物の同定
Identification of Novel Blue Pigment Formed in a D-Xylose-Glycine Model Maillard Reaction

○泉 雄斗、渡辺 寛人、早瀬 文孝 (明治大農)
○Yuto IZUMI, Hirohito WATANABE, Fumitaka HAYASE (Meiji Univ.)

【目的】食品の加工、貯蔵、調理の際には、タンパク質や糖質をはじめとする食品成分間の反応が起こる。その一つとして知られるメイラード反応は、カルボニル化合物とアミノ化合物間の非酵素的褐変反応であり、食品の品質形成や劣化に関する重要な反応である。その最終生成物の褐色色素メラノイジンは難分解性の高分子化合物であり、構造や生成経路について未だ不明な点が多い。我々はこれらの解明を目的として、D-キシロース―グリシンモデル系において、主要生成物である Blue-M1[1]を始めとする Blue-M1～M8 までの 8 種の青色色素化合物を同定してきた。これらの青色色素化合物は単独で褐変することから、メラノイジン生成の重要な中間体であると推測されている。本研究では、D-キシロース―グリシンモデル系において、上記の 8 種の青色色素化合物以外に、新奇の青色色素化合物 Blue-M10 を単離し、構造解析を行った。また、この Blue-M10 の生成経路についても研究を行った。

【方法】D-キシロース(1 M)とグリシン(0.1 M)を炭酸水素ナトリウム(0.1 M)含有 60%エタノール溶液(pH 8.1)中で 26.5℃にて 48 時間インキュベートした。この反応溶液を各種クロマトグラフィーにて精製し、Blue-M10 について LC-ESI-Q-TOF-MS、NMR による構造解析を行った。また、単離した Blue-M1(10 mM)と炭酸水素ナトリウム(0.1 M)を含む 60%エタノール溶液(pH 8.1, 6N-HCl で調製)を 110℃で還流し、Blue-M10 を単離・精製した。

【結果】陰イオン交換クロマトグラフィーにて反応溶液から青色色素画分を分画し、固相抽出にて精製後、逆相 HPLC により Blue-M10 を単離・精製した。また同様にして単離・精製した Blue-M1 を還流したところ、同じ化合物が得られた。

LC-ESI-Q-TOF-MS による質量解析と組成演算の結果、Blue-M10 は分子量 559、組成式 C25H27N4O11 と決定した。NMR 解析の結果、Blue-M10 は主要な青色色素である Blue-M1 の側鎖から C2H3(OH)2 が脱離した構造であった。

さらに Blue-M1 の還流によっても Blue-M10 が生じることから、Blue-M1 の側鎖が開裂し、Blue-M10 が生成したと考えられる。また還流を続けると褐変が進むことから、Blue-M10 は Blue-M1 が褐変する際の中間体である可能性が示唆された。

[1] F. Hayase, et al, Biosci.Biotechnol.Biochem, 63, 1512-1514 (1999)

Maillard reaction, pigments, reflux

講演番号：3F26p10
講演日時、会場：3 月 28 日 15:49～ F 校舎 26 会場

LC-MS/MS による食品中のメーラード反応産物の分析

Analysis of Maillard reaction products in foods with LC-MS/MS

○大塚 譲[1,6]、中村 愛[1]、保坂 好江[1]、石井 美佳子[1]、橋本 侑子[2]、重森 美里[2]、能見 祐里[3]、中島 敬子[4]、鈴木 恵美子[2]、松井 芳光[5]、山本 祐司[5]、本間 清一[1] ([1]お茶の水女子大学　生環研、[2]お茶大大学院、[3]新潟薬科大学、[4]日本女子大、[5]東京農大、[6]戸板女子短大)

○Yuzuru Otsuka[1,6], Ai Nakamura[1], Yoshie Hosaka[1], Mikako Ishii[1], Yuko Hashimoto[2], Misato Shigemori[2], Yuri Nomi[3], Keiko Nakajima[4], Emiko Suzuki[2], Yoshimitsu Matsui[5], Yuuji Yamamoto[5], Seiichi Homma[1] ([1]Ochanomizu Univ., IESHL, [2]Ochanomizu Univ., Life Science, [3]Niigata University of Pharmacy and Applied Life Sciences, [4]Japan women's Univ., [5]Tokyo Univ. of Agric., [6]Toita Women's Colledge)

目的　メーラード反応は食品の化学反応の主要な反応であるのに不明な点が多い。反応により様々な物質が生じるが、従来は抗体による測定が主な測定法であった。しかしながら抗体による測定は誤差も多いため、より正確な LC-MS/MS 法による測定が推奨される。そこで本研究では、反応により生じる様々な化学物質の LC-MS/MS 分析法を開発し、食品中の含有量を測定した。

方法　4(5)-methylimidazole (4(5)-MI)、HMF、ピラジンは ODS カラムと AB サイエックスの QTRAP2000 等を用いて分析した。4(5)-MI の分析では、カラム温度 20℃、移動相に 15mM アンモニア水溶液、15mM アンモニア/アセトニトリルのグラディエント条件を用いて溶出を行った。Pyrazine 類・heterocyclic amine 類などの分析では、カラム温度 40℃、移動相に 0.1%ギ酸水溶液、0.1%ギ酸/アセトニトリルのグラディエント条件を用いて溶出を行った。MS はポジティブモードで分析した。CEL、CML、MG-H1 等は非逆相系カラムを用いグラディエント溶出を行った。

結果　HMF はカラメル、コーヒー、コーラから検出された。Pyr はコーヒーで、2-MPyr もコーヒーでのみ検出された。2,3DM-Pyr はコーヒーとコーラで、2,6DM-Pyr はカラメル、コーヒーおよびコーラで検出された。2,3,5TM-Pyr はコーヒーで少量検出された。固形試料の添加回収試験を行ったが、回収率は低かった。非逆相系のカラムでは CEL は 2.40 分、CML は 2.53 分に溶出された。CEL は醤油や黒糖入り蒸しパンなどから、CML は魚醤などから検出された。黒糖入り蒸しパンからは MG-H1 や G-H1 も検出された。これらのデータはファイルメーカープロを用いデーターベース化し、学内に HP で公開した。

Food Chem. (2014) Feb 15; 145: 892-902.

Maillard, LC-MS/MS, CML

講演番号：3F26p11
講演日時、会場：3 月 28 日 16:10～ F 校舎 26 会場

メイラード反応で生じる高分子化合物を分解する微生物

Screening of microbes to degrade melanoidin formed in cane molasses and model system

○松井 芳光[1]、加藤 結[1]、川田 凛[1]、大塚 譲[2]、山本 祐司[1]、本間 清一[2]([1]東農大化、[2]お茶女大)
○Yoshimitsu Matsui[1], Yui Katoh[1], Rin Kawata[1], Yuzuru Otusuka[2], Yuuji Yamamoto[1], seiichi Honma[2] ([1]Tokyo Univ. Agri., [2]Ochanomizu Univ.)

「目的」
還元糖とアミノ酸によるメイラード反応は食品の加工・貯蔵の過程で一般的におこる反応であり、高分子の褐色色素化合物であるメラノイジンは最終反応生成物である。メイラード反応は食品の色、香り、呈味性の品質形成に寄与する一方で、食品の風味、色調の劣化にも関わっている。本研究は、高分子の色素化合物であるメラノイジンから化学的部分構造を反映する成分を調製し、メラノイジンの高分子構造を推測することを目的とする。その調製手段として、温和な条件下で高分子を分解して、低分子成分を生じる微生物の探索を行った。

「方法および結果」
サトウキビから製糖する際に副生する廃糖蜜（モラセス）は黒褐色の粘張な成分であり、色素の主体はメラノイジンである。これとグルコースとグリシンを等モル反応させたモデルメラノイジンを用いて脱色する微生物の探索を行った。現在までの報告からマンガンペルオキシダーゼやラッカーゼなどのリグニン分解酵素がメラノイジンを分解することができることから、バーベンダム反応を利用したラッカーゼ生産菌のスクリーニングを行ってみた。鹿児島県や沖縄諸島のサトウキビ畑、長年にわたりモラセスが継続的に廃棄されていた土地の土壌や近辺の河川、さらにマングローブ林の周辺から土壌ならびに液体試料から分離した菌から 4 株ほどラッカーゼを生産する菌を分離できた。脱色試験の結果、時間を要するが減色することが確認された。また、醤油油からバイオサーファクタントを生産する目的で使用された *Candida antarctica* が醤油の色を分解していたことから *C. antarctica* を用いて脱色試験を行った結果、先の沖縄や鹿児島から分離した株よりも脱色能力が高いことが観察された。現在、HPLC-DAD による観察やリグニン分解酵素の有無などの確認を行っている。

melanoidin, degrage, microorganism

講演番号：3F26p12
講演日時、会場：3 月 28 日 16:21～ F 校舎 26 会場

味噌メラノイジンのコクへの寄与

Contribution to the Koku Taste of Melanoidin in Soybean Paste

○加藤 祥恵、井上 裕、渡辺 寛人、早瀬 文孝（明治大農）
○Sachie KATO, Yutaka INOUE, Hirohito WATANABE, Fumitaka HAYASE (Meiji Univ.)

【目的】

代表的な発酵食品である味噌は熟成により褐変し、“コク”や“厚み”などと表現される風味が形成される。熟成時にはメイラード反応が進行することで褐色物質であるメラノイジン（MEL）が生成し、褐変が起こる。一方で、味噌中のメイラードペプチドがコクを増強することが報告されている。前回、MEL はブイヨンスープなどに添加することでコクを増強することを明らかにした [1)]。本研究では、MEL を多く含む八丁味噌に着目し、味噌のコクに対する、MEL の寄与について検討を加えた。

【実験方法】

八丁味噌から MEL の分画を行った。八丁味噌の水溶性画分を限外濾過ユニットにより 3kDa 以下、3-5kDa、5-10kDa、10kDa 以上の４つに分画した。

本研究ではコクを「厚み」と「持続性」と定義して官能評価を行った。はじめにオミッションテストを行った。八丁味噌 MEL の４つの画分全てを、うま味溶液（5%塩化ナトリウム+3%グルタミン酸ナトリウム水溶液）に溶解し、これをコントロールとした。コントロールから 3-5kDa、5-10kDa、10kDa 以上の画分をそれぞれ除いた溶液を調製し、７段階評価尺度法を用いてコクを官能評価した。

さらに、うま味溶液をコントロールとし、コントロールに 3-5kDa、5-10kDa の八丁味噌 MEL をそれぞれ添加したサンプルに対して二点比較法によりコクについて官能評価を行った。

【結果・考察】

オミッションテストの結果、3-5kDa、5-10kDa の八丁味噌 MEL が「厚み」と「持続性」に寄与していることが明らかとなった。3-5kDa、5-10kDa の八丁味噌 MEL をうま味溶液に添加した結果、それぞれの画分は、味噌汁（5%八丁味噌水溶液）における含有量以下で「厚み」と「持続性」を増強した。以上より、八丁味噌に含まれる 3-10kDa の MEL は味噌のコクに寄与することが明らかとなった。

1）安田佳代, 松本朋大, 渡辺寛人, 早瀬文孝, 日本農芸化学会, 2J15p18, (2012)

koku taste, melanoidin, soybean paste

講演番号：3F26p13
講演日時、会場：3 月 28 日 16:32～ F 校舎 26 会場

萩のナツミカンの花の香気成分の同定

Identification of volatile components from natsudaidai frower oils in Hagi.

○志方 あかね、小山 真知、惣田 乃絵、赤壁 善彦（山口大農）
○Akane SHIKATA, Machi OYAMA, Noe SOUDA, Yoshihiko AKAKABE (Yamaguchi Univ.)

［目的］地中海沿岸を産地とするダイダイ(*Citrus aurantium* L.)の花を水蒸気蒸留によって得る精油、ネロリは香りがよいとされ、アロマテラピーで利用される。ネロリ油に含まれる linalool がヒトの副交感神経を優位にさせ鎮静効果をもたらすという報告もある。一方、日本においては、ナツミカン(*Citrus natsudaidai* Hayata)が全国的に広く栽培されており、ダイダイと同様にその花の香りはよく、特にナツミカン発祥の地である山口県の萩市は、その花の香りが全国の「かおり風景 100 選」に選定されている。本研究では、萩のナツミカンの花の香気成分を同定し、その香気特徴を明らかにすることを目的とした。
［方法］ナツミカンの花（2013 年 5 月に萩市で採取）をペンタンとジクロロメタンを抽出溶媒として、連続蒸留抽出法（SDE 法）によって精油を調製し、得られた精油は GC-MS 分析［Shimadzu QP 5050 A、column：DB-WAX (0.25mm i.d ×60m)］した。
［結果と考察］萩のナツミカンの花の SDE 法によって得られた精油中において、主要成分として (*E,E*)-farnesol, γ-terpinene, (*E*)-nerolidol, linalool, (*E*)-β-ocimene, limonene, β-pinene が検出され、全体の約 7 割を占めた。一方、市販のチュニジア産ネロリ油を同様に分析したところ、linalool が主要成分で、続いて limonene, β-pinene, linalyl acetate, α-terpineol が含まれていた。よって、ナツミカンの花の香気成分組成は、ネロリ油とは大きく異なることが分かった。これら主要な香気成分中、(*E*)-nerolidol, linalool, α-terpineol, linalyl acetate はキラルなテルペン系アルコールおよびエステルであり、limonene, β-pinene はキラルなテルペン系炭化水素で、両エナンチオマー間においてその香気特徴が異なる場合がある。そこで、ナツミカンの花の主要なキラルな香気成分の立体配置ならびに光学純度の決定を行い、ネロリ油中の成分と比較したところ、興味深い結果を得た。

citrus, volatile, chiral compound

講演番号：3F26p14
講演日時、会場：3 月 28 日 16:43～ F 校舎 26 会場

リンゴ香気成分プロファイルの品種特性

Varietal characteristics of apple flavor currently available in Japan

○田中 福代[1]、早川 文代[2]、葛西 智[3] ([1]農研機構・中央農研、[2]農研機構・食総研、[3]青森産技セ・りんご研)
○Fukuyo TANAKA[1], Fumiyo HAYAKAWA[2], Satoshi KASAI[3] ([1]NARO Agricultural Research Center, [2]National Food Research Institute, [3]Aomori Prefectural Industrial Technology Research Center)

リンゴは最もポピュラーな果実のひとつであり，国内でも日本人の嗜好性や用途にあわせて品種育成が行われている．しかし，香気成分について詳細な系統だった検討はなされていない．そこで，国内で流通している主要なリンゴ品種や新しい品種を収集し，その成分特性を解析した．

【方法】供試試料：(地独) 青森県産業技術センターりんご研究所生産：「千雪」，「星の金貨」，「かおり」，「春明 21」，「王林」，「ふじ」．盛岡市生産者産：「ふじ」，「きたろう」，「秋映」，「北斗」．市販：「早生ふじ」，「ジョナゴールド」，「シナノスイート」，「シナノゴールド」，「紅玉」，「彩香」，「トキ」，「おいらせ」．いずれも 2014 年産果実を用いた．

分析方法：果実を入手から 1 日以内に 1 果ずつ捕集剤(Mono Trap RGPS TD)とともに 1.2L のガラス製密閉容器に室温で 1 時間静置した．捕集剤を取り出し，TDU-GC/MS により香気成分の分析を行った．

【結果】リンゴらしい香りの成分として知られる Hexyl acetate は多くの品種で高濃度で検出されたが，「春明 21」，「かおり」では低濃度であった．この傾向は Hexanol，Hexyl hexanoate の濃度傾向と一致していた．リンゴの主要香気成分であり，フルーティな香りを呈するエステル類は，「おいらせ」，「秋映」，「きたろう」，「トキ」，「紅玉」に多かった．「王林」では収穫直後は低濃度であったが，0℃貯蔵の一か月間に増加が認められた．Estragole や Furfural 類は甘い香りを呈することが知られているが，これらの成分は「ジョナゴールド」，「トキ」，「千雪」，「シナノゴールド」から検出された．「王林」では収穫直後は不検出であったが，時間経過とともに増加した．「ふじ」では認められなかった．

【考察】「王林」，「トキ」，「ジョナゴールド」などに共通する独特の甘い香りには Estragole の寄与が推定された．さらに，エステル類に関して「王林」，「トキ」では エチルエステル類が集積するのに対し，「ジョナゴールド」では各種酢酸エステルが主要であり，エチルエステルは少なかった．この相違が，「王林」が「ジョナゴールド」に比べてより甘い香りを呈する要因と推定した．

「春明 21」，「かおり」，「シナノゴールド」は独特の官能特性を示しており，これらの特性と関連する成分の特定を進めたい．また，市場入手の試料においてエステル類が多い傾向があり，品種特性に加えて収穫後の経過時間や貯蔵状態の影響が想定される。生産者既知の代表的品種について，さらに経時的変化を加えて検討する．

Flavor profile, GC/MS, Sensory attributes

講演番号：3F26p15
講演日時、会場：3 月 28 日 16:54～ F 校舎 26 会場

香気成分シトラールを添加したアガロースゲルの HRMAS-NMR スペクトルとテクスチャーの測定
Measurements of HRMAS-NMR spectrum and texture of agarose gel containing citral

○山田 恭正[1]、瀬河 三貴[1]、水野 希美子[1]、西成 勝好[2]([1]同志社女子大食栄、[2]湖北工業大)
○Yasumasa YAMADA[1], Miki SEGAWA[1], Kimiko MIZUNO[1], Katsuyoshi NISHINARI[2] ([1]Doshisha Women's Coll. of Lib. Arts, [2]Hubei Univ. of Tech.)

【目的】寒天ゲルからのフレーバーリリースに関する研究において，演者らは寒天に香気成分を添加したゲルを破壊して，リリースされる香気成分を GCMS で分析した。その結果，シトラール（ゲラニアールとネラールの混合物）などのアルデヒド基を有する香気成分は，炭化水素系モノテルペンやエステル類と比較してリリース率が低いことを明らかにした。[1)] そこで，シトラールが寒天ゲル内に留まっている状態を NMR で調べることを目的とした。また，香気成分がゲル内に留まっていることにより，テクスチャーに影響を与えるかどうかを調べることも目的とした。

【方法】アガロースを D_2O に溶解し，柑橘系飲料と同じ pH3.0 に調整してゲル化させた試料と，同様に調整したアガロースゾルへシトラールを添加してゲル化させた試料の両方について，高分解能マジックアングルスピニング法（HR-MAS 法）により約 5,000 回積算して ^{1}H NMR スペクトルを測定した。さらに，pH3.0 と pH7.0 に調整したアガロースゾルへシトラールと n-デカナールをそれぞれ添加して，一晩冷蔵庫内に静置した。得られたアガロースゲルを用いてテクスチャーアナライザーにより一軸圧縮を行い，力学的測定を行った。

【結果】シトラールを添加したゲルの ^{1}H NMR スペクトルでは，アガロースゲルのみのスペクトルと比較したところ 9.4ppm と 9.7ppm にアルデヒドプロトンが見られ，またオレフィンカーボンに隣接したアリファティックプロトンも見られたことからシトラールがアガロースゲルマトリクス内に存在していることが明らかとなった。

また，テクスチャーアナライザーによる一軸圧縮を行った結果，pH3.0 では，シトラールを添加した場合は，n-デカナールを添加した場合と比較して破断荷重 F が減少していたが，pH7.0 では，両者にほとんど差は見られなかった。これは，n-デカナールのアルキル基が，シトラールのオレフィン部分よりも化学的に安定であるため酸や熱による構造の変化を受けにくいためであると考えられる。因みに，植野らは柑橘系飲料の加熱や長期間保存で発生するオフフレーバーは，pH3.0 でシトラールが 4-メチルアセトフェノン等の芳香族化合物に変化することが原因であると報告している。[2)] 演者らは，アガロースゲル内におけるシトラールの存在を NMR で確認することができた。

1) 山田恭正「寒天ゲルからの香気成分のリリース」日本食品科学工学会第 60 回記念大会講演集 p.53（2013 年）.
2) T. Ueno, H. Masuda, and C.-T. Ho, *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 5677-5684 (2004).

citral, HRMAS-NMR, agarose gel

講演番号：3F26p16
講演日時、会場：3 月 28 日 17:15～ F 校舎 26 会場

イソ及びアンテイソ構造を有する脂肪族高級アルデヒドの香気に関する構造活性相関

Structure-Odor Relationship of Aliphatic Higher Aldehydes Possessing Iso and Anteiso Structure

○藤川 誠二、和田 善行、稲垣 さつき、佐久間 克也、熊沢 賢二、作田 圭亮（小川香料）
○Seiji FUJIKAWA, Yoshiyuki WADA, Satsuki INAGAKI, Katsuya SAKUMA, Kenji KUMAZAWA, Keisuke SAKUDA (Ogawa & Co., Ltd.)

【目的】　アルデヒド類はアルコール類、エステル類と共に最も重要な合成香料であり、様々な化合物が使用されている。例えば、直鎖の脂肪族高級アルデヒド類は様々な香りを呈し、香料として汎用的に利用されている。他方、１２－メチルトリデカナールや８－メチルデカナールといったイソ及びアンテイソ構造を有する脂肪族高級アルデヒドも天然中に見出され、煮込んだ牛肉［１］やユズ果皮油［２］の香気に重要であることが知られているが、香料としての利用は直鎖のものほど進んでいるとは言えない。そして、イソ及びアンテイソ構造を有する脂肪族高級アルデヒド類の香気特性及び閾値を系統的に調べた報告例もない。そこで、本研究では、炭素数１１～１６のイソ及びアンテイソ構造を有する脂肪族高級アルデヒドを合成し、香気特性及び香気閾値の系統的な解明を目的として検討を行った。

【方法】　合成：臭化銅(Ⅰ)存在下、イソブチルマグネシウムブロミド又は２－メチルブチルマグネシウムブロミドとエチル＝ω－ブロモアルキルエステル又はω－ブロモアルカン－１－オールのアルコール保護体とをカップリングして目的とするアルデヒドの基本骨格を構築後、官能基変換して各化合物を合成した。

香調評価：自社専門パネルにより、各化合物を水中に添加して官能評価した。

閾値測定：各化合物を水中に添加し、官能評価（三点試験法）に供することで検知閾値を求めた。

【結果】　イソ構造を有する高級アルデヒド類の評価を行ったところ、次のような結果を得た。

香調：アルキル鎖の短いＣ１１及びＣ１２のアルデヒドは、シトラス、アルデヒド調の香気を有していたが、炭素数の増加に伴い、肉様、獣脂様のにおいに変化していった。

閾値：Ｃ１１からＣ１３にかけて炭素数の増加に伴い閾値が低下し、Ｃ１４で最も低い閾値を示した。Ｃ１５で閾値は上昇に転じ、Ｃ１６では更に高い閾値を示した。興味深いことに、最も閾値の低かったＣ１４の１２－メチルトリデカナール（検知閾値＝0.6ppb in water）は、試験した他のアルデヒドに比べて、約 1/374 から 1/9 程度閾値が低いことが明らかになった。

現在、アンテイソ構造を有する高級アルデヒド類の香気評価、閾値測定を実施中であり、併せて報告予定である。

［１］Lebensm. Wiss. Technol. (1993), 26, 171-177.
［２］J. Agric. Food Chem. (1990), 38, 1544-1548.

Odor　threshold, Structure-Odor Relationship, Aliphatic Higher Aldehydes

講演番号：3F26p17
講演日時、会場：3 月 28 日 17:26～ F 校舎 26 会場

回分培養法によるウサギ盲腸発酵に及ぼすゲラニオールの影響

The effect of geraniol on batch culture fermentation in rabbit cecum

○島田 花純[1]、富澤 由花[1]、佐上 博[2]、大谷 典正[3]、小酒井 貴晴[1,3]([1]山形大地教、[2]東北大多元研、[3]山形大院理工)
○Kasumi SHIMADA[1], Yuka Tomizawa[1], Hiroshi Sagami[2], Norimasa Ohya[3], Takaharu Kozakai[1,3]
([1]Yamagata Univ., [2]Tohoku Univ., [3]Yamagata Univ,Graduate School of Science and Engineering)

【目的】イソプレノイド化合物はイソプレン単位(C5H8)を骨格とする化合物の総称で、約 23,000 種類も確認されている。中でも、香辛料として知られるゲラニオールやファルネソール等の短鎖イソプレノイドは、黄色ブドウ球菌や白癬菌など抗菌・抗真菌作用を有することが報告されている。その一方で、短鎖イソプレノイドは、動物における化学受容体と結合して「におい」として認識されている。以前に、我々は、ゲラニオールとファルネソールが、マウス腸管上皮の能動的イオン輸送や膜抵抗には影響しないことをすでに報告しているが、腸内発酵に及ぼす影響は不明である。

そこで、イソプレノイド化合物（ファルネソール(FOH)、ゲラニオール(GOH)）が腸内発酵に及ぼす影響を、ウサギ盲腸内容物を用いた *in vitro* 回分培養（batch culture）法によって検討した。

【方法】日本白色種ウサギ（3 匹、雄）から採取した盲腸内容物を、緩衝液で希釈して 2 重ガーゼで濾過してイノキュラムとして供試した。イノキュラム、基質およびイソプレノイド（FOH および GOH; 10^{-3} から 10mM）を試験管内で混合し、100%N_2 ガスで封入後、39℃で 24h 培養した。培養後、液中の有機酸濃度を HPLC（BTB ポストカラム法）および細菌数の増減を半定量 PCR 法にて検討した。処理は、グルコースを基質として、1) FOH および GOH との比較、2) 振とうおよび静置条件の比較、3) HCO_3^-および CO_2 ガスによる嫌気条件の差異を検討した上で、4)基質（グルコース、マルトース、デキストリン）による差異を検討した。

【結果】実験 1) 低濃度 GOH は、同濃度の FOH より SCFA 濃度を有意に増大させた。実験 2）実験 1 より高濃度の GOH 処理は SCFA 濃度をより減少させた。その効果は静置条件より振とう条件が強かった。実験 3) HCO_3^-+CO_2 ガスによる高嫌気条件下において、高濃度 GOH は一次発酵産物（コハク酸および乳酸）濃度を増大させた上で、二次発酵産物(SCFA)濃度を抑制させた。実験 4) GOH の効果は、添加する基質によって異なった。特に、マルトースを基質とした場合、高濃度 GOH は SCFA 濃度を抑制させた。また、その際に、酢酸産生菌と酪酸産生菌の減少が認められた。

これらの結果より、低濃度 GOH 処理は二次発酵菌の活性を促進することで、一次発酵産物から二次発酵産物への変換を促進するため、一次発酵産物の減少と二次発酵産物の増大を引き起こしたのかもしれない。一方、高濃度 GOH 処理は二次発酵菌の活性を阻害することで、一次発酵産物の蓄積を誘導したのかもしれない。

isoprenoid, intestinal fermentation, functional food

講演番号：3F26p18
講演日時、会場：3 月 28 日 17:37～ F 校舎 26 会場

埼玉県産小麦のストリーム粉の一般成分と揮発性成分との相関

Comparison of general components and volatile compounds in flour mill streams obtained from wheat cultivated in Saitama

○成澤 朋之[1]、小島 登貴子[1]、仲島 日出男[2]、杉山 健二郎[3]、山田 昌治[3]([1]埼玉産技セ北部、[2]埼玉産技セ、[3]工学院大工)
○ Tomoyuki Narisawa[1], Tokiko Kojima[1], Hideo Nakajima[2], Kenjiro Sugiyama[3], Masaharu Yamada[3] ([1]SAITEC NL, [2]SAITEC, [3]Kogakuin Univ.)

【目的】

国産小麦は外国産小麦に比べ、味や風味において特徴があるという評価が製粉業者や製麺業者を中心に多くみられているが、依然として科学的な裏付けが行われていない状況にある。これを受け、我々はこれまでにガスクロマトグラフ質量分析装置(GC/MS)を用いて埼玉県産およびオーストラリア産小麦の小麦粉や麺生地、茹で麺などの揮発性成分分析を行い、この風評の科学的な裏付けを試みてきた。しかし、実際の製粉現場に GC/MS のような高額な装置の導入は現実的ではない。そこで、小麦粉の一般成分と揮発性成分との関連を解明することを目的に、ストリーム粉ごとの GC/MS での分析と一般成分分析を行った。

【方法】

小麦は埼玉県内で栽培された平成 24 年産および 25 年産の「農林 61 号」「さとのそら」の 2 品種を用いた。それぞれの小麦をビューラー社製のラボラトリーミルで製粉し、ブレーキ粉として 3 種(１Ｂ、２Ｂ、３Ｂ)とミドリング粉として 3 種(１Ｍ、２Ｍ、３Ｍ)の合計 6 種類のストリーム粉を得た。揮発性成分は、各ストリーム粉を 3.3g ずつ 20ml バイアルビンにとり、80℃で熱平衡化したヘッドスペースの蒸気をトラップ方式により 3 回抽出した後に GC/MS へ導入することで分析を行った。

【結果】

揮発性成分として、各種小麦粉に共通して検出されたのは Decane、Hexanal、2-Pentylfuran、1-Pentanol、1-Hexanol、Nonanal、2-Decen-1-ol、2-Ethyl-1-hexanol、Benzaldehyde であった。一般成分との相関を見てみると、特に灰分との相関が高かった。1-Pentanol、1-Hexanol、2-Decen-1-ol などのアルコール類は灰分との相関が高く、これらアルコール類はふすま由来成分であることが推察された。また、Hexanal や Benzaldehyde といったアルデヒド類は灰分と逆相関があった。小麦製粉においては灰分を指標に 1 等粉、2 等粉等と等級分けされるが、これらの結果から、ストリーム粉ごとの灰分を指標に小麦粉をブレンドすることで、狙った風味を付与するということが可能であると考えられた。

Wheat flour, flour mill streams, volatile compounds

講演番号：3F26p19
講演日時、会場：3 月 28 日 17:48～ F 校舎 26 会場

高β-グルカン大麦の焙煎香気における搗精と焙煎度の影響

Effects of pearling and roast degree on flavor compounds of roast grain of high beta-glucan barley cultivars

○神山 紀子[1]、一ノ瀬 靖則[1]、金子 成延[1]、小前 幸三[2]、高橋 飛鳥[2]、吉岡 藤治[2]、柳澤 貴司[1] ([1]農研機構作物研、[2]農研機構近中四農研)
○Noriko Kohyama[1], Yasunori Ichinose[1], Shigenobu Kaneko[1], Kozo Komae[2], Aska Takahashi[2], Toji Yoshioka[2], Takashi Yanagisawa[1] ([1]NICS, [2]WeNARC)

【目的】大麦の穀粒にはβ-グルカン等の食物繊維が豊富に含まれており、その血糖値上昇抑制効果や血中コレステロール改善効果等の健康機能性が注目されている。通常の品種に比べて β-グルカン含量が非常に高いウルチ性裸麦品種「ビューファイバー」は、その形状から搗精による糠の除去が難しく粒食に不向きなことから粉体利用が期待されている。しかし大麦粉を用いたパン生地の調製時に、小麦粉とは異なる独特の不快臭があるとの指摘があり、においの改善が課題になっている。そこで、においを改善した大麦食品の開発に資するため、「ビューファイバー」とややβ-グルカン含量が高いモチ性裸麦品種「キラリモチ」を用いて、焙煎加工による香気成分の変化を調べた。
【方法】2013 年愛知県産「ビューファイバー」の玄麦と 60%搗精麦、2013 年北海道産「キラリモチ」の玄麦と米粒麦を用いた。焙煎には小型コーヒー焙煎機（MEICOFFEE MPR-3000）を用い、原料 50g を投入後 180W で加熱し、最終品温が 150～230℃（キラリモチは 220℃まで）になるまで段階的に焙煎処理を行い、粉砕した。香気成分は、粉 50mg をガラスバイアルに入れて SPME（DVB/CAR/PDMS）ファイバーで 60℃、30 分間抽出し、GC-MS で分析し、MS スペクトル及び RI で同定した約 40 種の香気成分について、主イオンのピーク面積を測定した。また、β-グルカンの含量と分子量分布を測定した。
【結果及び考察】焙煎粉において、悪臭成分である 2-methylbutanal や hexanal は玄麦に比べ搗精麦や米粒麦で同等かより多く含まれるのに対し、甘い香りの furfural や 5-methylfurfural、香ばしい香りの 2,5-dimethylpyrazine や 2,6-dimethylpyrazine は玄麦に多く含まれるため、焙煎によるにおいの改善は玄麦の方が効果的であると考えられた。焙煎度による香気成分の変動パターンは化合物ごとに異なり、化合物により原料によらず同様の変動を示すものと原料により異なるものもみられた。焙煎度が弱い焙煎粉は油臭が、強い焙煎粉は焦げ臭があり、中程度の焙煎粉の香りが好ましかった。また、β-グルカンは焙煎度が高い程低分子量化が見られたため、過剰な焙煎は好ましくないと考えられた。

Roast barley, flavor, ß-glucan

講演番号：3F26p20
講演日時、会場：3 月 28 日 17:59～ F 校舎 26 会場

発芽玄米酒粕の呈味増強効果と活性酸素消去能

Pre-germinated brown rice sake-lees having taste-enhancing effect and active oxygen-scavenging ability

○小木曽 加奈[1]、岡崎 光雄[2] ([1]長野県短大生活科学、[2]岡崎酒造)
○Kana KOGISO[1], Mitsuo OKAZAKI[2] ([1]Nagano Pref Col., [2]Okazaki Brewery Co. Ltd.)

【目的】
発芽玄米酒粕とは発芽玄米を使用して作成した清酒の残さである。酒米玄米表面を削らないため各種成分が清酒や残さである酒粕にそのまま残ると考えられ、それらの嗜好性にも影響を及ぼすと予想される。 我々は糠や胚芽や胚乳などの産業廃棄物の排出を抑えること、また廃棄物再利用の面から発芽玄米酒粕の有効利用方法を検討してきた[1)]。本研究では発芽玄米酒粕の呈味増強効果と活性酸素消去能について報告する。
【方法】
呈味成分の検討として遊離アミノ酸、有機酸、ナトリウム等の各種ミネラル、全糖量、核酸塩基を分析した。比較対象として同じ酒米玄米から作成した吟醸粕を用いた。製パンは 1 斤タイプ 自動ホームベーカリー（製品番号 SD-BH103-P パナソニック社製）を用いて 2 時間コースにて行った。強力粉の一部代替材料として発芽玄米酒粕を用いた。水分量は酒粕の水分含量を鑑み、調整をして製パンを行った。官能検査はあらかじめ官能試験を実施し、健康で味覚に問題のない大学生及び教員（全～名）を選抜した。活性酸素消去能は素のままの発芽玄米酒粕を用いて WST-1 での SOD 活性測定法を用いて in vitro における活性酸素消去活性測定を行った。
【結果と考察】
発芽玄米酒粕により多く含まれていたのは遊離アミノ酸、有機酸、各種ミネラルであった。吟醸粕には糖質がより多く含まれていた。核酸塩基はどちらにも検出されなかった。これらの酒粕を加えた製パンに対し官能試験をした結果、発芽玄米酒粕の方がパンの塩味やコク味が増す傾向があった。その主な原因は有機酸であった。以上のことから発芽玄米酒粕を加えることによって減塩可能なパンが作成できた。また発芽玄米酒粕の活性酸素消去能は IC_{50} 値で 33.5 mg/ml であった。

本研究は科研費（26750033）の助成を受けたものである。

1)発芽玄米酒粕の食品利用方法についての検討, 牛越 静子, 小木曽 加奈, 長野県短期大学紀要、第 65 号, 13-18 (2010)

Sake-lees, taste-enhancing effect, active oxygen-scavenging ability

講演番号：3F28a07
講演日時、会場：3 月 28 日 10:16～ F 校舎 28 会場

塩麹製造中および保存中における食塩濃度の違いによる抗菌効果について

Bactericidal effects of salt-malted rice by the difference in the salt concentration during producing and preserving

○相良 純一[1]、尾関 健二[1]、新田 陽子[2]、高橋 香澄[3]、北元 憲利[3]（[1]金沢工業大学、[2]岡山県立大、[3]兵庫県立大）
○Jun-Ichi SAGARA[1], Kenji OZEKI[1], Youko Nitta[2], Kasumi Takahashi[3], Noritoshi KITAMOTO[3]
([1]Kanazawa Institute of Technology, [2]Okayama Prefectural University, [3]University of Hyogo)

【目的】麹菌は発酵糸状菌の中でも多くの酵素を生産することから「酵素の宝庫」と呼ばれ、日本の発酵産業の根幹を成し、「国菌」として認められている。昨今の発酵食品ブームにおいて、麹を利用した調味料が注目され、中でも塩と麹と水だけでつくることができる「塩麹」は、一般家庭においても簡単に調合することができる調味料として非常に注目されている。しかし、一般家庭において自家製の塩麹を調整する場合、健康的な配慮からその塩分濃度を下げてしまうことにより、食材中の食中毒菌や腐敗菌の増殖による食中毒の発生が懸念されている。そこで本研究では、塩麹の製造中、および保存中の塩分濃度の違いによる一般細菌と麹菌の挙動を検討し、食品衛生学的な知見を得ることを目的とした。
【方法】麹として味噌麹（国産米、精米歩合 90%）、清酒麹（麹米、精米歩合 70%）の 2 種の乾燥麹と比較のため蒸米（α化米）を使用し、食塩濃度を 7.50%、10.0%、12.5% に調製した塩麹を作製した。製造中（常温）の一般生菌の挙動を調べるために、それぞれを室温で毎日 1 度撹拌し、10 日目まで経日的にサンプリングを行い、一般細菌の検出を行った。次に保存中の一般生菌の挙動を調べるため、10 日目以降、4℃で保存し、同様に毎日 1 度の撹拌、20 日目まで経日的にサンプリングを行い、一般生菌の検出をおこなった。また、製造中（常温）における麹菌の挙動を調べるために、味噌麹と清酒麹を塩分濃度 5.0%、7.5%、10.0%、12.5%の塩麹の調製し 15 日間、経日的にサンプリングを行い、麹菌の検出を行った。
【結果】塩分濃度 12.5%の塩麹では味噌麹、清酒麹ともに製造中の一般細菌の増殖は見られなかった。10.0%の塩麹では一般細菌数はある程度増えるものの、大幅な増殖は見られなかった。7.5%濃度では一般細菌は大幅に増殖し、15 日目の測定では菌数は味噌麹で 10^2 倍、清酒麹で 10^4 倍となった。また蒸米との比較により清酒麹よりも味噌麹の方が麹菌単体における抗菌能力が高いこともわかった。また常温における麹菌の挙動については、麹菌はごくわずかではあるが存在しており、また、味噌麹の方が清酒麹よりも塩耐性能力が高いことがわかった。
【考察】以上の結果より、塩麹の塩分濃度を 10.0%以上にすることにより食中毒菌の繁殖・増殖を防ぐことができると考えられる。減塩タイプの塩麹を作製する際は、この塩分濃度を意識する必要があることがわかった。また塩分濃度 10%以下の場合において、麹菌による抗菌効果がみられており、同塩分濃度で麹菌が生存している結果とあわせ、麹菌が何らかの抗菌効果を持つことが示唆された。

Bactericidal effects, Salt-malted rice, Viable bacteria

講演番号：3F28a08
講演日時、会場：3 月 28 日 10:27～ F 校舎 28 会場

腐敗細菌および食品付着細菌に対する塩麹の抗菌効果について

bactericidal effects of salt-malted rice against putrefactive and indigenous bacteria

○北元 憲利[1]、高橋 香澄[1]、安方 芙実子[1]、石坂 朱里[1]、加藤 陽二[1]、新田 陽子[2]、相良 純一[3]、尾関 健二[3] ([1]兵庫県立大環境人間、[2]岡山県立大保健福祉、[3]金沢工大バイオ・化学)
○Noritoshi KITAMOTO[1], Kasumi TAKAHASHI[1], Fumiko YASUKATA[1], Akari ISHISAKA[1], Yoji KATO[1], Yoko NITTA[2], Jun-ichi SAGARA[3], Kenji OZEKI[3] ([1]Univ.Hyogo, [2]Okayama Pref. Univ., [3]Kanazawa Inst. Tech.)

麹菌は、「国菌」といわれ、最近、麹菌を利用した塩麹が調味料として注目されている。塩麹は、麹に水と食塩（通常 10～14%）を加えて発酵させたものであるが、アミラーゼやプロテアーゼなど多くの酵素や栄養成分が含まれており食材に甘味や旨味を与える。しかし、食品衛生学的な面からは、ほとんど検討されていなかったことから、我々はこれまでに各種食中毒細菌に対する塩麹の抗菌効果について検討してきた。この抗菌効果は、麹菌の 1 次代謝物である酸と塩との相乗効果が働いていると考えられた。今回は、常在細菌（腐敗菌）やアレルギー様食中毒を起こす細菌に対する抗菌効果を検討するとともに、日常生活の中で、野菜の浅漬けなどのように、食材に塩麹を塗布したり漬け込んだ場合に、食材に付着している一般細菌がどのような挙動を示すか検討した。

麹菌として清酒用（麹米、精米歩合 70%）の乾燥麹を用いた。食塩濃度が 8%、10%、12%および 14%の塩麹を作製した。7～10 日間成熟させた塩麹に一定量の細菌を混合した。細菌として、アレルギー様食中毒を起こすモルガン菌（NBRC3848）、常在細菌（腐敗菌）の代表である有芽胞枯草菌（NBRC13719）および緑膿菌（当研究室分離株）を用いた。接種後、経時的に菌数を測定した。また、食塩濃度が 8%、12%の手作り塩麹（7～10 日間熟成）および 12%の市販の塩麹をそれぞれ食材（きゅうり、鶏もも肉、さば）に塗布したり漬け込んだのち、経時的に菌数を測定した。

塩麹の塩濃度を 10%、12%あるいは 14%とし、初発菌数を 10^3～10^4 とした場合、モルガン菌、枯草菌および緑膿菌は、いずれも接種直後から 3 日の間にほぼ検出限界まで激減した。食塩濃度 12%の手作り塩麹および市販の塩麹とも、食材に塗布したり漬け込むことにより一般細菌数は激減することが分かった。この場合、食材に塩麹をつけたままのものと、塩麹を洗い流したものについて菌数測定を行ったが、効果は変わらなかった。

塩分濃度を 10%以上にすることにより食中毒菌と同様、腐敗細菌の増殖も防ぐこと分かった。また、日常の中で食材に塩麹を塗布・漬け込むことにより付着細菌が激減することが分かった。塩麹を洗い流してもこの効果は変わらないことから、洗浄によりある程度の減塩効果が期待される。塩麹は、成熟中ばかりでなく保存中においても抗菌効果をもつことから、食材を衛生的に保ち、感染予防に役立つことが示唆された。

Bactericidal effects, Salt-malted rice, Putrefactive bacteria

講演番号：3F28a09
講演日時、会場：3 月 28 日 10:38～ F 校舎 28 会場

ハーブを用いたアレルギー様食中毒発生予防法の検討
Investigation of preventive against allergy-like food poisoning using herbs
○安方 芙実子[1]、北元 憲利[1]、加藤 陽二[1]、石坂 朱里[1]、新田 陽子[2]([1]兵庫県立大学、[2]岡山県立大学)
○Fumiko YASUKATA[1], Noritoshi KITAMOTO[1], Yoji KATO[1], Akari ISHISAKA[1], Yoko NITTA[2] ([1]University of Hyogo, [2]Okayama Prefectural University)

新田ら(2008、日本家政学会誌)は、ある種のハーブがヒト由来のヒスタミン合成酵素（HDC）に対してその働きを阻害し、ヒスタミン合成を抑制することを報告した。現在、ヒトにおいてハーブがヒスタミン合成に与える影響について、ヒスタミン蓄積によってアレルギー様食中毒を引き起こす赤身魚上で応用する事ができないか研究を進めている。赤身魚においては、その筋肉中に存在するヒスチジンに対して、ヒスタミン合成細菌が産生する HDC が作用し、ヒスタミンが合成される機序が分かっている。しかし、その合成を抑制する手段や機序については明らかにされていない。赤身魚上でもこの合成抑制が証明されれば、アレルギー様食中毒の予防法の確立が期待できる。アレルギー様食中毒の多くは喫食直後から舌のしびれや顔面の紅潮、発疹や吐き気などアレルギーに似た食中毒症状を示し、衛生管理が徹底されている現在も集団給食施設や飲食店などで毎年数件発生している食中毒である。現段階では、その予防法は確立されていない。

そこで今回、ヒト由来の HDC の働きを阻害するハーブ３種を用い、赤身魚におけるヒスタミン合成への影響を検討するとともに、ヒスタミン合成細菌として主要菌と考えられるモルガン菌（*Morganella morganii*）や他の食中毒細菌に対する影響について検討した。また、ヒトと同様にハーブのヒスタミン産生抑制機序を明らかにするため、モルガン菌の HDC の精製を試み、ヒスタミンの産生抑制が合成細菌の発育阻害のみによって起こるのか、あるいは、HDC に対しても阻害しているのか検討した。

その結果、ヒスタミン合成細菌であるモルガン菌に対してハーブがその発育を阻害すること、ハーブが赤身魚中のヒスタミン産生量を抑制することが明らかとなった。また、腸炎ビブリオ菌、腸管出血性大腸菌(0157)、ブドウ球菌などの食中毒細菌に対しても発育を阻害することが分かった。さらに、モルガン菌由来 HDC の組換え体タンパク質の発現系を構築し、そのタンパク質の精製法を確立した。簡便に精製 HDC を得ることが可能になったことから、精製 HDC を用いて、ハーブのヒスタミン産生抑制機序について分子レベルでの解明を検討している。またハーブのどのような機能性成分が、抗菌作用やヒスタミン合成抑制に働いているのか解明する予定である。このことにより、アレルギー様食中毒や細菌性食中毒の発生予防法の確立に寄与したい。

histamine, *Morganella morganii*, herbs

講演番号：3F28a10
講演日時、会場：3 月 28 日 10:49～ F 校舎 28 会場

モデルマウスを用いた低アレルゲン化エビタンパク質の評価

Impact of Maillard reaction on prawn allergenic protein evaluated by using allergenic model mouse

佐々木 萌[1]、○佐々木 直美[1]、ロパタ アンドレアス[2]、菰田 俊一[1]([1]宮城大学、[2]ジェームス　クック　大学　(豪州))
Moe Sasaki[1], ○Naomi Sasaki[1], Andreas Lopata[2], Toshikazu Komoda[1] ([1]Miyagi Univ., [2]James Cook Univ.)

[目的]
　エビに含まれるアレルゲンタンパク質の低アレルゲン化および動物モデルによる評価方法を検討した。我々はこれまでに、エビアレルゲンタンパク質をメイラード反応により化学修飾し、低アレルゲン化することについて検討を行ない、その可能性が示されてきている。今回は、これらのタンパク質のアレルゲン性をモデルマウスにて評価し、その有効性を確かめることとした。

[方法]
　はじめにブラックタイガー種のエビからアレルゲンタンパク質(トロポミオシン、37KDa)を抽出した。次に、このアレルゲンタンパク質と還元糖を反応させ、低アレルゲン化を試みた。今回の検討では還元糖として単糖類のリボース、グルコースおよび多糖類のガラクトマンナンを用いた。メイラード反応の様子は SDS-PAGE により確認し、ドットブロット法により、トロポミオシン認識抗体との相互作用を評価した。モデルマウスには C3H/HeJ(♀、8-10 週齢)を用いた。アラムアジュバントと共に、エビアレルゲンタンパク質を週 2 回、4 週間の腹腔内投与することにより感さし、エビに対してアレルギー症状を示すモデルマウスを作成した。このモデルマウスに、アレルゲンタンパク質を投与することにより、発症を促し、投与したタンパク質のアレルゲン性を評価した。評価は血中ヒスタミン濃度の上昇およびこれの抑制効果により行った。

[結果および考察]
　メイラード反応の条件を確認したところ、単糖類のリボースおよびグルコースは比較的反応が早く進み、60℃の加熱条件下、7 時間程度で十分反応が進むのに比べ、多糖類のガラクトマンナンでは、60℃の加熱条件下、1-2 週間の時間がかかることがわかった。ドットブロット法では、メイラード反応が進むと、トロポミオシン認識抗体の認識能が低下することが示された。アレルギー化したマウスを用いた試験では、アレルゲンタンパク質をメイラード反応により化学修飾すると、血中へのヒスタミン放出が抑制され、エビタンパク質が低アレルゲン化されていることを示すものであった。

Maillard reaction, Prawn allergy

講演番号：3F28a11
講演日時、会場：3 月 28 日 11:10～ F 校舎 28 会場

マイクロバブルによるカット野菜の除菌・洗浄方法の開発

Application of ozone micro-bubble water for cut vegetable washing system.

杉浦 舞[1]、○中居 久拓[1]、高橋 正好[2]、畠山 俊穂[3]、千賀 淳哉[4]、菰田 俊一[1] ([1]宮城大食産業、[2]産総研、[3]畠山電気商会、[4]デザインココ)
Mai Sugiura[1], ○Hisahiro Nakai[1], Masayosi Takahashi[2], Toshio Hatakeyama[3], Junya Chiga[4], Toshikazu Komoda[1] ([1]Miyagi Univ., [2]AIST, [3]Hatakeyama Electricity, [4]Design COCO)

[背景・目的]

本研究では、オゾンマイクロバブルを利用したカット野菜新規洗浄法の開発及びその評価を行った。カット野菜製造工場など、産業レベルで野菜を洗浄する際には、食中毒菌を含む微生物を除去することを目的として、次亜塩素酸を含む洗浄液で除菌・洗浄を行うことがある。生野菜の安全性を確保する上で、微生物を除去することは重要なことであり、これには次亜塩素酸洗浄が大きな役割を果たしている。ただし、洗浄後カット野菜に塩素が残留すると、野菜が損傷ダメージを受けて品質が劣化したり、摂取したヒトへの健康障害が引き起こされたりすることが懸念されている。今回、検討課題としたマイクロバブルによる洗浄法は、既に排水処理や工業品の洗浄に実用化され、食品業界でも導入されつつある。マイクロバブルとは直径が 100μm 以下の微小気泡で気体の溶解性や強い洗浄効果を有するため、この特徴を活かし新たな洗浄方法を開発することにより、薬剤フリーカット野菜の開発が可能である。

[方法]

モデル野菜としてキュウリ、指標菌として納豆菌および大腸菌を選び、コロニーカウント法により洗浄前後で菌数がどのように変化したか評価した。指標菌は前培養により十分に培養後、これを生理食塩水で希釈してモデル野菜のキュウリに塗布することで 10^6–10^8CFU/g 程度に微生物汚染したキュウリを作成した。オゾンマイクロバブル水は、当グループで作成したオゾンマイクロバブル発生装置により作成し、既存洗浄法である、流水洗浄や次亜塩素酸洗浄との比較を行った。

[結果・今後の予定]

予備的な試験の結果、オゾンマイクロバブル洗浄により、汚染した指標菌を低減化できる可能性が示された。今回のモデルでは、既存の洗浄効果においても概ね洗浄効果は得られた。ただし、洗浄の効果はオゾンマイクロバブル水と次亜塩素酸による効果がほぼ同等であるのに対し、流水洗浄ではやや除菌効果が低いことも示された。現在、統計的に有意差を確認できるかどうか試験を繰り返し、確認作業を行っている。また、指標野菜の種類や指標菌による効果の違いなどの検討を行っている。

Ozone-microbubble, cut vegetable, washing system

講演番号：3F28a12
講演日時、会場：3 月 28 日 11:21～ F 校舎 28 会場

ヤーコンの Ca 処理による加熱・凍結時の物性の変化

Changes of texture and micro structure of yacon treated with Ca after heating and freezing process

倉 悠真、春田 直樹、○石田 信昭（石川県大食品）
Yuma Kura, Naoki Haruta, ○Nobuaki Ishida (Ishikawa Pref. Univ.)

【目的】ヤーコンはフラクトオリゴ糖やポリフェノールを多く含むため、甘みもあり機能性も期待される野菜であるが、貯蔵性が悪く利用にとっての妨げとなっている。また、冷凍貯蔵では、軟化と解凍後の褐変が問題となる。我々は、ヤーコンの冷凍貯蔵を目的として、加熱および凍結によるヤーコンの変化を検討してきている。ここでは、野菜の硬さを増すことが知られているCaで処理したときのヤーコンの物性変化について、レオメーターおよびNMR制限拡散測定などにより調べた。
【方法】3cmx3cmx1cmに切り出したヤーコンを、60～100℃で10分間加熱した後、-30℃のフリーザーに入れ7日間冷凍貯蔵後、室温で解凍して物性および細胞構造の変化を調べた。Ca処理は切り出した試料を、3%塩化カルシウム溶液に1時間浸漬することで行った。物性はレオメーターにより5mm陥入させた時の加重の変化で、細胞構造の変化はNMR（JEOL ECX400:400MHz）による細胞内の水の制限拡散の変化として捉えて比較した。制限拡散の測定は、各種処理をした試料を円柱状に切り抜き、径10mmのNMR試料管に入れ、拡散時間50ms～1sにおける見かけの拡散係数の変化を求めた。
【結果】ヤーコンは見かけはサツマイモのようであるが、含まれている多糖はデンプンではなくフラクタンであるため、加熱することによる軟化が少なく、加熱後もしゃきしゃきとした独特の歯触りを持つが、加熱温度が100℃に近くなるとこのような物性を失っていく。また、ヤーコンを凍結するとそのような物性はなくなりスポンジのような物性となる。Ca処理を行ったヤーコンでは、生での硬さは無処理のものと変わりなかったが、加熱による軟化はかなり抑えることができた。しかし、冷凍貯蔵後の解凍試料では効果がほとんど無く、処理をしていないものと同様に軟化が生じ、スポンジ状の物性となった。

このときの細胞破壊の様子をNMR制限拡散で調べると、生のヤーコン組織では拡散時間が長くなるにつれて見かけの拡散係数が低下していく制限拡散を示すが、加熱や凍結処理では制限拡散の程度が少なくなり、自由拡散に近づいていく。Ca処理を行ったヤーコンでは、加熱処理および凍結処理の両方で、無処理のものと制限拡散の状態はほとんど変わりなかった。加熱処理を行ったものでもレオメーターの結果と異なり、無処理のものと同様、加熱により自由拡散に非常に近くなった。

NMR制限拡散では細胞内の水の動きを見ているため、加熱や凍結による細胞膜の破壊による水の自由拡散捉えている。Ca処理による細胞壁の変化は、このような水の拡散に影響を与えていないと考えられた。

Yacon, Freezing, NMR

講演番号：3F28a13
講演日時、会場：3 月 28 日 11:32～ F 校舎 28 会場

デンプン系食品の冷凍解凍に伴う品質劣化挙動の解析

Analysis of the retrogradation behavior of starchy food during freeze-thawed procedure

○羽山 耕平、石川 大太郎、藤井 智幸（東北大農）
○KOHEI HAYAMA, DAITARO ISHIKAWA, TOMOYUKI FUJII (Tohoku Univ.)

緒言

デンプン系食品においては、保存中の品質劣化の一つとして硬化に伴う食味の低下が問題となる。特に、冷凍棒寿司においては、硬化のみならず白濁化によっても商品価値を失ってしまう。実際のデンプン系食品では、保存性を高めるために添加物を添加する場合が多いが、品質変化を体系的に把握するには至っていない。本研究では、デンプン系食品の冷凍解凍時の品質変化の指標として白濁化、硬化及び離水に着目し、米デンプン及び米粉ゲルを調製し、品質劣化の挙動を実験的に検討した。

材料及び方法

試料は、米デンプン（上越スターチ製）及び米粉（登米ライスサービス製）を用いた。加水後 90℃で糊化させた後、冷却してゲル試料を調製した。その後－25℃で 24 時間冷凍した。冷凍ゲル試料を 10℃で解凍させ貫入試験を行うとともに、濁度及び離水率を測定した。貫入試験では水分含量を約 70%とし、濁度及び離水率測定では 92%とした。添加物として大豆発酵素材を選び、添加量は試料重量に対して 4.5%とした。サンプルは、すべて 3 連調製し、添加物と同量の水を添加した無添加試料を対照とした。

結果及び考察

米デンプンゲル試料の 500－900nm での透過率は、波長の増加に伴って単調に増加し、白濁が散乱によるものと考えられた。透過率の波長依存性は 1－T/100=K・λ^n（λ=波長、K=散乱係数）を用いて良好に記述することができ、指数 n が－0.03～－0.06 とゼロに近い値となったことから、架橋点と考えられる散乱体が波長と同程度以上のサイズであることが示唆された。20%貫入時応力は、無添加系の場合、解凍後 72 時間までに 2 倍程度まで増加する傾向を示したのに対し、濁度はそれほどの変化は認められなかった。このように、顕著に白濁するほど構造化していなくても、硬くなっていく挙動が示された。

大豆発酵素材を添加したゲル試料については、指数 n は－0.3～－0.6 の値となり、20%貫入時応力は解凍後 72 時間まで増加しなかった。離水率は、無添加系と比べて増加したが、経時的な変化は認められなかった。米粉ゲル試料においても 20%貫入時応力は、米デンプンゲル試料の場合と同様に、添加剤添加系では解凍後増加しなかった。以上の結果から、添加剤をデンプン系試料に 4.5%程度添加することで、解凍後の硬化が抑制されることが示された。

Retrogradation, Rice starch, Storage stability

講演番号：3F28a14
講演日時、会場：3 月 28 日 11:43～ F 校舎 28 会場

餡粕熱水抽出物の冷凍食品の物性に対する効果

Effect of hot water extract from smooth sweet bean paste curd on the physical properties of frozen food

○田川 絵理[1]、浦 真由美[1]、片倉 啓雄[1,2]、河原 秀久[1,2] ([1]関西大化学生命工、[2]関西大先端機構)
○ERI TAGAWA[1], MAYUMI URA[1], YOSHIO KATAKURA[1,2], HIDEHISA KAWAHARA[1,2] ([1]Kansai Univ., [2]ORDIST)

【緒言】地球上の生物圏のうち約 80%は、5℃以下の低温環境下にある。多くの低温生物は低温から身を守るために、体内にグリセロールやトレハロースを蓄積したりするほかに、ある特定の生物は、細胞内外に不凍タンパク質（AFP）を生産する戦略を獲得した。AFP は氷形成が起きた後の制御であるが、氷核形成を阻害する物質を生産する戦略も獲得した。この物質は過冷却促進物質と呼ばれ、針葉樹カツラの樹木木部柔細胞に存在するポリフェノール、ケンフェロール-7-グルコシドが同物質で、過冷却温度を低下させることが報告されている[1)]。我々の研究室では、クローブ[2)]やヒノキ[3)]由来のポリフェノールも同活性があることも報告している。しかし、これらを食品分野への応用を考慮すると安価に製造できるものが求められていた。これまでに、こし餡粕の熱水抽出物に過冷却促進物質が存在することを発見し、その活性成分について研究を進めてきた。そこで、今回は、餡粕エキスを用いて冷凍食品への応用試験について検討を行った。
【方法】過冷却促進活性(抗氷核活性)は微水滴凍結法を用い、1 mg/ml に懸濁したヨウ化銀溶液 0.9 ml に水あるいはサンプル 0.1 ml 添加し、振とう後、核形成温度を測定し、両温度差を活性値(℃)とした。餡粕エキスは、100℃、30 分間熱水抽出後、ろ過し、ろ液を分子量 3000 以下で分画して調製した。
【結果】餡粕エキスは 8.0 mg/ml で約 3.0℃の活性を示した。絹ごし豆腐 1.5～2.0cm 四方の立方体に切断し、水、餡粕エキス 0.1%溶液、カネカ不凍タンパク質 0.1%溶液に一晩浸けて、水気を切り、-20℃で 1 ヶ月間冷凍した。その結果、餡粕エキス 0.1%溶液はドリップ量（0.1%）を軽減した（ブランク 6.8%）。カネカ不凍タンパク質 0.1%ではドリップ量を軽減できなかった。次に、凍結乾燥後のすの面積を比較検討した。その結果、ブランクは 72.6%に対し、餡粕エキスで処理した場合、54.6%に軽減していた。次に凍結解凍速度の影響についても検討を行った。その結果、ブランクは急速凍結・緩慢解凍では、凍結乾燥後のすが大きいのに対し、餡粕エキスでは同条件でもすの面積を軽減している効果を確認できた。なぜこのような効果があるのかも現在解析中である。さらに、冷凍うずら卵への効果についても検討を行った。ブランクは冷凍前後で最大荷重 1.7 N から 3.7 N に変化したが、餡粕エキス処理した場合、冷解凍後に 1.3 N を示した。うずら卵の固化を妨げることが明らかになった。
【参考文献】1)Kasuga J., *et al*, *Cryobiology*, **60,** 240-243, (2010). 2)Kawahara H., *et al*, *J. Antibact. Antifung. Agents*, **24,** 95-100 (1996). 3)Kawahara H., *et al*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **64**, 2651-2655 (2000).

adzuki bean, supercooling facilitationg, frozen food

講演番号：3F28p01
講演日時、会場：3 月 28 日 14:00～ F 校舎 28 会場

DNA アプタマーを用いた on-site かつ real-time に検出可能な新規カフェインセンサーの開発
Development of a real-time and label-free caffeine sensor using DNA aptamer

○森田 悠治[1]、冨田 康之[1]、菅 裕明[2]、藤原 大介[1] ([1]キリン・基盤研、[2]東大院理)
○Yuji Morita[1], Yasuyuki Tomita[1], Hiroaki Suga[2], Daisuke Fujiwara[1] ([1]Kirin Co., Ltd., [2]The University of Tokyo)

【目的】
近年、世界中で健康意識の高まりとともに飲食品中のカフェイン含有量に対して関心が高まっており、カフェイン含有量の少ないカフェインオフ飲料開発が進んでいるほか、消費者自身が飲食品のカフェイン量をチェックするというニーズも顕在化しつつある。カフェイン量の測定は、一般的には高度な機器分析を要するため、簡易検出系の構築が切望されている。そこで、我々は抗体が取得しにくい低分子ターゲットでも認識でき、ハンドリングや生産の容易さから次世代抗体として注目される核酸分子“アプタマー”を検出系に利用することを試みた。我々は世界で初めて低分子化合物・カフェインに対するDNAアプタマーを取得し、アプタマーと金ナノ粒子の相互作用を利用することで簡易検出可能な新規カフェインセンサーの構築に成功したので報告する。
【方法と結果】
カフェインを固定化した磁気ビーズに対して約1×10^{14}種類の多様性を持つDNAライブラリを供し、SELEX法を用いてカフェインアプタマーのセレクションを実施した。11サイクルのセレクションを行った核酸プールには2種類のクラスの配列が濃縮していることが分かった。表面プラズモン共鳴分析等の各種結合アッセイを行った結果、両クラスのアプタマー配列ともカフェイン結合能を持つことが確認された。さらに、カフェイン結合能を指標に配列の最適化を行い、71塩基長から32塩基長まで配列を短縮化することに成功した。最適化されたカフェインアプタマーのKd値は700 nMと、十分センサーになり得る感度を有していることが示唆されたため、検出系開発を試みた。アプタマーと相補鎖を利用したカフェイン応答スイッチを設計、構築し、金ナノ粒子との相互作用を利用することによって簡易に検出出来るセンサーを開発した。開発した新規カフェインセンサーはカフェイン濃度依存的に吸光度変化を示し、目視による検出も可能であった。また、反応時間も10分と非常に短く、カフェイン高感度簡易検出系として機能することが明らかとなった。
【結論】
本研究では取得が難しい低分子化合物であるカフェインに強固に結合するDNAアプタマーの取得に成功した。さらに、取得したDNAアプタマーと金ナノ粒子を応用し、簡便にカフェインを検出可能な新規カフェインセンサーを世界で初めて開発した。今後、ますます増大する消費者のカフェインに対する関心にこたえるための応用が期待される。

caffeine, aptamer, sensor

講演番号：3F28p02
講演日時、会場：3 月 28 日 14:11～ F 校舎 28 会場

蛍光指紋を用いた黒胡椒の産地判別

Discrimination of the geographic origin of black peppers using fluorescence fingerprint

○今井 真介[1]、天明 裕介[1]、鎌田 庸宏[1]、蔦 瑞樹[2]、藤田 かおり[2]、杉山 純一[2]([1]ハウス食品グループ本社、[2]農研機構　食品産業研究所)
○Shinsuke Imai[1], Yusuke Temmei[1], Yasuhiro Kamata[1], Mizuki Tsuta[2], Kaori Fujita[2], Junichi Sugiyama[2] ([1]House Foods Group Inc., [2]NARO NFRI)

【目的】

ホールスパイスを輸入し小分けや袋詰めして販売する場合、栽培国を原産国として表示することになっている。しかし、産地判別の分析法は、品種判別法などに比べて確立されていない。そのため、簡単で精度の高い分析方法の開発は、誤表示を減らす意味からも望まれている。産地判別では無機元素組成や安定同位体比に基づく分析が一般的に行われているが、それらよりもっと簡便な蛍光指紋(励起波長、蛍光波長、蛍光強度からなる 3 次元のデータセット)による産地判別方法が、杉山らによって近年報告された。そこで、我々はこの技術を用いて、黒胡椒の産地判別が可能か、検討を行った。

【方法】

・日本国内で流通量が多い 5 カ国（ベトナム、インド、インドネシア、マレーシア、スリランカ）で栽培された黒胡椒をそれぞれ入手した。同一国内でも、産地や収穫年の違うものは別サンプルとして収集した（全 40 サンプル以上)。
・蒸気処理した黒胡椒を粉砕後、目開き 300μm の篩にかけ通過した粉末を得た。この粉末 250 mg を打錠して作製したペレットを、測定サンプルとした。1 サンプル当り 5 個の測定サンプルを作製し測定データを得た。
・測定サンプルの蛍光指紋は、分光蛍光高度計 F-7000（日立ハイテクノロジーズ）で測定した。(Ex 200-800 nm, Em 400-850 nm, Cut filter 395 nm)
・多変量解析ソフト(JMP9)を用い、判別分析を行った。1 サンプル当り 5 個の測定データをキャリブレーション用とバリデーション用に分けた。キャリブレーション用データで判別式作成を行った。バリデーション用データを産地未知のサンプルとして扱い、作成した判別式で産地判別を試みた。

【結果】

1．入手した黒胡椒の中には、蒸気処理したものとしていないものが存在し、この蒸気処理の有無が蛍光指紋に影響することが分かった。この蒸気処理の有無の影響は、履歴が不明なサンプルも含め、全てのロットの黒胡椒を蒸気処理してから粉砕・測定することで減らすことができた。
2．5 カ国の産地を一度に判別するのではなく、1 カ国ずつ順番に「その産地か否か」を見分ける判別式を作成した結果、90%以上の測定データが、正しい産地と判別できた。

geographic origin, black pepper, fluorescence fingerprint

講演番号：3F28p03
講演日時、会場：3 月 28 日 14:22～ F 校舎 28 会場

近赤外分光法による茶の非破壊測定

Non-destructive measurement of the various teas by near infrared spectroscopy

○岡本 由希[1]、山下 まゆ美[2]、簗舘 香澄[3]、内山 裕美子[4]、加藤 みゆき[5]([1]和洋女大、[2]高崎商科短大、[3]大妻女大、[4]味香研、[5]香川大)
○ Yuki OKAMOTO[1], Mayumi YAMASHITA[2], Kasumi TUKIDATE[3], Yumiko UCHIYAMA[4], Miyuki KATOH[5] ([1]Wayo Women's Univ., [2]Takasaki Univ. Commerce Junior College, [3]Otsuma Women's Univ., [4]T and A Inst., [5]Kagawa Univ.)

【目的】本研究は，茶の品質にかかわる成分であるカテキンに代表される総ポリフェノールおよびうま味に代表される総アミノ酸について，非破壊測定法の一つである近赤外分光法を用いて，簡便かつ短時間に測定する方法を検討することを目的としている．
【方法】試料には，日本国内で生産された普通煎茶，深蒸し茶，かぶせ茶など 285 種類の茶を用いた．近赤外分光法は，それぞれの茶葉を小型シャーレ(直径 20mm，高さ 16mm)に入れ，近赤外分光装置(Carl Zeiss 社製，波長領域 950～1700nm)を用いて，プローブから出る光を直接試料に照射して反射光の測定を行った．なお，測定は外光および室温の影響のない 25℃に設定した暗箱内で行い，リファレンスには白色セラミック板を用いた．近赤外分光法によって得られたスペクトル R の逆数の対数 log(1/R)を求め，PeakFit (ヒューリンクス社製)を用いて各波長における 2 次微分値を求めた．
近赤外分光法によるスペクトルの測定と同時に，総ポリフェノールおよび総アミノ酸量の定量を行った．試料用茶葉 3g に熱湯 200ml を入れ，3 分間静置し抽出した後，ろ過したろ液の上清を用いた．総ポリフェノール量は，酒石酸鉄法により 540nm の吸光度を測定した．総アミノ酸量は，ニンヒドリン法を用いて，570nm の吸光度を測定した．近赤外分光法により得られた 2 次微分スペクトルと比色によって定量した総ポリフェノール量の値が対応している波長領域の検索を行った．総ポリフェノール量と同様に，総アミノ酸量についても，総アミノ酸量の値と対応する波長領域の検索を行った．
【結果】総ポリフェノールおよび総アミノ酸量の比色により得られた定量結果と，近赤外分光法により得られたスペクトル R の逆数の対数 log(1/R)の 2 次微分値を合わせて解析した結果，それぞれの定量値を示していると考えられる波長領域を検索することができた．最も一般的な緑茶である普通煎茶において，1390nm 付近のスペクトルを解析したところ，総ポリフェノールの定量値との相関が高かいことがわかった．波長領域が示している吸収バンドの化学的帰属は今のところ不明であるが，この波長領域を解析することで，茶の総ポリフェノール量を簡便に推定することが可能であることがわかった．総アミノ酸量についても，茶種ごとおよび茶種を通して解析を行った．
これらのことから，近赤外分光法により，茶の試料の総ポリフェノールおよび総アミノ酸量を簡便かつ短時間に非破壊測定できるので，茶の品質評価などにおける多試料の分析が必要な場合などのルーチン分析にも応用可能であることが示唆された．

near infrared spectroscopy, polyphenols, amino acids

講演番号：3F28p04
講演日時、会場：3 月 28 日 14:33～ F 校舎 28 会場

フーリエ変換型近赤外分光法による清酒の精米歩合予測モデルの構築

Development of prediction model for "*seimai-buai*" by FT-NIR

○福田 泰弘[1,2]、磯谷 敦子[1,3]、岩下 和裕[1,3]、馬場 健史[1,2]、福崎 英一郎[1,2] ([1]日本農芸化学会、[2]大阪大工、[3]酒類総合研究所)
○Yasuhiro FUKUDA[1,2], Atsuko ISOGAI[1,3], Kazuhiro IWASHITA[1,3], Takeshi BAMBA[1,2], Eiichiro FUKUSAKI[1,2] ([1]JSBBA, [2]Osaka Univ., [3]National Research Institute of Brewing)

清酒は，日本の伝統的な酒であり，米を麹菌や酵母を用いて発酵させることによって作られる．玄米の表層部分には清酒の風味を悪くする成分が多く含まれるため，まず表層部分を削り取る必要がある．この工程を精米といい，精米して得られた白米の元の玄米に対する質量パーセントを「精米歩合」という．国税庁は清酒の製法品質表示基準によって，特定名称を表示する場合の基準を定めており，その一つに精米歩合が定められている．しかし，これまで製品（清酒）から精米歩合を推定することは難しく，清酒成分からの精米歩合を予測する方法が望まれている．先行研究において，清酒に含まれる親水性不揮発性低分子により精米歩合を推定できる可能性が示された（三村，2014）．しかし，実用化には，よりハイスループットな分析法が望ましい．そこで，分析時間が短くサンプルの前処理が容易な Fourier Transform Near-Infrared Spectroscopy（FT-NIR）による清酒の精米歩合予測モデル構築を本研究の目的とした．精米歩合の異なる 31 サンプルの特定名称酒について，未処理の清酒及びそれらの凍結乾燥物を超純水で再溶解したものを FT-NIR に供した．得られた波形データから吸光度を説明変数，精米歩合を応答変数として Orthogonal Projections to Latent Structures (OPLS) を用いて予測モデルを構築した．モデルの精度の比較には Root Mean Square Error of the Estimation (RMSEE)と Root Mean Square Error of Prediction (RMSEP) を用いた．さらに，精米歩合の予測モデル構築に寄与している成分情報を得るために，清酒を凍結乾燥処理し，誘導体化した後に，GC/MS により分析した．同定された化合物と，サンプルに共通して検出された未同定化合物の信号強度を用いて，精米歩合の OPLS 予測モデルを構築した．まず、各処理を施した清酒の FT-NIR のデータを用いて精米歩合の OPLS 予測モデルを構築したところ, 2 倍の濃縮倍率で再溶解した場合に RMSEE と RMSEP は 4.85 と 4.79 と最も小さくなった。本値は 10 %の精米歩合の違いを評価に耐えうると考えられ．一方，GC/MS 分析では 97 種類のピークを検出し，そのうち 72 種類を同定した. 得られた 97 種類の成分データを用いて予測モデルを構築したところ, RMSEE と RMSEP はそれぞれ 2.72 と 6.19 となった. 2 倍の濃縮倍率で再溶解した場合の FT-NIR データで構築した予測モデルの RMSEP の方が GC/MS データで構築した予測モデルよりも良好な値を示した．続いて，O2PLS により FT-NIR と GC/MS のデータ間の相関を解析したところ，GC/MS によるモデルで VIP 値の高い化合物と相関の高い波数領域があることが確認された. これらの波数が FT-NIR による精米歩合の予測モデル構築に大きく寄与していると考えられる. さらに，サンプルの前処理をせずに FT-NIR データから精度の高い予測モデルを構築するために,説明変数の選択方法を検討した．その結果，4000~4999 cm^{-1} の領域を用いて構築したモデルの RMSEE が 4.96 と最も小さく良好な値を示したが，2 倍の濃縮倍率で再溶解した場合のモデルに比べると劣っていた．本研究で構築した清酒の精米歩合の予測モデルは，スループットが求められる現場での精米歩合の評価に貢献すると考えられる．

Japanese sake, ft-nir

講演番号：3F28p05
講演日時、会場：3 月 28 日 14:44～ F 校舎 28 会場

分光法融合による泡盛の多面的かつ迅速な品質評価法に関する基礎的研究

Spectroscopy Fusion for the Rapid Assessment of Multiple Attributes of Awamori

○蔦 瑞樹[1]、平良 英三[2]、塚原 正俊[3]、塚原 恵子[3]、粉川 美踏[1]、トリヴィッタヤシル ヴィパヴィ[1]、吉村 正俊[1]、藤田 かおり[1]、杉山 純一[1]([1]農研機構食総研、[2]琉球大農、[3]（株）バイオジェット)
○ Mizuki TSUTA[1], Eizo TAIRA[2], Masatoshi TSUKAHARA[3], Keiko TSUKAHARA[3], Mito KOKAWA[1], Vipavee TRIVITTAYASIL[1], Masatoshi YOSHIMURA[1], Kaori FUJITA[1], Junichi SUGIYAMA[1] ([1]National Food Research Institute, NARO, [2]Univ. Ryukyus, [3]Biojet Co. Ltd.)

【目的】泡盛は沖縄で独自に発展した蒸留酒で, 600 年以上の歴史を有する日本最古の蒸留酒でもある. 中でも, 長期熟成させた泡盛は「古酒（クース)」と呼ばれ, 芳醇な香りとまろやかな甘みにより古来より珍重されている. また, 沖縄には 40 を超える泡盛醸造所があり, 醸造所や蒸留方法, 熟成期間の違いによりその品質は多岐にわたる. しかし, ウイスキー等の他の蒸留酒や日本酒と比べて泡盛に関する科学的な知見は少なく, 客観的な品質評価法の開発が求められている. そこで本研究では, 簡易かつ迅速・非接触で対象を分析可能な分光法に着目し, 泡盛の品質を多面的に評価する方法について基礎的な検討を行った.

【方法】本研究では蛍光指紋法と赤外分光法に着目した. 蛍光指紋は,「試料に照射する励起波長」「試料から発せられる蛍光波長」「試料の蛍光強度」からなる 3 次元データで, 物質に固有の電子励起及び・蛍光発光を反映したパターンを示す. また, 赤外分光スペクトルは分子の官能基による光吸収を反映し, 成分同定が容易, 無蛍光の水やアルコールによる光吸収を測定可能といった特徴を持つ.

実験には酒造所, 蒸留方法, 熟成期間の異なる 39 種類の泡盛を供試した. 全てをアルコール濃度 10%に調整した後, 分光蛍光光度計により励起波長 230-450 nm, 蛍光波長 250-500 nm, 波長間隔 2.33 nm にて蛍光指紋を計測した. また, FTIR 型赤外分光装置を用い, 同一試料の赤外分光スペクトルを 400-4000 cm^{-1}, 1.93 cm^{-1} 間隔で計測した. 得られたデータについて (1) 蛍光指紋, 赤外分光スペクトルそれぞれに対する主成分分析, (2) (1) で得られた蛍光指紋, 赤外分光スペクトル双方の主成分スコアに対する正準相関分析を行い, それぞれで得られたスコアの散布図について検討を行った. なお, 正準相関分析では, 2 セットの主成分スコアの相関が最大となるように正準スコアが算出されるため, 得られた正準スコアには蛍光指紋と赤外分光スペクトル両方の情報が重畳していると考えられる.

【結果】蛍光指紋から得られた主成分スコアの散布図では, 貯蔵期間が 3 年以上と 3 年未満の試料がそれぞれ異なるクラスターを形成したが, 試料数点が実際の区分と異なるクラスター内部に位置しており, 両者の明確な判別は困難と考えられた. 赤外分光スペクトルの主成分スコアではクラスター形成は見られなかった. 一方, 蛍光指紋から得られた正準スコアの散布図では, 両者の分離がより明確となった. また, 常圧蒸留と減圧蒸留の違いも明確に識別可能であった. 以上より, 蛍光指紋法と赤外分光法を用い, 両者の持つ情報を融合することにより, 泡盛の品質を多面的かつ迅速に評価できる可能性が示唆された.

Fluorescence Fingerprint, Infrared Spectroscopy, Multivariate Analysis

講演番号：3F28p06
講演日時、会場：3 月 28 日 15:05～ F 校舎 28 会場

加熱後の位相速度変化量にもとづくミルクコーヒー沈澱発生の迅速判定

Rapid detection of precipitation in milk added coffee after heating using a change in ultrasonic phase velocity

○田丸 竜万、石川 奈奈、西津 貴久、勝野 那嘉子、後藤 清和（岐阜大・応生）
○Ryuma TAMARU, Nana ISIKAWA, Takahisa NISHIZU, Nakako KATSUNO, Kiyokazu GOTO (Gifu Univ.)

【目的】ミルク入りの缶コーヒーは自動販売機内での長期間の高温曝露や温度変動により凝集沈殿を生じる場合がある。この凝集物は乳タンパクと多糖類からなると推定されており，加熱処理を経ることで生じるようになる。工業的生産においてカゼインナトリウムをはじめとした安定剤などを適正量添加することにより沈殿を抑制することが行われている。沈殿の発生有無の確認には 1 ヶ月程の時間が必要になることもあり，より短時間で安定性を確認する手法を確立することにより缶コーヒーの製品開発期間が短縮されることが期待される。当研究室では，ミルク入り缶コーヒーの経時的な沈殿発生現象について，超音波位相速度測定による迅速な予測の可能性について検討を行ってきた。本研究では，加熱処理がミルクコーヒーの超音波位相速度に与える影響について実験的に検討した。
【実験方法】安定剤としてカゼインナトリウムを用い，添加量を 0～0.2 wt%の範囲に調製した未加熱のミルクコーヒー，およびレトルト殺菌処理を施したミルクコーヒーを調製し，超音波位相速度を測定した。またあわせて振動 U 字管式密度計により試料密度を測定した。
【結果・考察】加熱処理を施すことによりミルクコーヒーの超音波位相速度は増加した。沈殿抑制が確認されている濃度範囲では沈殿抑制がない範囲と比べて，加熱前後での位相速度の差が減少した。一般に位相速度は媒質の密度と圧縮率に依存する。以前の実験結果から，ミルクコーヒーの位相速度は沈殿物の圧縮率の影響を受けることが明らかになっている。従って，加熱による位相速度増加の抑制は，速度増加の要因である沈殿の発生が抑制されているためであると考えられる。以上の結果から，加熱前後の超音波位相速度測定はミルク入り缶コーヒーの安定性評価に有効な方法であるものと考える。

ultrasonic phase velocity, coffee precipitation, heating

講演番号：3F28p07
講演日時、会場：3 月 28 日 15:16～ F 校舎 28 会場

電気インピーダンス法によるレトルトパウチ封入食品の加工程度の非破壊計測

Non-destructive measurement of processing degree of retort pouched food by electrical impedance method

○岡本 拓海、川井 清司、羽倉 義雄 (広大院生物圏科学)
○Takumi Okamoto, Kiyoshi Kawai, Yoshio Hagura (Hiroshima Univ.)

【緒言】嚥下や咀嚼の機能は加齢とともに低下する．そのため，高齢者人口の増加に伴い，咀嚼・嚥下困難者の数も増加している．咀嚼・嚥下困難者食には簡便性や保存性に優れたレトルト食品として提供されるものが多く，硬さや飲み込み易さなどの物性に関する表示が求められている．詳細な物性に関する表示を行うためには製品間の物性のバラつきを評価し，製品ごとに表示を行う技術の開発が必要である．さらに，全数検査を行う場合は，非破壊計測が求められる．そこで本研究では，電気インピーダンス法を用いて，レトルト食品の加工程度，特に硬さを容器外部から非破壊で評価する方法の確立を目指した．本報告では，食品包装容器(レトルトパウチ)がインピーダンス測定に与える影響について検討し，さらに，容器外部からの食品の硬さの測定を試みた．

【実験方法】

実験試料:縦 60mm×横 120mm×厚さ 2mm に成形した豚肉ミンチ 30g を 5%食塩水 25mL と共にレトルトパウチに入れ，脱気密封し，冷蔵庫内で温度を均一にしたものを実験試料とした．

インピーダンス測定及び硬さ測定:試料を 90℃の恒温槽内で加熱し，加熱過程における豚肉のインピーダンス変化を平行平板電極を接続した LCR メータを用いて計測した．さらに同様の方法で試料の加熱を行い，任意の加熱時間毎に取り出し，直ちに流水で冷却した．この試料の硬さを直径 2mm の円柱状プランジャーを用いて 60mm/min の貫入速度で測定した．

【実験結果】

インピーダンス測定に及ぼす食品包装容器の影響:レトルトパウチの存在が豚肉のインピーダンス測定へ与える影響について検討した．加熱時間が異なるパウチ入り試料とパウチから取り出した試料のインピーダンスの周波数特性(1kHz～100kHz)を測定した．その結果，レトルトパウチの影響が現れる周波数域とパウチ内の食品(豚肉)の影響が現れる周波数域が存在し，パウチ内の食品の加熱による変化のみを検出できることが明らかとなった．

食品包装容器外部からの食品の硬さ測定:インピーダンスと硬さは共に加熱開始から約 50 分までの間増加し，その後，減少する傾向を示した．インピーダンスと硬さの相関性を検討したところ，両者の間には良好な相関関係が認められた． 以上の結果より，レトルトパウチ内の食品の加熱過程における食品の硬さを電気インピーダンス法を用いて，非破壊・連続的に計測できる可能性が示唆された．これはパウチ内の食品を任意の硬さに調理するための加熱時間の制御に利用できる可能性がある．

non-destructive measurement, retort pouched food, electrical impedance

講演番号：3F28p08
講演日時、会場：3 月 28 日 15:27～ F 校舎 28 会場

静的および動的弾性率を用いた未開封レトルトパウチ食品の非破壊硬さ測定

Non-destructive measurement of unopened pouch food using static and dynamic elastic moduli

○田添 由真[1]、川井 清司[2]、羽倉 義雄[2] ([1]広大生物生産、[2]広大院生物圏科学)
○yuma tazoe[1], kiyoshi kawai[2], yoshio hagura[2] ([1]App. Bio. Sci., Hiroshima Univ., [2]Biosphere Sci., Hiroshima Univ.)

【背景・目的】近年、高齢者の人口増加に伴い、介護食や咀嚼・嚥下困難食の需要が高まっている。従来の介護食は、病院や介護施設で個々に調理される刻み食やミキサー食が主流であったが、在宅介護の増加に伴い、自宅で簡便に利用可能で、保存性が高く、常温流通が可能なレトルトパウチ介護食品の開発が進められてきている。また、介護食品ではユニバーサルデザインフードなどの「硬さ」や「粘度」を規格とした商品表示が行われている。しかし、原料の個体差などに由来する「硬さ」のばらつきを正確に表示することは現状では行われていない。これは、個々のレトルトパウチの中身の硬さを測定する手法が確立されていないことが原因である。そこで本研究では、レトルトパウチを開封することなく、レトルトパウチ内の食品の硬さを非破壊で計測する手法の確立を目指すことにした。具体的には、加熱条件の異なる食品の破断応力（硬さ）と非破壊測定値（静的ヤング率および動的粘弾性のパラメータ）との関係を明らかにした。さらにレトルトパウチによる包装の有無が非破壊測定に与える影響を検討した。また、レトルトパウチ入り食品では固体（食品）と液体（餡やルー）が含まれていることから、これらの混合比率が測定値に及ぼす影響も検討した。
【方法】実験試料として市販のダイコンを使用した。直径 35㎜、厚さ 20㎜ に成形した円柱状のダイコンを 90℃の水で、任意の時間（0～360 分）加熱し、加熱終了後、直ちに冷水で冷却したものを未包装試料とした。さらに、未包装試料を任意の量の蒸留水（0ml～200ml）と共に封入したレトルトパウチ封入試料を作製した。材料物性（破断応力、ヤング率）の測定には、レオメーター（サン科学 CR-500DX）を使用し、加熱時間が異なる未包装試料及びレトルトパウチ封入試料の材料物性を測定した。動的粘弾性の測定では、材料試験機（島津製作所 AGS-H）にロードセルと変位計を設置し、試料に三角波による繰り返し荷重を加え、変位との関係をリサージュ図として描き、動的粘弾性（貯蔵弾性率、損失弾性率、損失正接）を読み取った。
【結果・考察】任意の封入水量のレトルトパウチ試料のヤング率は、封入水量に関わらずほぼ同じ値を示した。これはヤング率がレトルトパウチ内の水量の影響を受けず、固体と液体の混合比率が測定値に影響を及ぼさないことを示唆している。また未包装試料では、ダイコンの加熱時間が長くなるほど破断応力、ヤング率とも減少した。同様にレトルトパウチ封入試料のヤング率、貯蔵弾性率も加熱時間と共に減少した。未包装試料の破断応力とレトルトパウチ封入試料のヤング率、貯蔵弾性率に相関関係があることから、レトルトパウチ入り食品の硬さを非破壊で測定出来る可能性が示唆された。

Hardness, Elastic modulus, Pouch food

講演番号：3F28p09
講演日時、会場：3 月 28 日 15:38～ F 校舎 28 会場

嚥下調整食の開発を目的とした食品の飲み込みやすさを評価する系の構築

Evaluation system to reduce the time of swallowing for development of a dysphagia-preventing diet

○茅沼 友希[1]、上田 玲子[1]、南 道子[2]、石丸 喜朗[1]、阿部 啓子[1]、朝倉 富子[1] ([1]東大農、[2]東京学芸生科)
○Yuki KAYANUMA[1], Reiko UEDA[1], Michiko MINAMI[2], Yoshiro ISHIMARU[1], Keiko ABE[1], Tomiko ASAKURA[1] ([1]Tokyo Univ., [2]Tokyo Gakugei Univ.)

（背景・目的）近年、高齢者の誤嚥による肺炎が増加傾向にあり、高齢化が進んでいる日本において嚥下しやすい食品開発への社会的ニーズが高まっている。嚥下しやすい食品、つまり嚥下調整食（誤嚥防止食）の分類は、感覚的な指標および食品の物理的特性の測定によって行われているが、摂食者の咽頭を通過する際の刺激を数値化するような評価は含まれない。そのため、嚥下調整食の飲み込みにくさを、生体側の応答を指標として評価をすることが難しいのが現状である。本研究では、まず官能評価により飲み込みにくさに寄与するテクスチャー用語を探索し、さらに生体側の応答を、表面筋電位計を用いて観測し、飲み込みにくさの客観的評価を試みた。
（方法）市販介護食品 54 種類とテクスチャー68 用語について、試料提示による認識度のアンケート調査を実施し、取得データに対応分析を適用して、代表的評価試料 10 品と評価用語 10 語を絞り込んだ。選抜した 10 種類の食品に対して感じるテクスチャー及び飲み込みにくさの強度について 47 名のパネルで 9 段階尺度（-4～0～+4）を用いた採点法による官能評価を実施した。次に、10 名のパネルで各食品 3g を嚥下する際のオトガイ舌骨筋の筋電位を表面筋電位計 P-EMG plus を用いて測定した。筋電位は筋電図（波形）として出力され、この波形の面積である積算値が食塊による咽頭への物理的な負荷を示すとされている。官能評価による飲み込みにくさの程度とテクスチャーの種類、飲み込みにくさと筋電位から求めた積算値についてピアソンの積率相関係数を求めることで相関性を検討した。なお、年齢や障害の度合いによる差異を除くため、今回は健常一般人をパネルとして用いた。
（結果・考察）「飲み込みにくい」と 10 個の用語間の相関係数(r)から、「舌に残る」は r=0.76 (p=0.011)で有意な正相関が認められ、「汁気が多い」、「なめらか」は、それぞれ r=-.077(p=0.010, r=-0.65(p=0.040)で、有意な負相関が認められた。誤嚥防止食の開発において、「飲み込みにくい」の指標として、これらの具体的なテクスチャーを活用できる可能性が示唆された。また、「飲み込みにくい」の官能値と「筋電位の積算値」間との相関係数は、r=0.70(p=0.024)で有意な正相関が認められた。このことから、表面筋電位計を用いて食品の飲み込みにくさを客観的に評価できる可能性が示された。

本研究は、総合科学技術・イノベーション会議の SIP（戦略的イノベーション創造プログラム）「次世代農林水産業創造技術」によって実施された。

dysphagia, sensory evaluation, electromyogram

講演番号：3F28p10
講演日時、会場：3 月 28 日 15:49～ F 校舎 28 会場

コシヒカリの良食味 QTL が米飯物性に及ぼす効果について

Effects of a good eating-quality QTL in Koshihikari on the cooked rice properties

○三木 崇広[1]、飯島 健[2]、辻井 良政[3]、堀 清純[2]、高野 克己[3] ([1]東京農大院・農化、[2]生物研、[3]東京農大応生・化学)
○ Takahiro Miki[1], Ken Iijima[2], Yoshimasa Tsujii[3], Kiyosumi Hori[2], Katsumi Takano[3] ([1]Agrichem.,Agr.,Grad.Sch.,Tokyo Univ.Agric., [2]National Institute of Agrobiological Sciences, [3]Dept.Appl.biol.chem.,Fac.Biosci.Tokyo Univ.Agric.)

【目的】米飯食味は日本のイネ育種における最も重要な選抜対象形質である．近年，コシヒカリの良食味に関する QTL（量的形質遺伝子座)解析が進められ、第 3 染色体短腕上に共通して QTL が検出された(Kobayashi and Tomita 2008, Wada *et al.* 2008, Takeuchi *et al.* 2008)．本研究では QTL 領域だけが日本晴型に固定したコシヒカリの遺伝的背景の置換系統（KSL-1～5）を用いて QTL が米粒の形状，また食味に関わる性質に及ぼす効果の確認を目的とした．

【試料および方法】試料については，2013 年に茨城県つくば市で栽培し成熟期に収穫した，様々な長さの置換断片を持つ KSL 系統 5 種 （KSL-1～5)， またコントロールとして同一圃場で栽培されたコシヒカリ， 日本晴を試料とした． 食味官能試験によって QTL の置換断片を持つ KSL 系統 5 種のうち，KSL-2 のみ日本晴型の食味，他の 4 種 （KSL-1, KSL-3～5)はコシヒカリ型の食味であると評価されている． これらの試料について、Image-Pro Plus （Media cybernetic 社製)にて玄米の形状測定，テンシプレッサー （タケトモ電気社製)にて物性測定、また米飯を O.C.T Compound （Sakura Finetek 社製)にて試料を固定し，-80℃で急速凍結，LEICA CM1850 （LEICA 社製)にて米飯横断面の切片を作製した後にヨウ素染色処理を行い，LMD6000 （LEICA 社製)にて観察をした。玄米の形状測定，物性測定の測定結果は Pirouette （Infometrix 社製)を用いて多変量解析を行い、試料ごとの傾向を確認した．

【結果】玄米の形状測定では，米粒の面積，幅において日本晴型の食味と評価された KSL-2 は 13.05 mm^2，3.01 mm を示し，日本晴の 12.94 mm^2，3.01 mm の値に近い値を示した．物性測定ではコシヒカリが全体の硬さ，全体の粘りにおいて 1363.6 gw/cm^2，447.4 gw/cm^2・cm を示したが，食味が日本晴型と評価された KSL-2 は 1512.0 gw/cm^2，377.8 gw/cm^2・cm を示し，コシヒカリと異なり日本晴と近い傾向の値を示した．これらの結果から食味に関与する QTL 領域が米粒の形状，また米飯の硬さや粘りに影響を与えていることを確認できた． 切片観察ではコシヒカリと食味が日本晴型と評価された KSL-2 との比較を行ったところ， コシヒカリでは米粒の表層に溶出物がみられたが， KSL-2 では同様のものはみられなかった．この 2 種の試料に関して，コシヒカリは物性測定の表面の粘りの値において約 2 倍の高い値を示していたことから，この溶出物が粘りであると示唆され，米飯の切片観察を行うことにより粘りの可視化を行うことが出来ると考えられる．

Koshihikari, QTL, Cooked rice property

講演番号：3F28p11
講演日時、会場：3 月 28 日 16:10～ F 校舎 28 会場

米澱粉の構造改変が物性に及ぼす影響

Effects of structural modifications of the rice starch on their rheological properties

○阿久澤 さゆり[1]、峰村 貴央[2]、藤田 直子[3]、鶴田 英一[4] ([1]東京農大健康、[2]東京医療保健大栄養、[3]秋田県大生物資源、[4]昭光サイエンティフィック（株））
○Sayuri AKUZAWA[1], Takao MINEMURA[2], Naoko FUJITA[3], Eiichi TSURUTA[4] ([1]Tokyo Univ. of Agric., [2]Tokyo Healthcare Univ., [3]Akita Prefectural Univ., [4]SHOKO Scientific)

【目的】 澱粉性食品素材は、わたしたちにとって栄養源であり、分離精製された澱粉はテクスチャー改良素材としても広く利用されている。澱粉は構成成分であるアミロースおよびアミロペクチンの含有量、構成糖のグルコースの重合度、α1,6 グリコシド結合によって形成される分岐構造の違いにより、様々な物性特性を示す。演者らは、澱粉糊液および澱粉性食品のテクスチャーを含む物性特性の発現要因の解明と物性の制御を目的として、植物由来のさまざまな澱粉の構造解析と物性特性の検討をおこなっており、新たな物性を発現させる方法として、湿熱処理（物理的方法）および遺伝学的手法（変異体米の作出）により澱粉の構造改変を試み、それらの理化学的性質を検討した。その結果、湿熱処理および遺伝学的手法により得られた変異体米胚乳澱粉は、米澱粉（日本晴・野生型）に比べて著しい低粘度性とゲル化濃度の上昇することを報告した。そこで本研究では、湿熱処理米澱粉および変異体米分離澱粉の低粘度性およびゲル化濃度の上昇の要因について、水分散系における分散状態の違いを検討することを目的として、結晶性、分子特性、水分散系の挙動として NMR による緩和時間の測定および糊液の動的粘弾性特性を比較検討した結果を報告する。
【方法】日本晴（野生型）および日本晴イネスターチシンターゼ(SS)Ⅲa 変異体米から分離精製した澱粉、日本晴（野生型）分離澱粉に湿熱処理（125℃20 分）を施した 3 種の澱粉を試料として用いた。測定項目は、X 線回折による結晶性の評価、澱粉の構造解析としてアミロペクチンの鎖長分布測定および多角度光散乱検出器による平均分子量の測定を行った。各試料の糊化後の水分散系の評価として、NMR による緩和時間の測定、および動的粘弾性の濃度依存性を測定した。
【結果】X 線回折による回折ピークの観察では、3 種の澱粉ともに A 形図形を示したが、4ab および 6a の回折ピーク強度が異なり、澱粉粒内の結晶性が変化していることが示された。また、アミロペクチンの鎖長分布では、変異体米澱粉は短鎖の増加が認められ、アミロペクチンの平均分子量も減少していたことから、SSⅢa の欠損は胚乳澱粉の構造に著しい影響を及ぼすことが認められた。NMR による糊化後の温度低下に伴う緩和時間の変化を測定したところ、T2 の減少が観察された温度に約 10℃の差が見られ、水分散系におけるネットワークの違いが示唆された。また、４％(w/w)澱粉糊液の動的粘弾性では、低濃度澱粉糊液では湿熱処理および変異体米澱粉ともに tanδ値が大きく、水中での澱粉の分散状態に起因するネットワーク構造が顕著に異なる糊液を形成することが示唆された。

rice starch, structure modification, rheology

講演番号：3F28p12
講演日時、会場：3 月 28 日 16:21～ F 校舎 28 会場

γ-シクロデキストリンを用いたコエンザイム Q10-胆汁酸ミセルの形成とビタミン C による還元反応
Micelle formation of coenzyme Q10 with bile acid by using γ-cyclodextrin and reduction reaction by adding vitamin C

○上梶 友記子[1,2]、大西 麻由[2]、中田 大介[2]、寺尾 啓二[2]、吉井 英文[1] ([1]愛媛連大農、[2]シクロケムバイオ)
○Yukiko UEKAJI[1,2], Mayu ONISHI[2], Daisuke NAKATA[2], Keiji TERAO[2], Hidefumi YOSHII[1] ([1]UGAS Ehime Univ., [2]CycloChem Bio)

【緒言】コエンザイム Q10 (CoQ10) には酸化型と還元型が存在し、健康食品や化粧品の多くは酸化型 CoQ10 が使用されている。近年では強い抗酸化能を有する還元型 CoQ10 に注目が集まっているが、還元型 CoQ10 は酸化型 CoQ10 に比べて熱や酸素に不安定といった問題がある。我々はこれまでに、酸化型 CoQ10 を γ-シクロデキストリン (γ-CD) で包接することによって、経口吸収性の改善作用を見出されている。そのメカニズムとしては酸化型 CoQ10/γ-CD 包接複合体を経口摂取した際、腸管内において γ-CD との結合定数が高い胆汁酸によって酸化型 CoQ10 が γ-CD から押し出され、胆汁酸ミセルに取り囲まれることで酸化型 CoQ10 の溶解度が上昇し、吸収性が向上したと推察される。本研究では、酸化型 CoQ10/γ-CD 包接複合体を含有した健康食品の摂取を想定し、界面活性剤である胆汁酸を含有した食後人工腸液 (Fed-State Simulated Intestinal Fluid: FeSSIF) を用いて、酸化型 CoQ10/γ-CD 包接複合体の溶出挙動を評価した。また、還元型 CoQ10 も生体内では抗酸化物質として重要な役割を果たすことから、還元剤であるビタミン C (VC) を添加することによって、胆汁酸とのミセルを形成した酸化型 CoQ10 から還元型 CoQ10 への変換を検討した。
【方法】タウロコール酸ナトリウム (15 mM)、レシチン (3.75 mM) を含む FeSSIF を調製した。バイアル瓶に FeSSIF を 15 mL 取り、酸化型 CoQ10/γ-CD 包接複合体を 150 mg (CoQ10 を 30 mg 含有) と VC を濃度が 0, 10, 20, 40 mg/mL となるように添加した。浴槽型振とう機 (NTS-4000BH, 東京理化器械) にて 37°C、100 rpm で振とうし、経時的に試料を採取した。0.2 μm PTFE フィルターを用いて濾過し、濾液中の酸化型 CoQ10 と還元型 CoQ10 の濃度を高速液体クロマトグラフ (LC-2010, 島津製作所) により定量した。また、酸化型と還元型を足した総 CoQ10 に対する還元型 CoQ10 の割合を算出した。
【結果・考察】酸化型 CoQ10/γ-CD 包接複合体に VC を添加した試料では、経時的に還元型 CoQ10 の濃度が増加した。総 CoQ10 に対する還元型 CoQ10 の割合は VC の濃度依存的に増加し、最終的には 100 % 近くまで変換した。VC を添加していない試料では、酸化型 CoQ10 のみが検出され、最大濃度は約 0.5 mM に達した。酸化型と還元型を足した総 CoQ10 濃度は、VC の有無に関わらず、何れの試料においてもほぼ同様の値であった。このことから FeSSIF において、タウロコール酸ナトリウムとの置換反応によって γ-CD から酸化型 CoQ10 の状態で解離し、次いで胆汁酸ミセルとして溶解した酸化型 CoQ10 が還元型 CoQ10 に変換されたものと示唆された。また、みかけの還元速度定数を擬一次式で近似したところ、VC 濃度に伴い上昇する傾向が認められ、高濃度の VC 条件下では酸化型 CoQ10 を包括した胆汁酸ミセルと VC 分子との接触効率が高まったためと推察された。

coenzyme Q10, cyclodextrin, micelle formation

講演番号：3F28p13
講演日時、会場：3 月 28 日 16:32～ F 校舎 28 会場

長期冷凍保存下における O/W エマルション不安定化に及ぼす要因の解明

Clarification of the factors effected on the instability of O/W emulsion under the long-term freezing storage

○石橋 ちなみ、本同 宏成、上野 聡（広島大院生物圏）
○Chinami ISHIBASHI, Hironori HONDOH, Satoru UENO (Hiroshima Univ.)

【 背景・目的 】O/Wエマルションは，冷凍-解凍によって乳化破壊が生じ，不安定化することが知られている。しかしながら，冷凍-解凍によるO/Wエマルションの不安定化には，油脂結晶および氷結晶の形成や粒子径の影響など，様々な因子が影響しているため，不安定化の主要因やそのメカニズムは明らかとなっていない。我々は，これまでマヨネーズ様O/Wエマルションを用いて，-30°C10 分間の冷凍処理を行った場合に，油脂結晶よりも氷結晶の形成がO/Wエマルションの不安定化に影響を及ぼしていること，また，油相に菜種油よりも大豆油を用いたエマルションの安定性が高いことを顕微鏡下において確認した。一方，長期冷凍保存によって油脂結晶は多形転移などの物理的変化が生じることが考えられるが，その変化がエマルション安定性に及ぼす影響は不明である。よって，今回，長期冷凍保存下のエマルション不安定化に影響を及ぼす要因を明らかにすることを目的とし，実験を行った。

【 方法 】植物油（菜種油または大豆油）70%(w/w)，卵黄 15%(w/w)，酢 15%(w/w)（油相：水相＝7：3) の割合で調製したマヨネーズ様O/Wエマルション（粒子径大（d_{50}=13.2±1.0μm)，粒子径小（d_{50}=2.7±0.2μm）計 4 種類を試料とした。試料 1 g の入ったエッペンドルフチューブを-20°Cの恒温槽中で一定時間保存した後，室温で解凍し，上清に分離した油を抽出，秤量することで冷凍-解凍によって分離した油の量を求めた。そのうち，試料中の油が 7 割以上分離した保存時間を“油水分離時間”とした。また，-20°Cにおける油脂の結晶化，および結晶多形の経時変化についてX線回折測定を行った。

【 結果・考察 】各エマルションの油水分離時間は以下の様になった。菜種油（粒子径大）および大豆油（粒子径大）:4 時間，菜種油（粒子径小）:6 時間，大豆油（粒子径小）:20 時間。X線回折測定の結果によれば，菜種油（粒子径大，小）では，-20°C4～6 時間保存中に油脂の結晶化が生じた。菜種油（粒子径小）は，油脂の結晶化後に油水分離したことから，油脂の結晶化が不安定化に影響していると考えられる。大豆油（粒子径大，小）では，-20°C0 時間ですでに油脂は結晶化していたが，4 時間後，12 時間後にそれぞれ油脂結晶の多形転移が生じ，保存時間の経過に伴って，多形転移は進行していった。大豆油（粒子径小）は，これらの多形転移が生じた後に油水分離したことから，油脂結晶の多形転移が不安定化に影響していると考えられる。一方，菜種油（粒子径大）および大豆油（粒子径大）は，それぞれ油脂の結晶化前および多形転移の発生前に油水分離したことから，これら以外の要因が存在すると考えられる。

oil-in-water (O/W) emulsion, crystallization, freezing

講演番号：3F28p14
講演日時、会場：3 月 28 日 16:43～ F 校舎 28 会場

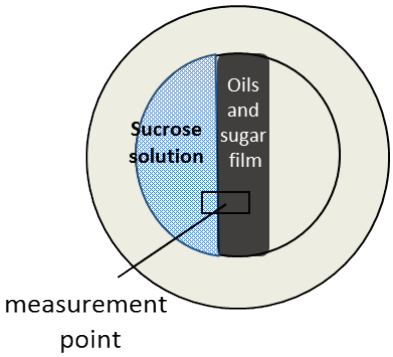
氷点下における油脂・糖複合皮膜の水分浸透観察

Observation of moisture permeation into oils and sugar composite film in sub-zero temperature

○松田 さとみ、渡辺 学、鈴木 徹（海洋大 海洋科）
○Satomi MATSUDA, Manabu WATANABE, Toru SUZUKI (Kaiyodai)

【目的】冷凍食品を長期保存すると、食品中の水分移動によって、包装内においても食材から乾燥が進み霜発生が起こる。また、冷凍フライ品の衣が食材の水分を吸収しサクサク感を損なうなど、品質劣化が起こる。こういった水分移動を防ぐために、脂質を主成分とした可食膜で食品表面を覆ったり、食品素材間を隔てる方法が検討されている。しかし、脂質性膜でコーティングした場合でも食品の乾燥や吸湿がしばしば起こる場合がある。演者らは、マイナス温度下でも固形脂質性膜を水分が透過すること[1)]、また、その要因として、混在する親水性成分に水分が溶解しつつ浸透を起こしている[2)]可能性を示してきた。本研究では、アイスクリーム等の冷菓の乾燥防止を想定し、チョコレート擬似膜への水分浸透の様子について、微視的に顕微ラマン分光法を用いて検証した。

【方法】チョコレートの主成分であるカカオバター、スクロースを様々な組成比で混ぜ合わせ、脂質性試料とした。安藤等の方法に従ってカバーガラス上に脂質性試料（約 15μmL）とスクロース水溶液（約 10μmL）の界面を作成した。その界面を一定温度に保った顕微鏡下コールドステージに静置し、顕微ラマン（Thermo Fisher Scientific 製, DXR Raman microscope）を用いて、経時的にスクロースをマッピング測定した。



【結果】時間が経つにつれ、スクロースを示すピーク（2990cm^{-1} 付近）強度が、スクロース溶液側界面から脂質性膜内部へ進むにつれて、弱くなっていく挙動が観測された。これらを詳細に解析することで、スクロース水溶液の水分が界面から脂質性膜へ浸透していき、脂質性膜のスクロース結晶を溶かしていると推察した。さらに脂質性膜のスクロース含量が多いほど、また、測定温度が高くなるほど、浸透が早い傾向が見られた。

1）松田さとみ, 渡辺学, 鈴木徹：日本食品工学会年次大会講演要旨集, 93（2013）
2）則竹（安藤）寛子, 梶原一人, 鈴木徹：日本冷凍空調学会年次大会講演論文集, 127-128（2012）

moisture migration, lipid film, permeability

講演番号：3F28p15
講演日時、会場：3 月 28 日 16:54～ F 校舎 28 会場

冷解凍ゲルの「もちもち」食感へのタピオカ加工澱粉の効果

Effect of modified tapioca starch on the "mochi-mochi" texture of freeze-thawed co-gels

○井之上 明弘、中村 卓（明治大院農・農化）
○Akihiro INOUE, Takashi NAKAMURA (Meiji Univ.)

【目的】食感は食品のおいしさを決定する重要な要因である。近年好まれる食感として、「もちもち」食感が挙げられる。「もちもち」食感を付与する食品素材としてタピオカ澱粉がある。タピオカ澱粉は、ドーナツやうどんといった食品に特徴的な「もちもち」とした食感を付与することが知られている。しかし、感性的な性質である「もちもち」食感を人間がどのように認知しているのかは明らかでない。これまでの研究で、人間が「もちもち」食感を認知するためには、第一咀嚼後半の噛み応えや複数回咀嚼時の噛み応えの持続といった知覚が重要であることを明らかにした[1)]。本研究ではさらに、各種加工タピオカ澱粉を卵白に混合した食品モデルゲルを用いて、冷凍冷蔵食品における澱粉の老化促進をイメージした冷解凍処理を行った。冷解凍したゲルの「もちもち」食感について、官能評価と破壊力学特性、澱粉の加工種類・程度の関係を検討した。
【方法】澱粉はタピオカ加工澱粉 4 種（アセチル化[AC]、ヒドロキシプロピル化リン酸架橋[HPC]、低置換・高置換アセチル化アジピン酸架橋[L-AD, H-AD]）を用いた。澱粉・卵白混合懸濁液を、95℃で 10 分間加熱後、25℃で 30 分間常温に戻し、作製直後ゲルとした。さらに-20℃で 24 時間、常温で 1 時間の冷解凍処理を 2 サイクル行い、冷解凍ゲルとした。クリープメータにてゲルの破断強度試験と 10 回繰り返し圧縮試験を行った。4 種の冷解凍ゲルの「もちもち感」について、一対比較法にて官能評価した。
【結果】破断強度試験の結果、L-AD は冷解凍処理により圧縮初期の立ち上がり荷重ともろさ荷重が増加した。HPC は作製直後と類似した物性を示した。10 回繰り返し圧縮試験の結果、L-AD は冷解凍処理によって圧縮の繰り返しに伴う応力低下の程度が大きくなり、さらに付着性も減少した。他の 3 種は冷解凍処理しても作製直後の物性が維持された。冷解凍ゲルの官能評価の結果、「もちもち感」は HPC>H-AD>AC>L-AD の順で高かった。HPC、H-AD は、冷解凍後も圧縮初期のやわらかさ、後期のかたさ（噛み応え）、複数回圧縮時のかたさ（噛み応え）、付着性といった知覚が維持されたために、「もちもち感」を強く感じたと考えられる。以上の結果より、タピオカ澱粉の加工方法として、高程度の耐老化性置換、軽度の架橋が冷凍冷蔵食品の「もちもち感」に効果があることが示唆された。

1） 日本農芸化学会 2014 年度大会 大会プログラム集 2B02a02

modified tapioca starch, texture, retrogradation

講演番号：3F28p16
講演日時、会場：3 月 28 日 17:15～ F 校舎 28 会場

水溶液中におけるゼラチンのゾル・ゲル転移に及ぼす協同的水和効果の解析

Effect of cooperative hydration on sol-gel transition of gelatin in aqueous solutions

○宮脇 長人、表 千晶、松平 景子 (石川県大生資環)
○Osato Miyawaki, Chiaki Omote, Keiko Matsuhira (Ishikawa Prefectural Univ.)

［目的］これまでにわれわれは水溶液中におけるタンパク質の熱安定性に及ぼす水和効果の影響について、タンパク質変性率と水分活性との関係に対して、修正 Wyman-Tanford 解析を適用することによって、良好な結果が得られることを示してきた[1)]。本報告においては同様の手法を適用してゼラチンのゾル-ゲル転移現象の解析を試みる。

［方法］ゼラチン(G-2782E、新田ゼラチン)を用い、種々の濃度のスクロース(suc)、グルコース(glu)、リボース(rib)、エタノール(etha)、尿素(ure)水溶液中で、ゾル-ゲル転移を、円二色性分散計（CD：J720、日本分光）および示差走査熱量分析計（DSC；Micro DSCⅢ, Setarum）により測定した。

［結果］CD により λ=237nm において、0.3%ゼラチンのゲル→ゾルの転移曲線を測定した結果、ゼラチンのゲル状態はスクロースが共存することによって濃度依存的に安定化されることがわかった。しかしながら、測定されたゲル→ゾル転移曲線は温度スキャン速度に依存した。これはゾル・ゲル転移現象が遅い速度過程であるため、転移曲線が平衡過程を十分に反映していないためである。そこで、DSC を用いて、種々の水溶液中において、5%ゼラチンの昇降温過程（0.5℃/min）におけるゾル・ゲル転移を測定し、ゲル融解温度 T_m とゲル化温度 T_g の平均値として平衡ゾル・ゲル転移温度 T_e を推定した。そして、この値とゲル融解エンタルピー ΔH_m とから、van’t Hoff 式を用いて、平衡転移曲線を推定し、これを用いて、平衡ゾル化率 K_{sol} の温度依存性を種々の溶液中において求めて、これに対して次式の修正 Wyman-Tanford 式を適用し、溶液の水分活性 a_w に対してプロットした。

$$\ln(K_{sol})/\ln(a_w) = \Delta i - (m_w/m_y)\Delta j \qquad (1)$$

ここに、Δi、Δjは、それぞれ、ゾル・ゲル転移に伴うゼラチン分子当たり水和数および溶質結合数の変化、m_w、m_y、は、それぞれ、系に存在する水と溶質の総モル数である。Δi の値は 100 程度と推定され、この値が大きいことが水和効果の協同性の大きな要因である。式(1)のプロットは良好な直線性を示し、この傾きはゲル化状態に対する溶質による安定化効果の指標となり、その値は suc>glu>rib>etha>ure の順であり、また、etha と ure については負の値となり、これらはゼラチンのゲル状態を不安定化していることを示した。式(1)によるプロットが直線であることから、この式を直接積分することができ、その結果を用いて、各種水溶液中と純水中でのゲル状態の安定化自由エネルギーの差 $\Delta\Delta G$ を求めることが可能となった。

［文献］O. Miyawaki, M. Dozen, K. Nomura, *Biophys. Chem.*, **185**, 19 (2014).

sol-gel transition, hydration, water activity

講演番号：3F28p17
講演日時、会場：3 月 28 日 17:26～ F 校舎 28 会場

グルテニンの物性とナノ構造にたいする塩化ナトリウムの影響
Effects of sodium chloride on rheological properties and nanostructures of glutenin
○東野 ゆうき[1]、船木 智史[1]、佐藤 信浩[2]、杉山 正明[2]、大場 洋次郎[2]、井上 倫太郎[2]、北尾 悠樹[1]、裏出 令子[1] ([1]京大院農・農学、[2]京大・原子炉)
○Yuki HIGASHINO[1], Satoshi FUNAKI[1], Nobuhiro SATO[2], Masaaki SUGIYAMA[2], Yojiro OBA[2], Rintaro INOUE[2], Yuki KITAO[1], Reiko URADE[1] ([1]Kyoto Univ., Division of Agronomy and Horticultural Science, [2]Kyoto Univ., Research Reactor Institute)

【目的】グルテンは小麦種子の主要タンパク質であるグリアジンとグルテニンが分子間相互作用により分子集合したタンパク質複合体であり，小麦粉生地の物性に中心的な役割を果たしている．食塩は小麦粉生地の抗張性や伸長性を増加させ，食品加工における生地物性の調節に重要な役割を担っているが，その作用機構の詳細は不明である．本研究では，生地物性に対する食塩の作用の分子機構の解明を目指して，グルテニンおよびグルテンの水和物のレオロジー特性とナノスケール構造に NaCl が及ぼす影響を検討した．**【方法・結果】**グリアジンとグルテニンは NaCl 添加生地から純水抽出法により調製した．純水および NaCl 溶液で水和した各タンパク質標品の動的粘弾性を，パラレルプレートを装着したレオゾル-G3000 を用いて測定した．グリアジンおよびグリアジン・グルテニン混合物の G’および G”はパン生地に用いられる 0.5M NaCl までは緩やかに増加し，うどん生地の作製に用いられる 1M 以上で急激に増加した．一方，グルテニンの動的粘弾性は NaCl 濃度を 3M まで上げてもグリアジンのように大きくは変化しないことから，グルテンの動的粘弾性に対する NaCl の影響は主にグリアジンを介して発揮されていると推定される．グルテニンの吸水量に対する NaCl の影響を検討したところ， NaCl の濃度に依存して減少したがその程度はグリアジンに比して低いことが明らかとなった．グルテニンの吸水量は分子間ジスルフィド結合を還元切断したグルテニンモノマーのほうがグルテニンよりも若干高かったが, NaCl による吸水量の低下はグルテニンとグルテニンモノマーで同様の傾向であった． したがって, NaCl の吸水量への影響はグルテニンのポリマー構造には依存していないと考えられる．また，いずれの NaCl 濃度でもグルテニンおよびグルテニンモノマーの G’、G”が温度の上昇に伴って減少したことから，グルテニンの動的粘弾性を支える分子間力として水素結合の寄与が存在することが示唆された．タンパク質の物性の源であるナノスケール構造は，高エネルギー加速器研究機構 Photon Factory の BL10C に設置された X 線小角散乱装置で測定した．グリアジン水和物の散乱プロファイルは NaCl により劇的に変化しナノスケール構造の大きな変化が示されたが，グルテニン水和物の散乱プロファイルは 2M NaCl まではほとんど変化せず 3M NaCl で小角領域に散乱強度の立ち上がりがみられた．以上の結果から，グリアジンは NaCl によりポリペプチド鎖間の水素結合などが増加することでナノ構造が大きく変化し,この変化が物性変化をもたらすのに対し，グルテニンのナノスケールの構造は NaCl による影響を受けにくく，NaCl が高濃度で存在するとより大きなスケールの凝集構造が形成されると考えられる．

glutenin, gliadin, nanostructures

講演番号：3F28p18
講演日時、会場：3 月 28 日 17:37～ F 校舎 28 会場

乾燥卵白・カゼインナトリウム混合タンパク質フィルムにおけるカゼイン画分添加の効果
Effect of casein sodium on the properties of composite film consisted from egg white, casein sodium and glycerol
○太田 尚子、荻野 健次（日大短大）
○Naoko OHTA, Kenzi OGINO (Nihon Univ.)

乾燥卵白・カゼインナトリウム混合タンパク質フィルムにおけるカゼイン画分添加の効果

私たちはこれまで種々の食品タンパク質のゲル化特性解明とその改良を目指した研究を行ってきたが、先に、卵白アルブミン（OVA）・α-カゼイン混合ゲルが微細なネットワーク（粒径 100nm 程度）を有する透明度の高いゲルを形成することを報告した[1)]。そこで今回は熱凝固性の乾燥卵白（EW）と熱安定性の高い乳カゼインナトリウムからなる混合ゲルを基盤としたフィルムの性質を明らかにするとともに本システム中でのカゼイン画分の役割について考察する事を目的とした。

総タンパク質濃度を 10%とし、両タンパク質の混合比率を変化させグリセロール存在下（可塑剤として 3% または 5% 使用）で形成した各種フィルムの透気度（テスター産業社製 PA-301 ガレー式デンソメーターB 型使用）、曲げ強度（TA 社製動的粘弾性測定装置 RFS-III 型使用）、タンパク質二次構造（パーキンエルマー社製 ATR 搭載 FT-IR Spectrum two 使用）を比較した。

その結果、5%以上のカゼインナトリウム混合系で、EW 単独系とは顕著に異なる物性を示すことが判った。即ち、透気性に対する高いバリヤー性を有し（設定した測定時間（15 分間）以内で全く透気せず）、EW 単独フィルムに比べ 4 倍以上大きなノーマルフォース(g)の強度を有していた。また、時間変化に伴う破断強度変化（波形挙動）から、その大きな曲げ強度はカゼインナトリウム混合フィルムの強い伸展性に由来していることが判った。そこで、その物性の違いがどの様なタンパク質二次構造の違いに基づくものなのかを曲げ強度試験の波形特性を基にグループ化し、アミド I 領域のスペクトルの傾向をグループ間で比較した。その結果、EW リッチなフィルムではその主要二次構造がβ-シートであるのに対し、カゼインナトリウムリッチフィルムではα-ヘリックスであることが判った。以上のことから、カゼインナトリウム画分は EW リッチフィルムの二次構造に対して、よりα-ヘリックスの相対的な増加を導くことにより、フィルムに優れた伸展性を与えていることが強く示唆された。

1）太田尚子他、加熱誘導卵白アルブミンゲルの形成に及ぼす乳α-カゼインおよびカプリン酸ナトリウム添加の影響、*Nippon Shokuhin kagaku Kogaku Kaishi,* **61** (5), 183-191 (2014)

food protein film, secondary structure of protein, extensibility

講演番号：3F28p19
講演日時、会場：3 月 28 日 17:48～ F 校舎 28 会場

キトサンナノファイバーがヒドロゲルの物性や機能性に与える影響

Effect of chitosan nanofiber on properties and functions of hydrogels

○岩本 博行、懸谷 しのぶ、新田 祥子（福山大生命工）
○Hiroyuki IWAMOTO, Shinobu KAKETANI, Sachiko NITTA (Fukuyama Univ.)

【目的】 近年加工技術の進歩に伴い多用な多糖類ナノファイバーが開発され、食品や医用材料分野での応用が広く期待されている。セルロースやキトサンを原料とする多糖類ナノファイバーは、比表面積が大きいことから粘性が高く、優れた分散安定性、強度および弾性を有することから、食品安定化剤や増粘剤、医用材料分野での応用が検討されている。そこで本研究では、キトサンナノファイバー（CNF）を含有したゲルを作製し、CNF の添加がゲルの膨潤性、力学的特性および物質保持性に及ぼす影響を評価することにより、医用材料等への応用の可能性を検討した。

【方法】 本研究では、モデルゲルとして poly(ethylene glycol) (PEG)を用いた。PEG diacrylate (PEGDA)/CNF 混合懸濁液中にレドックス開始剤 APS/TEMED を加えて PEGDA の架橋反応を行い、CNF が系内で分散した semi-IPN 型均一ゲル（CNF-PEG gel）を作製した。ゲルの PEGDA/CNF 比や外部 pH がゲルの膨潤性、破断応力および含有物の放出性に与える影響を評価した。ゲルの内部構造は SEM により観察した。

【結果と考察】 作製した CNF 含有 PEG ゲル（CNF-PEG gel）は凍結乾燥後もその形状を維持したことから、CNF がゲルの立体保持に寄与していると考えられた。乾燥ゲルを超純水中に浸漬させたところ、約 30 分程度で平衡膨潤度に到達した。CNF-PEG gel の膨潤率は 5～10 程度であり、PEGDA 仕込み量に依存した。また、キトサンのアミノ基に由来する電荷の影響により、CNF-PEG gel は pH に依存した膨潤性を示した。CNF-PEG gel の圧縮破断応力は、PEGDA および CNF の仕込み量に大きく依存した。特に、CNF 量が増加するに従って破断応力が増大したことから、CNF の添加はゲルの高強度化をもたらすことが示唆された。CNF-PEG gel のタンパク質の封入や放出については、ゲルは効率よく BSA を封入する一方、タンパク質の放出挙動は外液バッファーの pH やゲルの組成に依存した。低 pH 条件下では、ゲルからの BSA 放出速度が上昇する傾向が見られたが、ゲルに CNF を添加することで初期バーストが抑制された。最後に CNF-PEG gel の各種性質をもたらす要因を明らかにするため、ゲルの内部の構造を SEM で観察したところ、束状構造化した CNF に沿って PEGDA がゲル化することで、数十 μL の空孔を多く含む網目構造を有するゲルが形成されていることが分かった。また細孔径、空孔率はともに、CNF の仕込み量の増加に伴い増大した。以上の結果から、PEG gel に CNF を添加することにより、ゲルにナノファイバーに起因する網目構造が形成され、特異的な膨潤挙動、力学特性およびタンパク質放出特性をゲルに付与することがわかった。

chitosan, nanofiber, gel

講演番号：3F37a01
講演日時、会場：3 月 28 日 09:00～ F 校舎 37 会場

食事脂質の腸内細菌代謝産物が肥満状態での脂肪組織炎症モデル系に与える影響

Effects of gut microbial food lipid metabolites on the inflammation in the model systems of obese adipose tissue

○梁 夏恩[1]、西村 哲[1]、李 泳佳[1]、大植 隆司[1]、後藤 剛[1,2]、北村 苗穂子[3]、朴 時範[4]、岸野 重信[3]、小川 順[2,3]、高橋 信之[1,2]、河田 照雄[1,2]（[1]京大院農・食品生物、[2]京大・生理化学研究ユニット、[3]京大院農・応用生命、[4]京大院農・産業微生物）

○Ha Eun YANG[1], Akira NISHIMURA[1], YongJia LEE[1], Ryuji OHUE[1], Tsuyosi GOTO[1,2], Nahoko KITAMURA[3], SiBum PARK[4], Shigenobu KISHINO[3], Jun OGAWA[2,3], Nobuyuki TAKAHASHI[1,2], Teruo KAWADA[1,2] ([1]Grad. Sch. Agric. Kyoto Univ. Food Science and biotechnology, [2]Res. Unit Physiol. Chem., Kyoto Univ., [3]Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [4]Lab. Ind. Microbiol., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)

【背景・目的】

脂肪組織における炎症反応は肥満に伴う代謝異常症発症要因の一つであり、脂肪組織の炎症抑制は肥満に伴う生活習慣病の予防・改善をもたらす可能性がある。魚油などに含まれる多価不飽和脂肪酸が抗炎症作用を示すことが報告されている。我々は、腸内細菌が食事脂質より共役型、オキソ型、水酸基型などの多彩な脂肪酸を産生することを明らかにするとともに、その微生物生産法を確立してきた。これらの多彩な脂肪酸の機能を明らかにする一環として、本研究では脂肪組織での炎症反応に与える影響について検討した。

【方法・結果】

マウスマクロファージモデル細胞 RAW264.7 細胞を用い、リポ多糖(LPS)刺激下で誘導される炎症性メディエーター、NO の産生能について評価を行った。その結果、リノール酸、α-リノレン酸、γ-リノレン酸由来の腸内細菌代謝産物である共役型オキソ脂肪酸 KetoC (10(oxo)t11-18: 1)、αKetoC (10(oxo)t11,c15-18:2)、γKetoC (10(oxo)c6,t11-18:2) に強い抗炎症活性が認められた。これらの脂肪酸は、LPS 刺激した RAW264.7 から分泌される炎症性メディエーター、tumor necrosis factor-α (TNF-α)、monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)の発現についても、mRNA、タンパク質レベルで抑制した。肥満状態での脂肪組織で起こる炎症反応について検討するために 3T3-L1 脂肪細胞と RAW264.7 マクロファージの共培養系および分化・肥大化させた 3T3-L1 脂肪細胞の培養上清を用いて炎症性メディエーターの発現量を評価したところ、腸内細菌代謝産物添加群において発現低下が認められた。

【考察】

マクロファージによる炎症性因子の産生を抑制する腸内細菌代謝産物（共役型オキソ脂肪酸）は肥満状態の脂肪組織における慢性炎症状態を緩和することが示唆された。

inflammation, gut microbe, lipid metabolites

講演番号：3F37a02
講演日時、会場：3 月 28 日 09:11～ F 校舎 37 会場

waxy/amylose-extender 二重変異体米に含まれる機能性成分による脂質代謝改善効果のトランスクリプトーム解析

Hepatic gene expression profiles of hypolipidemic effects in mice fed functional components in *waxy/amylose-extender* double-mutant rice

○山室 渉[1]、中屋 慎[1]、湯野川 春信[2]、松本 健司[3]、北村 進一[1]([1]阪府大院生命、[2]メッセンジャー・スケープ（株)、[3]石川県大・生物資源環境)

○ Sho YAMAMURO[1], Makoto NAKAYA[1], Harunobu YUNOKAWA[2], Kenji MATSUMOTO[3], Shinichi KITAMURA[1] ([1]Osaka Prefecture Univ., [2]MessengerScape Co. Ltd, [3]Ishikawa Prefectural Univ.)

【背景】*waxy/amylose-extender*（ *wx/ae* ）二重変異体米は難消化性澱粉（ *wx/ae* 澱粉 ）と γ-オリザノールを主要な機能性成分として含有している．我々は，脂質代謝異常モデルマウス BALB/c.KOR/Stm Slc-*Apoe*^{shl} を用いて，これら 2 成分が肝臓 triacylglycerol（ TAG ）の蓄積量を減少させることを見出した[1]．さらに，TAG を分子種に着目し解析したところ，複数の分子種において含有率が異なるという結果を得た．これらの結果から，*wx/ae* 澱粉と γ-オリザノールを摂取した場合，肝臓において脂質代謝関連遺伝子の発現量が変化すると考え，脂肪酸およびコレステロール代謝の主要な遺伝子の発現解析を行ったところ，*sterol regulatory element-binding protein-1*（*SREBP-1* ）の発現量は低下するが， *SREBP-2* や *3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase*（ *HMG-CoAR* ）などの発現量は変化せず，他の代謝経路が影響を受けている可能性が考えられた[1]．そこで，本研究では，*wx/ae* 澱粉と γ-オリザノールを摂取したマウスの肝臓における遺伝子発現を網羅的に解析し，TAG 蓄積量低減効果の主因となる代謝経路について考察した．

【実験方法】うるち米澱粉（ C 群 ），γ-オリザノール（ O 群 ），*wx/ae* 澱粉（ RS 群 ），*wx/ae* 澱粉および γ-オリザノール（ RSO 群 ）を含む餌を摂取した BALB/ c.KOR/Stm Slc-*Apoe*^{shl} マウスの肝臓から mRNA を抽出し解析に用いた．まず，High Coverage Expression Profiling（ HiCEP ）法により，C 群と RSO 群について網羅的遺伝子発現解析を行った．次いで，HiCEP 法により選抜された脂質代謝遺伝子を定量的 real-time PCR 法により 4 群の遺伝子発現を解析した．

【結果】HiCEP 法により 27,739 個の遺伝子が検出された．その内，RSO 群が C 群の 1.5 倍以上発現している遺伝子は 329 個，0.67 倍以下の発現量を示した遺伝子は 208 個であった．検出された複数の脂質代謝関連遺伝子の中で *lipoprotein lipase*（ *LPL* ）が down-regulate されていることが分かった. そこで, 4 群について定量的 real-time PCR 法を行い遺伝子発現量を比較したところ， C 群と比較して O 群では 0.58 倍，RS 群では 0.55 倍，RSO 群では 0.44 倍であり，有意に低下していることが分かった．*LPL* はグリセロ脂質代謝に関与する遺伝子であることから，*wx/ae* 澱粉と γ-オリザノールの摂取による肝臓 TAG 蓄積量低減効果にはグリセロ脂質代謝が関与している可能性がある．

[1] M.Nakaya et al. Biosci Biotechnol Biochem. 2013;77(7):1435-40.

【備考】HiCEP 法の実施は，JST 先端計測分析技術・機器開発プログラムの支援を受け実施した．

waxy/amylose-extender, resistant starch, γ-oryzanol

講演番号：3F37a03
講演日時、会場：3 月 28 日 09:22～ F 校舎 37 会場

Caco-2 細胞に透過させたカフェインが 3T3-L1 脂肪細胞の分化に与える影響

The effect of adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells by caffeine permeated through Caco-2 cells

○原田 聖也、山下 陽子、芦田 均 (神戸大・院・農)
○Kiyonari HARADA, Yoko YAMASHITA, Hitoshi ASHIDA (Kobe univ.)

【目的】カフェインはコーヒーや茶に含まれるメチルキサンチンの 1 種である。カフェインが脂肪細胞において脂肪分解を促進することが報告されているが、脂肪細胞分化に与える影響については明らかとなっていない。本研究では、培養細胞を用いてカフェインが脂肪細胞分化に与える効果とその作用機構解明を目的とした。
【方法】マウス線維芽由来 3T3-L1 前駆脂肪細胞にカフェインを分化 0 日目から 3 日間分化誘導剤とともに共作用させた。カフェインをヒト結腸がん由来 Caco-2 細胞の apical 側に添加し、透過させた。透過 1-72 時間後に basolateral 側培地を回収し、3T3-L1 細胞に分化誘導剤とともに 3 日間共作用させた。分化 8 日後に細胞内の脂肪蓄積量を Sudan II 染色法を用いて測定した。分化初期のマーカーは分化 3 時間後に、分化中期のマーカーでは分化 5 日後にタンパク質、および mRNA を回収し発現量を測定した。Basolateral 側培地中の透過されたカフェイン量は、HPLC を用いて定量した。
【結果】3T3-L1 細胞にカフェインを作用させた時、細胞内の脂肪蓄積量に変化が認められなかった。そこで、Caco-2 細胞にカフェインを 2 時間透過させ、これを 3T3-L1 細胞に作用させたところ、分化初期のマーカーである C/EBP δ のタンパク質と遺伝子の発現量が有意に増加した。また、分化中期のマーカーである PPARγ のタンパク質、C/EBPα のタンパク質と遺伝子の発現量、および adiponectin の遺伝子の発現量が有意に増加した。さらに、細胞内の脂肪滴の小型化が認められ、脂肪蓄積量が有意に増加した。一方で、24 時間透過させた培地を 3T3-L1 細胞に作用させたところ、C/EBPβ と C/EBP δ のタンパク質の発現量が減少した。この時、PPARγ の遺伝子、C/EBPα のタンパク質と遺伝子、および adiponectin の遺伝子の発現量が有意に減少した。C/EBPα の遺伝子発現量の減少は、透過 16 時間以降から、PPARγ と adiponectin でのそれは 24 時間透過させた時に認められた。さらに、24 時間透過させた培地を 3T3-L1 細胞に作用させたところ、脂肪蓄積量は有意に減少したが脂肪滴の小型化は維持されていた。カフェインを Caco-2 細胞に 10 mM 作用させた時、透過したカフェイン量は、2 時間後で 17 μM、24 時間後で 28 μM となった。
以上の結果より、脂肪細胞の分化に対してカフェインは直接効果を示さず、間接的に脂肪細胞分化に影響を与えている可能性が示唆された。また、カフェインを Caco-2 細胞に透過させることにより、一過的に脂肪蓄積を促進するが、最終的には脂肪蓄積を抑制した。これらのことから、カフェインは肥満予防に有効な食品成分の一つであることが示唆された。

Caco-2 cell, caffeine, adipocyte differentiation

講演番号：3F37a04
講演日時、会場：3 月 28 日 09:33～ F 校舎 37 会場

香醋由来の糖・脂質代謝改善成分の単離・同定
Isolation and identification of Zhenjiang Vinegar-derived active compound ameliorating obesity-associated abnormalities in glucose and lipid metabolism.
○安 芝英[1]、山津 敦史[1]、粟田 ちひろ[1]、山下 裕輔[1]、原田 清佑[1]、丸 勇史[1]、高尾 敏文[2]、辻野 義雄[3,4]、吉國 義明[1]、金 武祚[1] ([1]（株）ファーマフーズ、[2]大阪大蛋白質研、[3]北陸先端大マテリアル、[4]千葉科学大薬)
○JIYEONG AN[1], Atsushi Yamatsu[1], Chihiro Awada[1], Yusuke Yamashita[1], Seiyu Harada[1], Isafumi Maru[1], Toshifumi Takao[2], Yoshio Tsujino[3,4], Yoshiaki Yoshikuni[1], Mujo Kim[1] ([1]Pharma Foods International Co,.Ltd., [2]Institute for Protein Research, Osaka Univ., [3]Japan advanced institute of science and technology, [4]Chiba Institute of Science)

【目的】近年、過剰な摂取カロリーや運動不足などにより、肥満が大きな健康問題となっている。肥満は糖尿病、高血圧、脂質異常症などの生活習慣病の主因となる。生活習慣病に対する薬剤は種々開発されているが、予防医学の観点からは発症前に肥満を改善することが重要である。香醋は、中国で古来より用いられた食酢の一種で、健康維持に関する様々な有効性が唆示されてきた。特に、中国鎮江で生産される香醋は、他の食酢とは異なる製法で、長期発酵させるなど特殊な工程が多い。そこで本研究では、香醋の糖・脂質代謝異常に対する有効性を検証し、その活性物質の単離・同定を試みた。

【方法】糖・脂質代謝制御においては、リガンド要求性核内転写因子である PPARs(peroxisome proliferator-activated receptors) が重要な役割を担っている。なかでも、PPARγは脂肪組織に多く発現し、その活性化によって脂肪細胞の分化が促進され、インスリン感受性の高い脂肪細胞の割合を増加させることができる。従って、PPARγの活性化はインスリン抵抗性および糖・脂質代謝異常の予防・改善に有用であると考えられる。そこで、PPARγの活性化を指標とした細胞評価系(リガンドアッセイ)によって香醋の有効性を検証するとともに、その活性物質を探索した。

【結果】鎮江の香醋から調製された多数の分画物について体系的なリガンドアッセイを行った結果、PPARγに対するリガンド活性を示す活性画分が得られた。この活性画分の主要成分を単離し、質量分析及び NMR 分析による構造解析を行った。その結果、この活性物質は 5-hydroxy-4-phenylbutenolide (5H4PB ; FRAGLIDE Ⅰ)と同定された。そこで、化学合成した5H4PBを用いて、脂質代謝に及ぼす影響を検証した。その結果、合成 5H4PB においても PPARγに対するリガンド活性が確かめられた。また、香醋由来の活性物質である 5H4PB はインスリン抵抗性および糖・脂質代謝異常の予防・改善に有効である可能性が見出された。本研究により、この有効成分を活用した香醋由来の新たな肥満改善食品の創出が期待される。

Zhenjiang Vinegar extract, metabolic disorder, obesity

講演番号：3F37a05
講演日時、会場：3 月 28 日 09:44～ F 校舎 37 会場

メタボリックシンドロームモデルラットにおけるワサビ葉熱水抽出物の脂質代謝改善効果

Wasabi leaf extracts attenuate adipocyte hypertrophy in SHRSP.ZF rats through modulation of PPARγ and AMPK activity

○大渡 康夫[1]、小川 哲郎[1]、勝部 拓矢[1]、飯沼 清栄[2]、吉富 久恵[3]、高 明[3] ([1]島根産技セ、[2]健康栄養素材研、[3]武庫川女大薬)
○ Yasuo OHWATARI[1], Tetsuro OGAWA[1], Takuya KATSUBE[1], Kiyohisa IINUMA[2], Hisae YOSHITOMI[3], Ming GAO[3] ([1]Shimane IIT., [2]Kenkoeiyousozai Inst., [3]Mukogawa Women's Univ.)

【目的】肥満は、動脈硬化の原因となるメタボリックシンドローム（MS）を引き起こす危険因子として、その予防、治療の必要性が指摘されている。以前、我々はワサビ葉熱水抽出物（WLE）に、抗肥満につながる機能性として、3T3-L1 前駆脂肪細胞の分化抑制効果と高脂肪食負荷したマウスの体重増加抑制効果があることを発見した[1,2)]。今回、MS 病態モデル動物である SHRSP.ZF ラットに WLE を投与し、MS のような複合的な疾患における WLE の効果について検討を行った。
【方法】6 週齢雄性 SHRSP.ZF ラットを 1 週間の予備飼育後、対照群及び実験群の各群 7 匹ずつに分け、対照群には滅菌水道水を、実験群には WLE を 4g/kg/day 毎日強制経口投与した。投与開始後、2 週間毎に摂食量・体重・血圧を、4 週目には体温を測定し、血中、尿中の生化学検査も合わせて行った。実験終了後に解剖を行い、臓器摘出及び重量を測定し、臓器組織切片の HE 染色を行った。摘出した肝臓と白色脂肪組織から RNA 及びタンパク質を抽出し、PPARγをはじめとする脂質代謝関連因子の発現解析を行った。なお、正常対照群として WKY ラットを用いた。
【結果・考察】実験群では対照群と比べ、投与 4 週目に体温の有意な上昇が見られ、6 週目では体重、血圧ともに有意に低下していた。また、実験群の血中トリグリセリドが有意に低下しており、さらに組織観察では、白色脂肪組織の個々の脂肪細胞の大きさが、対照群に比べて小さくなっていることが観察された。発現解析の結果、実験群では白色脂肪組織における PPARγとその標的遺伝子の発現が低下していた。一方で、善玉アディポサイトカインであるアディポネクチンは、白色脂肪組織と血中において WLE の投与により増加傾向が認められた。さらに、WLE は肝臓中の AMPK のリン酸化を有意に増加させ、AMPK 経路の活性化による脂質代謝促進の可能性を示唆した。以上のことから、WLE には MS などの肥満を原因とする疾患に対する改善作用があり、予防や治療に有用であると考えられた。

1) Ogawa, T, *et al. Food Chem.*, 2010, vol.118, p.239-244
2) Yamasaki, M, *et al. Nutr. Res. Pract.*, 2013, vol.7, p.267-272

Wasabi Leaf Extracts, Metabolic Syndrome, PPARγ

講演番号：3F37a06
講演日時、会場：3 月 28 日 10:05～ F 校舎 37 会場

キサントフモール精製物投与による KKAy マウスの抗肥満作用

Anti-obesity effect of dietary purfied xanthohumol in KKAy mice.

○高橋 光輝、長田 恭一 (明治大農)
○Koki TAKAHASHI, KYOICHI OSADA (Meiji Univ.)

【目的】生活習慣病の予防・改善に、種々の食品成分の機能性が注目されている。その中でホップに存在する、プレニル基を有するカルコン類のキサントフモールは、種々の強い生理作用を示すことが報告されている。現在までに、キサントフモール高含有ホップ抽出物(HRXE、キサントフモール 18%含有)を用いて、抗肥満作用を明らかにしてきた。本研究では、キサントフモール本体の効果を実証するために、HRXE より精製したキサントフモール精製物(PX、キサントフモール 80%含有)を肥満誘発マウスに投与して、その効果を検証した。
【方法】肥満・糖尿病モデルマウスである KKAy マウス(3 週齢、雄性)を 1 週間予備飼育した後に、対照食を与えた C 群(n=6)、対照食に 0.2%の PX を加えた飼料を与えた PX 群(n=6)に分けて 81 日間飼育した。飼育はペアフィーディング条件で行った。飼育終了後、12 時間絶食させ、エーテル麻酔を施し、眼底採血死させた後、血漿と肝臓の脂質代謝および糖尿病に関わる各パラメータを解析した。
【結果】内臓脂肪重量は、C 群と比べて PX 群で有意に低くなった。また、脂肪酸合成を制御する転写因子である肝臓の SREBP1c の mRNA 発現レベルが、C 群と比べて PX 群で有意に低くなり、脂肪酸 β 酸化に関連する核内受容体の PPARα、および酵素の ACOX と CPTⅡの各 mRNA 発現レベルが、C 群と比べて PX 群で有意に高くなった。さらに、血漿レプチンレベルは内臓脂肪重量の低下と関連して、C 群と比べて PX で有意に低くなった。
【考察】PX の摂取により内臓脂肪重量が減少し、それに伴って血漿レプチンレベルが改善した。また、肝臓の脂肪酸合成が抑制され、一方で、脂肪酸 β 酸化が促進された。このように、PX は脂肪の蓄積を制御する作用を示すことが明らかとなった。PX はキサントフモールを約 80%含んでいる。よって、これまでに明らかにしてきた HRXE の抗肥満作用は、キサントフモール本体の効果であると考えられた。

Xanthohumol, Polyphenol, Anti-obesity

講演番号：3F37a07
講演日時、会場：3 月 28 日 10:16～ F 校舎 37 会場

卵巣摘出ラットにおける共役リノール酸と温州みかん抽出物の肥満予防効果

Preventive effect of conjugated linoleic acid and mandarin orange extract on ovariectomy-induced dyslipidemia in female rats.

○小栗 幹也[1]、谷澤 郁[1]、長田 恭一[1]、向井 克之[2] ([1]明治大農、[2]ユニチカ)
○mikiya oguri[1], Kaoru Tanizawa[1], Kyoichi Osada[1], Katsuyuki Mukai[2] ([1]Meiji Univ., [2]Unitika)

【目的】卵巣を摘出した閉経後肥満発症モデルラットに、共役リノール酸（CLA）と温州みかん抽出物（MOE）を単独あるいは同時に投与した場合の肥満予防効果を検証した。

【方法】6 週齢の Wistar 系雌性ラットに卵巣摘出手術を（対照は偽手術）施した。3 週間の予備飼育の後、卵巣を摘出したラットを食餌により 4 群に分けた。偽手術ラットには CLA と ME を添加しない基礎飼料（SHM 群）、卵巣摘出ラットには基礎飼料（OVX 群）、および基礎飼料に 1%CLA を添加した飼料（CLA 群）、1%MOE を添加した飼料（MOE 群）、あるいは 1%CLA と 1%MOE を添加した飼料（INT 群）をそれぞれ給餌した。飼料は、SHM 群は自由摂食で、卵巣摘出ラットはペアフィーディング条件で与えた。8 週間の飼育の後、12 時間の絶食期間を設け、腹部動脈より採血死させ、肝臓、腎臓、盲腸、皮下脂肪組織および内臓脂肪組織（子宮周囲、腎臓周囲、腸間膜）を採取し、脂質代謝に関わる種々のパラメーターを測定した。

【結果】卵巣を摘出した 4 群のラットの体重増加量と平均摂食量は、SHM 群と比べて顕著に増大したが、その 4 群間には有為な差は認められなかった。しかし、CLA 群、MOE 群および INT 群の総白色脂肪重量は OVX 群と比べて低くなった。血漿トリグリセリド濃度は、CLA 群、MOE 群および INT 群で OVX 群と比べて顕著に低くなった。また、肝臓トリグリセリド濃度については、CLA 群と INT 群で OVX 群と比べて有意に低下した。このことから、CLA と MOE の摂取により卵巣摘出に伴う脂質代謝変動が制御されると考えられた。現在、肝臓の脂質代謝に関連する酵素活性とその遺伝子発現を解析し、各成分が発揮する効果の作用メカニズムと、そのコンビネーション効果について検討している。

conjugated linoleic acid, mandarin orange, menopausal symptom

講演番号：3F37a08
講演日時、会場：3 月 28 日 10:27～ F 校舎 37 会場

オキアミ由来の 8-ヒドロキシエイコサペンタエン酸（8-HEPE）による抗肥満作用

Anti-obesity effect of 8-hydroxyeicosapentaenoic acids in high fat diet-induced obese mice

○山田 秀俊[1]、菊地 明香[1]、箱崎 真友佳[1]、本舘 香織[1]、長洞 希[1]、弘瀬 雅教[2]([1]岩手生工研・生物資源、[2]岩手医大・薬)
○Hidetoshi Yamada[1], Sayaka Kikuchi[1], Mayuka Hakozaki[1], Kaori Motodate[1], Nozomi Nagahora[1], Masamichi Hirose[2] ([1]IBRC, [2]Iwate Medical Univ.)

【研究背景】

脂質の過剰蓄積は肥満症を引き起こし、糖尿病や心血管障害、がんなど生活習慣病の原因となる。そのため、健康維持には脂質の摂取と合成、分解のバランスを保つ事が必須である。ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体（PPAR）は脂質の蓄積と分解を制御する核内受容体であり、不飽和脂肪酸や脂肪酸代謝物によって活性化される。PPAR の活性化は、脂質分解、アディポネクチン産生、糖の取り込みを促進させることで、生活習慣病の予防や改善に効果がある。

これまでに我々は、オキアミ成分の脂質蓄積抑制効果を見いだし(1)、動物試験によってオキアミ成分の抗肥満効果を示した(2)。さらに、オキアミ成分による抗肥満効果の作用機序を明らかにする目的でトランスクリプトーム解析を行い、肝臓における PPARα活性化を示唆する結果を得た。そこで、GAL4 と PPAR リガンド結合部位の融合タンパク質を用いたレポーターアッセイ系を構築し、イサダ成分の PPAR 活性化作用を検討した結果、イサダ抽出物が PPARα、γ、δ全てを活性化する事を見いだした。その後、PPARαリガンド活性を指標に活性物質の精製・同定を行い、8-HEPE がオキアミ中の活性成分であることを示した(3)。

【研究方法と目的】

8-HEPE による肥満および脂質異常症の改善効果を検討するため、乾燥オキアミ 3kg より 8-HEPE を 57mg 精製し、動物試験を行った。高脂肪餌（HD）による肥満誘導マウス（C57BL6/J DIO マウス,11 週齢,雄）を１．HD 摂取群、2.HD + EPA（10mg/kg）摂取群、3.HD + 8-HEPE（10mg/kg）摂取群の３群にわけ（各群 9 匹）１ヶ月間飼育した。

【結果と考察】

HD+8-HEPE 摂取群では HD 群に比べて、血中中性脂肪値が 14.5%、肝臓脂肪が 19.4%, 内臓脂肪値が 3.4%低下した。肝臓においては PPARαによる発現制御を受けている遺伝子（*Cpt1a*, *Ehhadh* , *Cyp4a10*）の発現増加が観察された事から、8-HEPE 摂取による PPARαの活性化が示唆された。一方で、PPARγおよび PPARδの活性化は観察されなかった事から、本試験で示された中性脂肪の低下作用は、8-HEPE 摂取によって肝臓中の PPARαが活性化したことで発揮されたと考えられる。

1. Yamada, H.*et.al.* (2011) *PLoS One* 6: e21952.　2. Sadzuka, Y. *et al.* (2012) *Biol. Pharm. Bull.* 35: 568–72.
3. Yamada, H. *et. al.*(2014) *J. Lipid Res.* 55: 895–904.

8-HEPE, Obesity, PPAR

講演番号：3F37a09
講演日時、会場：3 月 28 日 10:38～ F 校舎 37 会場

長期高脂肪・高ショ糖摂取マウスにおけるリンゴプロシアニジン類摂取による肥満・脂質代謝および腸内細菌叢に与える影響

Effects of apple procyanidin on obesity, lipid accumulation and intestinal microbiota in feeding high-fat/high-sucrose diet.

○升本 早枝子[1]、寺尾 明莉[1]、向井 孝夫[1]、庄司 俊彦[2] ([1]北里大・獣医、[2]農研機構・果樹研)
○Saeko MASUMOTO[1], Akari TERAO[1], Takao MUKAI[1], Toshihiko SHOJI[2] ([1]Kitasato Univ., [2]NIFTS)

【目的】果実や茶などに含まれるカテキンやケルセチンなどのポリフェノール類は糖・脂質代謝に与える生理機能性について多くの報告があり、その作用機序について解明されつつある。しかしながら、カテキン類が重合したプロシアニジン類は生体利用性が低く、その生理機能性については不明な点が多い。本研究では、プロシアニジン類をリンゴから調製し、プロシアニジン高重合体(PP)およびプロシアニジン低重合体(OP)摂取が、高脂肪高ショ糖食長期摂取における肥満や食事性脂肪肝、脂質代謝異常および腸内細菌叢に与える効果について検討した。
【方法】C57BL/6J マウスに、普通食（ND）群、高脂肪高ショ糖食（HFS）群、高脂肪高ショ糖＋リンゴ由来プロアシアニジン(APC)群、高脂肪高ショ糖食＋プロシアニジン高重合体（PP）群、高脂肪高ショ糖食＋プロシアニジン低重合体（OP）群の５群に分け、それぞれの試料を 20 週間摂取させた。プロシアニジン摂取群には APC、PP、OP をそれぞれ 0.5%濃度で水道水に溶解し、自由飲水で投与した。20 週飼育後、解剖を行い臓器重量の測定、血液生化学的一般分析、定量 Real-Time PCR による遺伝子発現解析および次世代シーケンサーによる腸内細菌叢の変化について解析を行った。
【結果】20 週経過後、各群の体重は HFS 群と比較してプロシアニジン摂取の APC 群、PP 群、OP 群いずれにおいても体重増加が有意に抑制された（$p<0.05$）。また肝臓重量も HFS 群では、ND 群と比較して有意な増加が認められた一方、PP 群では HFS 群と比較して有意に低値を示し、PP 摂取による肝臓への脂肪蓄積抑制が示唆された。さらに、血清中のグルコース、トリグリセリド、総コレステロール濃度は、HFS 群と比較して APC 群、PP 群、OP 群いずれにおいても有意な増加抑制が認められ、特に血清中トリグリセリドおよびコレステロール濃度においては PP 群に強い抑制効果が認められた。遺伝子発現の比較では、*Ppar-α*、*Ampk*、*Cpt* などの脂質代謝関連因子において、HFS 群と比較して OP 群に有意な発現量の増加が認められた。また *Srebp1c*、*Hmg-coa* などの脂質合成やコレステロール合成関連因子では OP 群、PP 群いずれにおいても発現量の低下が認められた。腸内細菌叢の解析では、ND 群と HFSD 群を比較したところ、*Rikenellaceae*、S24-7 および *Anaeroplasmataceae* は有意に低下し、一方、*Lachnospiraceae* は有意に増加したことから、これらの菌種が、肥満の亢進に関与している可能性が考えられた。これら４菌種は、PP 摂取によって菌叢の変化が抑制されていた。また、有意差は見られなかったものの、*Lactobacillales*、*Streptococcaceae*、*Peptococcaceae*、*Sphingomonadaceae* が HFSD 摂取によって増減した存在比が PP 摂取によって変動は抑制される傾向が見出された。

apple procyanidins, obesity, intestinal microbiota

講演番号：3F37a10
講演日時、会場：3 月 28 日 10:49～ F 校舎 37 会場

微生物制御発酵茶由来新規成分テアデノールの機能性に関する研究

Functionality of "Teadenol,"a New Polyphenolic Compound Extracted from a Tea Leaf Fermented by Aspergillus PK-1

○渡邉 知佳子[1]、池谷 翼[1]、洪 銘蔚[1]、吉田 滋樹[1]、河村 傳兵衛[2]、宮崎 均[1]([1]筑波大 生命環境、[2]株式会社 RIVERSON)
○Chikako WATANABE[1], Tsubasa IKEYA[1], Ming Wei HUNG[1], Shigeki YOSHIDA[1], Denbei KAWAMURA[2], Hitoshi MIYAZAKI[1] ([1]Tsukuba Univ., [2]RIVERSON Co.,Ltd.)

【背景・目的】

茶を特定の微生物処理により特定の条件で発酵させたものは微生物制御発酵茶と呼ばれ、その発酵過程に関与する細菌の種類によって茶に含まれるカテキン類などのポリフェノールは多様な生成物に変化する。本研究で着目した Teadenol は、アスペルギルス属 PK-1 菌のみにより発酵した微生物制御発酵茶から単離された新規のポリフェノール性化合物である。この発酵茶の抽出エキスを用いた先行研究より抗肥満・糖尿病効果が期待されているが、その効果が Teadenol によるものかは不明である。そこで、本研究では培養脂肪細胞及び疾病モデルマウスを用い、Teadenol の機能性を明らかにすることを目的とした。

【方法】

細胞実験ではマウス前駆脂肪細胞 3T3-L1 を用いた。Insulin、DEX、IBMX、10%FBS を含む DMEM で分化誘導し、その後 1 日おきに培地交換を繰り返して成熟脂肪細胞へと分化させた後、Teadenol を添加して 24 時間または 6 日間培養した。6 日間の培養により、成熟脂肪細胞は肥大化脂肪細胞へと成長した。細胞内の各種タンパク質の発現レベルは Western blot 法で評価した。動物実験は肥満・糖尿病モデルマウス（TSOD）を用いた。4 週齢雄 TSOD をコントロール群と Teadenol 投与群（通常食に Teadenol を混合）に分け 8 週間飼育し、体重及び血糖値の変化を観察した。解剖後、各組織を摘出し、Western blot 法による各種タンパクの解析、解剖時に採取した血液の各種生化学検査を行った。

【結果・考察】

細胞実験では、Teadenol が成熟脂肪細胞から分泌される善玉ホルモンの一種アディポネクチンの発現レベルを有意に上昇させると共に、脂肪細胞肥大化に伴うアディポネクチン発現レベルの低下を抑制した。また、アディポネクチン遺伝子の転写因子の一つ PPARγの発現レベルも増加させた。従って、Teadenol は脂肪細胞におけるアディポネクチンの発現を促進し、それは PPARγを介して行われることが示唆された。動物実験では、Teadenol 投与により経時的な体重及び血糖値の上昇が抑制され、脂肪組織のアディポネクチン発現レベル、更には血中アディポネクチン量も上昇した。また血中 HDL コレステロール値の上昇および LDL コレステロール値の低下も確認された。以上の結果より、Teadenol が肥満や糖尿病の予防・改善効果を有することが示唆された。

Teadenol, Adiponectin, Obesity

講演番号：3F37a11
講演日時、会場：3 月 28 日 11:10～ F 校舎 37 会場

緑茶品種「サンルージュ」の肥満抑制作用

Suppressive effect of Sunrouge on obesity

○和才 昌史[1,2]、村田 希[2]、野中 遥奈[2]、河岡 明義[1]、立花 宏文[2,3] ([1]日本製紙（株）アグリ・バイオ研究所、[2]九大院・農院・生機科、[3]九大・食品機能デザインセンター)
○MASAFUMI WASAI[1,2], MOTOKI MURATA[2], HARUNA NONAKA[2], AKIYOSHI KAWAOKA[1], HIROFUMI TACHIBANA[2,3] ([1]Agri-Biotechnology Research Laboratory,Nippon Paper Industries Co.Ltd., [2]Department of Bioscience and Biotechnology,Kyushu University, [3]Food Functional Design Research Center,Kyushu University)

【目的】植物色素であるアントシアニンを含有する緑茶品種「サンルージュ」は、抗疲労・抗ストレス効果が期待される機能性茶として育種された。これまでに、サンルージュは、「やぶきた」に代表される既存の緑茶品種と比較して、茶葉に含有される成分の組成が異なることが報告されており、サンルージュに特徴的な機能性や作用メカニズムを持つことが期待されている。そこで、本研究ではサンルージュの肥満抑制作用を検証した。

【方法】サンルージュを含む緑茶 52 品種の熱水抽出物を作成し、α - グルコシダーゼの活性阻害率を測定した。単回投与試験として、ICR 雄性マウスに可溶性デンプンを胃内投与した群（コントロール群)、サンルージュ熱水抽出物と可溶性デンプンを胃内投与した群（サンルージュ群)、やぶきた熱水抽出物と可溶性デンプンを胃内投与した群（やぶきた群）の投与後の血糖値を経時的に測定した。長期投与試験として、C57BL/6 雄性マウスに通常食を摂食させた群（通常食群)、高脂肪高ショ糖食を摂食させた群（高脂肪高ショ糖食群)、サンルージュ熱水抽出物ドライパウダーを含む高脂肪高ショ糖食を摂食させた群（サンルージュ群)、やぶきた熱水抽出物ドライパウダーを含む高脂肪高ショ糖食を摂食させた群（やぶきた群）を 8 週間飼育した後、体重、脂肪重量、空腹時血中インスリン濃度とインスリン抵抗性の指標である HOMA-IR を測定した。

【結果】緑茶 52 品種のうち、サンルージュとサンルージュの親株である茶中間母本農 6 号は、他品種と比較して高いα - グルコシダーゼ活性阻害率を示した。単回投与試験において、サンルージュ群では、コントロール群及びやぶきた群と比較して、糖負荷後の血糖値の上昇が優位に抑制された。長期投与試験において、普通食群と比較して、高脂肪高ショ糖食群で体重と脂肪量が増加したが、サンルージュ群で体重の増加が有意に抑制され、サンルージュ群及びやぶきた群で睾丸周辺脂肪重量と腎臓周辺脂肪重量の増加が有意に抑制された。また、普通食群と比較して、高脂肪高ショ糖食群で血中インスリン濃度が上昇し、HOMA-IR が増加したが、サンルージュ群及びやぶきた群で血中インスリン濃度の上昇が有意に抑制され、サンルージュ群で HOMA-IR の増加が有意に抑制された。
【結論】サンルージュは、やぶきたと比較して糖負荷後の血糖値の上昇を抑制すること、高脂肪高ショ糖食によって引き起こされる体重の増加を抑制し、インスリン抵抗性を抑制することを確認した。

Insulin resistance, Green tea, Obesity

講演番号：3F37a12
講演日時、会場：3 月 28 日 11:21～ F 校舎 37 会場

マウス脂肪細胞の脂肪代謝に対する EGCG およびカフェインの影響

Effects of EGCG and Caffeine on Lipid metabolism in mouse Adipocytes

○杉浦 千佳子[1]、劉 リタン[2]、茶山 和敏[2] ([1]常葉大健プロ、[2]静岡大院農)
○Chikako SUGIURA[1], Ritan RYU[2], Kazutoshi SAYAMA[2] ([1]Tokoha Univ., [2]Shizuoka Univ.)

我々は，マウスを用いた研究において，緑茶が抗肥満作用を有し，その成分のうち，カテキンとカフェインの組み合わせ投与が緑茶と同様の強い脂肪蓄積抑制作用を示すことを報告している。さらに，マウス脂肪細胞培養実験でも，カテキンとカフェインの組み合わせによって脂肪蓄積抑制効果を示し，そのメカニズムとして，脂肪細胞内のトリグリセリドの合成を抑制し，さらに白色脂肪細胞内での UCP1 発現により熱産生によるトリグリセリドの分解を促進することで，細胞内の脂肪の蓄積を抑制していることを明らかにした。カテキンには，主に EC，EGC，ECG，EGCG の 4 種類の成分が含まれているが，これら成分とカフェインの組み合わせによる影響やそのメカニズムについては検討されていない。そこで，本研究では，緑茶カテキンに最も多く含まれている EGCG とカフェインがマウス脂肪細胞の脂質代謝に及ぼす効果を検討した。

【方法】マウス脂肪前駆細胞株 3T3-L1 細胞を脂肪細胞へ分化誘導した後，基本培養液をコントロールとして，１，2.5，５および 10μg/mL の EGCG と，50 および 100μg/mL のカフェインを単独あるいは組み合わせて添加した培養液中で８日間培養した。培養終了後，オイルレッド染色液で脂質染色し，分化した細胞中の脂肪蓄積の程度を比較するとともに，培養細胞中のトリグリセリド(TG)量および脂肪細胞の脂質合成の指標である GPDH 量を分析・比較した。さらに，そのメカニズムを解明するため細胞内の脂質代謝に関連する数種の遺伝子の mRNA 発現を解析した。

【結果および考察】その結果，EGCG 単独添加群および EGCG ＋ カフェイン添加群の両方で，細胞内脂肪蓄積量が抑制され，両者に差は見られなかった。細胞内の脂肪酸合成に関する GPDH 活性は，EGCG 単独添加群および高濃度の EGCG とカフェイン組み合わせ添加群で抑制が見られた。細胞内脂肪酸分解に関係する UCP1 の発現は EGCG 単独および EGCG とカフェイン組み合わせ添加培養で上昇した。しかし，PPARγ，GLUT4，HSL の mRNA の発現量については変化がなく，EGCG 単独および EGCG とカフェイン組み合わせ添加培養のいずれの群でも差はみられなかった。

以上の結果から，EGCG は単独でも，脂肪酸合成の抑制によって脂肪細胞内の脂肪蓄積を抑制するが，脂肪分解には影響しないことが判明した。一方，EGCG はカフェインと組み合わせて添加しても，単独よりも強い脂肪蓄積抑制効果はなく，その抑制メカニズムは，EGCG と同様に，脂肪酸合成の抑制作用によることが判明した。そのため，カテキンとカフェインによる脂肪細胞の脂肪蓄積抑制作用は，EGCG だけでなく，他のカテキン類も関係していることが示唆された。

Lipid metabolism, EGCG, Caffeine

講演番号：3F37a13
講演日時、会場：3 月 28 日 11:32～ F 校舎 37 会場

マウスの摂食および脂肪蓄積に対する EGCG とカフェインの効果

Effects of EGCG and caffeine on food intake and fat accumulation in mice

○劉 栗タン[1]、茶山 和敏[1]、原 征彦[2]、杉浦 千佳子[3] ([1]静岡大学・農・院、[2]（株）茶研究・原事務所、[3]常葉大学・健康プロ・栄養)
○ LITONG LIU[1], KAZUTOSHI SAYAMA[1], YUKIHIKO HARA[2], CHIKAKO SUGIURA[3] ([1]Shizuoka Univ., [2]Tea Solutions, Hara Office Inc., [3]Tokoha Univ.)

＜緒論＞　我々は、これまでの研究で、緑茶カテキンとカフェインがマウスにおける抗肥満効果を有することを報告している。しかしながら、緑茶カテキンは主に 8 種類のカテキンから成っており、いかなるカテキンがカフェインとの組み合わせによって抗肥満作用を有しているかは、まだ明らかになっていない。そこで、本研究では、緑茶カテキンの主成分である EGCG とカフェインを種々の濃度で単独および組み合わせてマウスに投与して、それらの摂食および脂肪蓄積に対する効果と最適な組み合わせ比率を検討した。
＜材料及び方法＞　投与実験は、10 週齢のメス ddY マウスを使って行った。EGCG とカフェインの投与量は、以前の研究結果で脂肪蓄積抑制作用が見られた２％緑茶粉末の含有量に準じた、0.1% EGCG と 0.05%カフェインの混合比率を基準として、さらに両成分を倍と半分の割合で単独または組み合わせて市販飼料と混合して、16 種類の投与実験用飼料を作成した。これらの飼料を 8 週間投与し、投与期間中、週１回体重と摂食量を測定した。投与実験終了後、解剖して、各臓器重量、腹腔内脂肪重量および血中脂質量を測定した。
＜結果及び考察＞　EGCG の単独投与は、摂食と腹腔内脂肪蓄積に影響しなかった。対照的に、カフェイン単独投与はいずれの投与群でも腹腔内脂肪蓄積の抑制作用が見られ、0.1%カフェイン投与群では摂食抑制作用も確認された。一方、EGCG とカフェインの混合投与群では、いずれの群でも脂肪蓄積が抑制され、0.05%EGCG+0.1%カフェイン投与群と 0.1%EGCG+ 0.1%カフェイン投与群では、0.1%カフェイン単独投与と比較して脂肪蓄積量に有意な差は見られなかったが、より強い摂食抑制作用が見られた。肝臓重量と副腎重量は EGCG+カフェインの組み合わせ投与によって有意に低下していた。また、血清 HDL-C レベルは 0.2%EGCG+0.025%カフェイン投与群のみで有意に増加した。EGCG とカフェインの組み合わせによる摂食抑制作用を詳細に調べるため、摂食抑制作用が強かった 0.1%カフェイン投与群と 0.1%EGCG+ 0.1%カフェイン投与群を別に作成して、摂食量をより詳細に検討した結果、0.1%EGCG+ 0.1%カフェイン投与群の摂食量は 0.1%カフェイン投与群と比較して有意に減少していることが判明した。
　以上の結果から、カフェインはマウスにおいて摂食および脂肪蓄積の抑制活性を有しており、特に、摂食抑制作用については、カフェイン単独によるその抑制作用が EGCG によって促進される可能性が示唆された。

EGCG and Caffeine, Fat accumulation, Food intake

講演番号：3F37a14
講演日時、会場：3 月 28 日 11:43～ F 校舎 37 会場

各種茶の膵リパーゼ阻害活性と活性物質の同定

Inhibitory activity on pancreas lipase of several teas and identification of active compounds

○小池 勇介[1]、藤田 智之[1]、古賀 邦正[2] ([1]信州大院農、[2]東海大開発工学)
○Yusuke Koike[1], Tomoyuki Fujita[1], Kunimasa Koga[2] ([1]Shinshu Univ., [2]Tokai Univ.)

【目的】脂質は脳や生体膜の構成成分として重要であるものの、摂取エネルギーが高い成分でもあり、現代のような飽食の時代には、過剰摂取による肥満や肥満に起因する生活習慣病発症の要因ともなっている。食物中の脂肪（トリアシルグリセロール）は、脂質消化酵素の膵リパーゼによって脂肪酸と 2-モノアシルグリセロールに分解され腸管から吸収される。したがって、膵リパーゼの働きを抑制する成分があれば、肥満予防に役立つことが期待される。これまでに日本産の麹菌発酵緑茶が煎茶以上のリパーゼ阻害活性を示すことを明らかにしたことから、中国産の茶類を用いて膵リパーゼ阻害活性を比較し、それらに含まれる活性成分の解明を目的に本研究を行った。

【方法】膵リパーゼは豚由来の膵リパーゼ（SIGMA 社）を用い、膵リパーゼの活性測定にはリパーゼキット S（DS バイオファーマメディカル社）を用いた。膵リパーゼ阻害活性の評価は、試料を添加しない反応の膵リパーゼ活性（A）と添加した反応の活性（B）を求め、100−{B/A}×100 の式に従い、膵リパーゼ阻害率(%)として算出した。試料は、茶葉 1g に対して水 10ml を加えて常温、24 時間振盪抽出したものを測定試料とした。まず、測定試料を適宜希釈し、膵リパーゼ阻害活性を測定した。活性が認められた麹菌発酵緑茶及び白豪銀豪針(各 20g)を熱水抽出し、活性を指標として阻害成分を分離、分析した。

【結果】麹菌発酵緑茶と中国産の茶類計 30 種の膵リパーゼ阻害活性を測定した結果、麹菌発酵緑茶と中国産の白茶である白豪銀豪針に高い阻害活性が認められた。この熱水抽出物を酢酸エチル、ブタノールにより順次分配抽出し、酢酸エチル層、ブタノール層および水層を得た。活性を比較したところ、酢酸エチル層、次いでブタノール層に阻害が認められた。活性を指標にして酢酸エチル層を ODS カラムクロマトグラフィーで分離した結果、20%MeOH 溶出画分と 40%MeOH 溶出画分に高い活性が認められた。20%MeOH 溶出画分をさらに分離し、活性成分として没食子酸およびガロカテキンを同定した。一方、40%MeOH 溶出画分には、エピカテキン、エピガロカテキンガレート、ガロカテキンガレート等のカテキン類が含まれていることを確認した。麹菌発酵緑茶と白豪銀豪針いずれの抽出物も酢酸エチル層に含まれる活性成分の成分量は異なるものの、同様の成分組成を示した。現在、ブタノール層に含まれている活性成分についても解析中である。

lipase inhibitor, tea, polyphenol

講演番号：3F37a15
講演日時、会場：3 月 28 日 11:54～ F 校舎 37 会場

ウンシュウミカン(*Citrus unshiu*)葉のリパーゼ阻害活性物質
A lipase inhibitor from *Citrus unshiu* leaves

○高田 雄輔[1]、松川 哲也[1,2]、伊藤 仁久[2]、志水 恒介[2]、堀川 勇次[2]、友廣 教道[2]、津本 光貴[2]、橋爪 淳二[2]、藤田 卓也[2]、文室 政彦[2]、宇都宮 直樹[2]、中垣 友太[3]、村田 和也[3]、松田 秀秋[2,3]、梶山 慎一郎[1] ([1]近畿大生物理工、[2]近畿大附属農場、[3]近畿大薬)
○ Yusuke TAKATA[1], Tetsuya MATSUKAWA[1,2], Kimihisa ITO[2], Kosuke SHIMIZU[2], Yuji HORIKAWA[2], Norimichi TOMOHIRO[2], Teruyoshi TSUMOTO[2], junji HASHIDZUME[2], Takuya FUJITA[2], Masahiko HUMIMURO[2], Naoki UTSUNOMIYA[2], Yuta NAKAGAKI[3], Kazuya MURATA[3], Hideaki MATSUDA[2,3], Shin'ichiro KAJIYAMA[1] ([1]Faculty of Biology-Oriented Science and Technology, Kinki University, [2]The Experimental Farm, Kinki University, [3]Faculty of Pharmacy, Kinki University)

【研究目的】
近畿大学では、附属湯浅農場にて約 200 系統の柑橘系果樹が管理・栽培されている。これらの多くはその果実が食用として利用されており、中でもウンシュウミカン(*Citrus unshiu*)は、我が国においてバナナ、リンゴに並び年間消費量が多い果実である。ウンシュウミカンは、古来よりその果皮が漢方薬として使われるなど機能性についても注目されており、近年では抗アレルギー作用等を持つ機能性食品としての研究も進んでいる。一方、果実以外の非食用部位（剪定葉や枝、寿命木）に関してはこれまであまり注目されてきておらず、機能性二次代謝産物に関する研究も乏しい。非食用部位の処分には、運搬・粉砕・粉砕後の後処理など多くの労力を費やさなければならないことから、これらの有効な利用方法の確立が求められている。本研究ではウンシュウミカンの非食用部位の有効利用に資する知見を得るため、抗肥満作用の指標の一つであるリパーゼ阻害活性を評価することにより、非食用部位の新規機能性の探索と、それに関与する二次代謝産物の同定を目的とした。

【方法および結果】
植物材料としては、本学附属農場にて栽培されたウンシュウミカン(*Citrus unshiu*)葉を用いた。天日乾燥後の葉をワーリングブレンダーにて粉砕後、20 倍量の溶媒（メタノール、酢酸エチル、アセトン）に 72 時間浸漬した。得られた各粗抽出物をリパーゼ阻害活性試験にて評価したところ、メタノール抽出物に活性を見いだした。次に、メタノール抽出物を HPLC-PDA 分析に供したところ、クロマトグラムに主要成分として顕著に現れるピークが見いだされた。このピークを同定するため続いて LC/MS/MS 分析に供したところ、主要ピークには、カンキツ類に見られる代表的なフラバノン配糖体である hesperidin および diosmin が含まれることが示唆された。そこでこれらの標品を用いてリパーゼ阻害活性を評価したところ、diosmin には活性が見られなかったが、hesperidin に活性が見られた。以上の結果より、ウンシュウミカン葉メタノール抽出物のリパーゼ阻害活性には hesperidin が寄与していることが示唆された。

Citrus unshiu, lipase inhibitor, hesperidin

講演番号：3F37p01
講演日時、会場：3 月 28 日 14:00～ F 校舎 37 会場

イチゴ種子エキスのヒト表皮三次元培養モデルにおける表皮バリアーおよび保湿機能分子に及ぼす作用

Effect of strawberry seed extract on molecules for epidermal barrier and moisturizing functions in a human cultured epidermis model

○竹田 翔伍、下田 博司（オリザ油化(株)）
○Shogo Takeda, Hiroshi Shimoda (Oryza Oil & Fat Chemical Co., LTD)

【目的】

イチゴの種子は果肉とともに食用に供されるが，種子中の成分やその抽出物の生理活性に関する報告は少ない. 演者らはイチゴ種子の成分研究を行った結果, これまでにフラボノイド配糖体の tiliroside や kaempferol-3-*O*-glucoside を含有することを明らかにしている. 一方生理活性では, イチゴ種子の 70%エタノール抽出物 (SSE) がヘアレスマウス皮膚のセラミド (Cer) およびヒアルロン酸の合成に関与する酵素や, peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)α および γ の遺伝子発現を経口投与で高めることを見出している. 近年, PPARγ の活性化がセラミド合成酵素の発現を促進することが報告されていることから, 今回ヒト表皮三次元培養モデルを用いて SSE および tiliroside の表皮における保湿やバリアー機能に関与する分子発現に及ぼす作用を検討した.

【方法】

培養系に SSE (1-10 μg/mL) または tiliroside (0.1-1 μg/mL) を添加して 5 日間培養し, 角質と表皮を分離後に薄層クロマトグラフィー (TLC) で角質内の Cer 含量を測定した. 同時に Cer とグルコシルセラミド (GlcCer) の蛍光免疫染色も行った. また, 表皮の保湿やバリアー機能に関与する firaggrin, involucrin, Cer 合成の出発反応を触媒する律速酵素 serin palmitoyltransferase (SPT) のタンパク発現をウエスタンブロッティング法で評価した. 同様に表皮 Cer から sphingomyelin (SM) を経て角質層内の Cer 合成に関与する sphingomyelin synthase, sphingomyelin phosphodiesterase (SMPD1), GlcCer を経て角質層 Cer の合成に関与する glucosylceramide synthase (GCS),や glucocerebrosidease の発現も調べた.

【結果および考察】

SSE (1 および 10 μg/mL) および tiliroside (0.1 および 0.3 μg/mL) は角質層内の Cer 含量を増加させた. また, 免疫染色像においても Cer と GlcCer の増加を認めた. ウエスタンブロッティグの結果, SSE (1 μg/mL) および tiliroside (0.1 および 0.3 μg/mL)の添加により, SPT, SMPD1 ならびに GCS の発現増加が認められた. さらに firaggrin および involucrin の発現は全ての添加濃度において増加が認められた. これらの結果より, SSE とその主成分 tiliroside は Cer 合成に関与する酵素の発現を高めることで角質層 Cer を増加させるとともに, firaggrin や involucrin を増加させることで表皮のバリアー機能や保湿機能を高めるものと考えられた.

strawberry seed, tiliroside, stratum corneum

講演番号：3F37p02
講演日時、会場：3 月 28 日 14:11～ F 校舎 37 会場

食餌性紫黒米の血漿脂質レベル改善効果

Effects of dietary purple black rice on the plasma lipid levels

○近藤（比江森） 美樹[1]、中川 咲良[1]、永易 あゆ子[2] ([1]徳島文理大、[2]岡山県大)
○ Miki Hiemori-Kondo[1], Sakura Nakagawa[1], Ayuko Nagayasu[2] ([1]Tokushima Bunri Univ., [2]Okayama Prefectural Univ.)

【目的】 紫黒米は、糠層に多様な機能を有するアントシアニン色素を豊富に含む食品である。我々は既に、紫黒米の主要アントシアニンである cyanidin-3-glucoside (C3G) の大部分が紫黒米の加熱処理により protocatechuic acid (PCA) に分解されるが、鉄による酸化誘導マウスに対して経口投与した PCA は C3G よりも高い抗酸化作用を示すことを報告している。本研究では、紫黒米摂取ならびに紫黒米の加熱処理がコレステロール添加高脂肪食飼育マウスの血漿脂質レベルに及ぼす影響について検討した。

【方法】 試料米として、紫黒米は朝紫、対照の玄米にはヒメノモチを用い、精米により糠と胚乳を得た。紫黒米由来の胚乳を共通で使用し、未加熱群は胚乳を炊飯・冷却後に各々の糠を添加して、凍結乾燥後に粉砕した。一方、加熱群は、胚乳に各々の糠を添加して炊飯後、未加熱群と同様に凍結乾燥・粉砕した。さらに、紫黒米の糠は加水後、30 分間加熱して乾燥・粉砕した。次いで、これら試料を 20%配合したコレステロール添加高脂肪食（HCHFD）を調製し、C57BL/6J マウス（5 週齢、雄性）を、①普通食（ND），②HCHFD，③未加熱の紫黒米配合 HCHFD，④加熱の紫黒米配合 HCHFD，⑤未加熱の玄米配合 HCHFD，⑥加熱の玄米配合 HCHFD，⑦胚乳配合 HCHFD、⑧未加熱の紫黒米糠配合 HCHFD、⑨加熱の紫黒米糠配合 HCHFD の 9 群に分けて 14.5 週間自由摂取させた。一晩絶食後、解剖して血液と肝臓を採取した。血漿については親水性活性酸素消去能（H-ORAC）、チオバルビツール酸反応物質（TBARS）及び TG、総コレステロール、HDL-コレステロール、および NEFA を測定した。肝臓については、ホモジネートを調製後、遠心により得られた上清の TBARS 値を測定した。

【結果および考察】 H-ORAC 値ならびに TBARS 値の群間の違いは認められなかった。血漿脂質のうち、HDL-コレステロール濃度は HCHFD 群において ND 群に対して低値を示し、コレステロール添加高脂肪食による脂質異常を認めたが、紫黒米配合 HCHFD 群では高値を示し、HDL-コレステロール濃度の低下が改善された。この効果は、未加熱群よりも加熱群で高いことが示された。以上の結果から、食餌性紫黒米はコレステロール添加高脂肪食飼育マウスにおける血漿脂質異常を HDL-コレステロール濃度の低下抑制により改善することが明らかになった。

Black rice, Plasma lipid level, Thermal treatment

講演番号：3F37p03
講演日時、会場：3 月 28 日 14:22～ F 校舎 37 会場

In vitro screening on 3T3-L1 adipocytes reveals Eurycoma longifolia Jack and Piper nigrum L. as dual active Indonesian medicinal plants for anti-diabetes and anti-obesity

○Lucy LAHRITA, Eisuke KATO, Jun KAWABATA (Hokkaido University)

Aim of the study: Lowering lipid accumulation in adipose tissues is as important as enhancing insulin sensitivity in obesity-related diabetic patients. For this purpose, Indonesian traditional medicinal plants were examined for their potentials in glucose uptake enhancement and lipid suppression on 3T3-L1 adipose cells. This study would lead to the application of selected plants as potential anti obesity-diabetes mellitus.

Materials and methods: Dried Indonesian medicinal plants were extracted with 50% (v/v) aq. methanol. The extracts were dissolved in 50% DMSO when being tested against 3T3-L1 cells. Insulin-induced glucose uptake enhancement was performed by incubating fully differentiated 3T3-L1 cells with samples for 4 days, followed by treatment with 100 nM of insulin. Subsequently, 0.1 μM of 2-deoxyglucose (2-DG) was added to the cells and enzymatic fluorescence method was used to measure 2-DG uptake. Lipid accumulation on 3T3-L1 was assessed using Oil Red O staining, in which tested extracts were added on the forth day after the induction of differentiation. On day 9, the differentiated adipocytes were stained with Oil Red O and then measured at the absorbance of 520 nm. CCK-8 assay was employed to determine cytotoxicity concentration of each plant extract.

Results: Among the 76 plant extracts, 16 plants enhanced glucose uptake in which 4 species reduced lipid production of 3T3-L1 adipocytes. The results of CCK-8 assay show that the lipid-lowering activity of *Eurycoma longifolia* Jack and *Piper nigrum* L. was not a consequence of their cytotoxicity on the adipose cells. Those plants demonstrated activities in increasing glucose uptake upon insulin induction (more than 200% of control) and suppressing lipid accumulation in a concentration-dependent manner. Therefore, this study promotes both *Eurycoma longifolia* Jack and *Piper nigrum* L. as anti-diabetes and anti-obesity.

3T3-L1 adipocytes, Diabetes, Obesity

講演番号：3F37p04
講演日時、会場：3 月 28 日 14:33～ F 校舎 37 会場

前糖尿病患者の食後高血糖におけるバイオマーカーの探索

Investigate the biomarker of after-meal hyperglycemia in pre-diabetes patients

○実広 亜希子[1]、本嶋 秀子[2]、松川 隼也[3]、Villareal Myra[2,4]、荒木 理沙[5]、藤江 敬子[5]、橋本 幸一[5]、礒田 博子[2,4] ([1]筑波大生命環境、[2]筑波大北アフリカ研究センター、[3]筑波大院生命環境、[4]筑波大生命環境系、[5]筑波大医学医療系)

○Akiko Jitsuhiro[1], Hideko Motojima[2], Toshiya Matsukawa[3], Myra Villareal[2,4], Risa Araki[5], Keiko Fujie[5], Koichi Hashimoto[5], Hiroko Isoda[2,4] ([1]School of Life and Environmental Sciences, [2]ARENA, [3]Graduate school of Life and Environmental Sciences, [4]Faculty of Life and Environmental sciences, [5]Faculty of medicine)

【研究目的】

生活習慣病の一つである 2 型糖尿病は近年、患者数が増加傾向にある疾患の一つである。糖尿病発症の前段階(前糖尿病)では食後高血糖が見られ、インスリン過剰分泌、肥満、高脂血症など糖尿病に関わる症状の進行を引き起こす。そのため、食後血糖値の上昇を抑制する食品成分は 2 型糖尿病の予防に有効であると考えられる。食後高血糖に伴う、インスリン過剰分泌や脂質異常を抑制するためには、それらを制御する分子についても評価を行う必要がある。そこで、本研究では前糖尿病患者の食後血糖値上昇に連動して、血液中で変動するタンパク質について網羅的探索を行うことを目的とし、食後 120 分後の健常者、および前糖尿病患者のヒト血清を用いて、2 次元電気泳動によるプロテオミクス解析を行った。

【方法】

本研究における、ヒト臨床試験は健常者 12 例(男 5/女 7)、および前糖尿病患者 12 例(男 5/女 7)を対象として、基準食となるグルコース 50g を用いて実施した。被験者より、グルコース摂食 120 分後に採血を行った。まず、前糖尿病の指標となる、血糖値、インスリン値、中性脂肪(TG)値の測定を行った。続いて、血清サンプルよりタンパク質を単離し、2 次元電気泳動によるタンパク質発現変動解析を行った。アクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE における染色には、感度の高い、蛍光染色法を用い、MALDI-TOF MASS による PMF(Peptide Mass Fingerprint)法を用いて、目的タンパク質の同定を行った。なお、タンパク質の同定のためのソフトウェアには Mascot を利用した。

【結果・考察】

前糖尿病患者において、グルコース 50g 摂食 120 分後の血糖値、インスリン値が上昇した。また、TG 値については有意ではないものの増加傾向が認められた。2 次元電気泳動によるプロテオミクス解析においては、約 90 個のスポットが前糖尿病患者で変動することが確認された。現在、発現変動が認められたスポットについては MALDI-TOF MASS にタンパク質の同定を行っているところである。本発表ではこの結果についても合わせて行う予定である。

Pre-diabetes, biomarker, hyperglycemia

講演番号：3F37p05
講演日時、会場：3 月 28 日 14:44～ F 校舎 37 会場

前糖尿病患者及び健常人における表面研削加工玄米単回摂取による食後血糖値の白米、玄米との比較検討　ープロテオーム解析による作用メカニズムの検討―

Effect of partially abraded brawn rice, white rice and brown rice on postprandial glucose in Japanese healthy subjects and pre-diabetes subjects.

○本嶋 秀子[1]、実広 亜希子[5]、松川 隼也[6]、Villareal Myra[2]、荒木 理沙[3]、藤江 敬子[3]、奥西 智哉[4]、鈴木 彌生子[4]、岡留 博司[4]、橋本 幸一[3]、礒田 博子[2] ([1]筑波大学北アフリカ研究センター、[2]筑波大学生命環境系、[3]筑波大学医学医療系、[4]農研機構食品総合研究所、[5]筑波大学生命環境学群、[6]筑波大学生命環境科学研究科)

○Hideko MOTOJIMA[1], Akiko JITSUHIRO[5], Toshiya MASTUKAWA[6], Myra Villareal[2], Risa ARAKI[3], Keiko FUJUE[3], Tshiya OKUNISHI[4], Yaeko SUZUKI[4], Hiroshi OKATOME[4], Koichi HASHIMOTO[3], Hiroko ISODA[2] ([1]The Alliance for Research on North Africa (ARENA), University of Tsukuba, [2]Faculty of life and environmental science, University of Tsukuba, [3]Faculty of Medicine, University of Tsukuba, [4]National Agriculture and Food Research Organization (NARO-NFRI), [5]School of Life and Environmental Science, Unvercity of Tsukuba, [6]Graduate School of Life and Environmental Science, Unvercity of Tsukuba)

【研究目的】　生活習慣病の一つである 2 型糖尿病は近年、患者数が増加傾向にある疾患の一つである。日本人が主食とする米類の中でも玄米は白米に比べて Glycemic index（GI）値が低く、食後血糖値上昇が穏やかなことから 2 型糖尿病の予防に有効であると言われているが、白米に比べ、食感、食味ともに劣るため、高齢者層や若年層の嗜好性が低いのが現状である。そのため、生活習慣病予防のための玄米食の普及には、食味の改善とヒト試験による科学的エビデンスの獲得が不可欠である。食総研が開発した表面研削技術による厘搗玄米は、炊飯米が柔らかく食味も改善されている。本研究では、表面研削加工玄米と玄米・白米との単回摂食ヒト介入試験を実施し、食後血糖値等の改善効果を検討する。さらに、二次元電気泳動を用いたプロテオーム解析による機能性及び作用メカニズムの解析を行うことを目的とする。

【方法】　健常者 12 例（男 5/女 7）および前糖尿病患者 12 例（男 5/女 7）を対象として、グルコース 50g を用いた基準食による検査を実施し、その後、健常者および前糖尿病患者をそれぞれ 1 群 4 例 3 群にランダムに振り分けた。主要評価項目として GI および Glycemic Load（GL）値、副次的評価項目としてインスリン・中性脂肪（TG）の経時変化（0,15,30,45,60,90,120 分)を測定し、単回摂食における表面研削加工玄米と玄米・白米のヒトへの影響を検討した。また、前糖尿病患者を対象とした単回摂食におけるバイオマーカーの解析を行うため、男女 1 名ずつを選択し、血清を用いた二次元電気泳動によるタンパク質発現変動解析を行った。アクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE における染色は、感度が高い蛍光染色法を用い、質量分析法により目的タンパク質を同定した。

【結果】　前糖尿病患者について摂食試験の結果、全体的な傾向として、血糖は食後徐々に上昇し、食後 30 分ごろピークを迎え、食後 120 分にはおよそ食前の血糖値まで下降していた。また、インスリン値に関して、基準食のグルコースと比較してそれぞれのサンプルで差が見られた。2 次元電気泳動では、117 のスポットが確認され、そのうち発現変動に差が認められたスポットについては現在 MALDI-TOFMS によってタンパク質の同定を行っている。本発表では、この結果についても合わせて報告を行う予定である。

Glycaemic Load, Partially abraded brawn rice, Proteomics

講演番号：3F37p06
講演日時、会場：3 月 28 日 15:05～ F 校舎 37 会場

肥満・糖尿病モデル KK-A^{y}マウスにおける少量エタノール摂取の影響

Effect of low-dose ethanol ingestion on obese diabetic KK-A^{y} mice

○伊豆 英恵[1]、木本 晶子[2]、浦上 真治[2]、藤井 力[1]、加藤 範久[2] ([1]酒総研、[2]広大院・生物圏)
○Hanae Izu[1], Akiko Kimoto[2], Shinji Uragami[2], Tsutomu Fujii[1], Norihisa Kato[2] ([1]Nat. Res. Inst. Brewing, [2]Grad. Sch. Biosph. Sci., Hiroshima Univ.)

【目的】

2 型糖尿病は遺伝因子と環境因子が相互作用して発症する多因子疾患と位置づけられている。環境因子制御の観点から、栄養学的制御について検討する必要性があり、飲酒についても同様といえる。これまでに糖尿病発症が多量飲酒で促進され、少量飲酒で抑制される「J-カーブ効果」が疫学的研究から示唆されているが、摂取したアルコールの直接的影響かどうかは明らかではない。そこで、肥満・2 型糖尿病モデルである KK-A^{y}マウスを用い、少量エタノール摂取の影響について検討を行った。

【方法】

KK-A^{y}（5 週齢、オス）を購入し、6 週齢から、対照群（n=8）には水、1%エタノール群（n=8）には 1%（v/v）エタノール水、2%エタノール群（n=9）には 2%（v/v）エタノール水を唯一の飲水源として 10 週間、自由摂取させた。飼料は市販の固形飼料を自由摂取させた。16 週齢目で解剖を行い、影響を評価した。

【結果】

水、1%エタノール、2%エタノールの 3 群間において、血糖値、グルコース負荷試験、インシュリンレベルに有意な違いはなく、本実験のエタノール摂取条件で KK-A^{y}の糖尿病症状の改善は見られなかった。また、3 群間で肝重量及び血清の中性脂肪、GPT、GOT、アルブミンに有意な違いがなく、血清の TBARS に影響がなかったため、本実験のエタノール摂取条件は肝障害を誘導せず、酸化ストレスを引き起こさないと示唆された。KK-A^{y}の症状悪化にアディポサイトカインの関与が知られているため、エタノール摂取の影響を調べたところ、レプチンについては 3 群間で違いがなかったが、アディポネクチンが 1%及び 2%エタノール群で水群よりも有意に増加していることが明らかとなった。この他、1%エタノール群の血清の総コレステロールが水群よりも有意に減少していたが、これはアディポネクチン上昇による脂質代謝改善の影響と推察された。今回、KK-A^{y}において、エタノール摂取が高血糖を改善することはなかったが、アディポネクチンを上昇させる効果があることが明らかになった。適量飲酒の健康への良い影響が疫学から示唆されているが、アディポネクチンがその機序の一部を説明する可能性があると考えられた。

ethanol, adiponectin, KK-A^{y}

講演番号：3F37p07
講演日時、会場：3 月 28 日 15:16～ F 校舎 37 会場

海藻由来酸性多糖類の血糖値上昇抑制作用

Suppressive effect of acidic polysaccharides from marine alga for the elevation of blood glucose

○本 三保子[1]、高見澤 菜穂子[2]、仲村 麻恵[1]、鬘谷 要[1]、岩崎 一泰[3]、田中 克幸[3]、室田 明彦[4]([1]和洋女大生活、[2]早大規範科学総合研究所、[3]奥野製薬工業、[4]明治大理工)
○ Mihoko MOTO[1], Naoko TAKAMIZAWA[2], Asae NAKAMURA[1], Kaname KATSURAYA[1], Kazuyasu IWASAKI[3], Katsuyuki TANAKA[3], Akihiko MUROTA[4] ([1]Wayo Women's Univ, [2]Waseda Univ, [3]Okuno Chemical, [4]Meiji Univ)

【目的】

我々はこれまでに、酸性多糖の *in vitro* でのα-グルコシダーゼ活性阻害作用の分子量活性相関を明らかにしてきた。海藻にはさまざまな酸性多糖類が含まれており、本研究では、各種海藻抽出物を加水分解し、含有酸性多糖を低分子量化し、α-グルコシダーゼ活性阻害作用を検討した。さらに、α-グルコシダーゼ活性阻害作用の高い海藻抽出物から精製した酸性多糖の糖尿病モデルマウスに対する血糖値上昇抑制作用を検討した。

【方法】

実験 1）各種海藻抽出物を加水分解し、含有酸性多糖を任意の分子量に調整し、α-グルコシダーゼ活性阻害試験を行った。

実験 2）KK-A^y マウス（雄、5 週齢）を対照群とひじきフコイダン群に分け（n=8)、対照群には高脂肪・高ショ糖飼料を、ひじきフコイダン群には低分子量化したひじきフコイダンを添加した高脂肪・高ショ糖飼料をそれぞれ 3 週間投与した。経時的に空腹時血糖値を測定し、投与終了時には、インスリン値、HbA_{1c} 値を測定した。

【結果および考察】

実験 1）紅藻類、緑藻類、褐藻類のα-グルコシダーゼ活性阻害作用は、褐藻類が高い傾向であった。褐藻類の中では、ひじき抽出物のα-グルコシダーゼ活性阻害作用が高く、その作用は低分子量域で高い傾向であった。

実験 2）KK-A^y マウスに低分子量化ひじきフコイダンを長期摂取させた結果、空空腹時血糖値の上昇が有意に抑制された。ひじきフコイダン群の HbA_{1c} 値は対照群に比べて有意に低値を示し、インスリン値は低値傾向を示した。

以上の結果より、各種海藻抽出物のα-グルコシダーゼ活性阻害作用は海藻の種類によって異なることが確認された。さらに、低分子量化したひじきフコイダンは血糖値上昇抑制作用が期待できる新規生理活性素材となりうる可能性が示唆された。

acidic polysaccharides, lowered molecule, blood glucose

講演番号：3F37p08
講演日時、会場：3 月 28 日 15:27～ F 校舎 37 会場

米アルブミンの食後血糖値上昇抑制メカニズムの解明

Suppressive mechanism of rice albumin on postprandial hyperglycemia

○長谷 歩、安藤 俊希、旭 恵里奈、稲 成信、赤尾 真、熊谷 日登美（日大・生資科・生化）
○ Ayumu HASE, Toshiki ANDO, Erina ASAHI, Shigenobu INA, Makoto AKAO, Hitomi KUMAGAI (Dept. Chem. Life Sci., Nihon Univ.)

【目的】糖尿病は、インスリン分泌・感受性の不全により食後の高血糖が慢性的に続くことが問題であり、その予防と治療には、食後の血糖値上昇を穏やかにする食品の摂取が有効であると考えられている。我々はこれまでに、イネ種子中に含まれる 16 kDa の米アルブミン（Rice albumin: RA）が、健常ラットと二型糖尿病モデルマウスにおいて、グルコース摂取後の血糖値上昇を穏やかにすることを明らかにしている。RA は消化酵素により、14 kDa の難消化性の高分子ペプチドと低分子ペプチドに分解されるが、RA の食後血糖値上昇抑制作用成分が、高分子ペプチドなのか、低分子ペプチドなのか、また、その作用部位が、消化管内なのか、血中あるいは臓器なのかは明らかでない。高分子ペプチドが糖の吸着・吸収抑制といった食物繊維様の効果を示した場合、グルコースを腹腔内投与した場合には血糖値上昇抑制作用は期待できない。一方、RA が、グルコースの血中から細胞内への取込促進作用を示すとすると、グルコースを腹腔内投与しても血糖値上昇抑制作用を示す可能性がある。

そこで本研究では、RA の食後血糖値上昇抑制メカニズムを明らかにするため、RA を経口投与後、腹腔内グルコース負荷試験（IPGTT）を行い、その作用部位の検討を行った。さらに、RA をトリプシンによって分解し、生成した難消化性の高分子ペプチドおよび低分子ペプチドの経口グルコース負荷試験（OGTT）を行い、活性成分の同定を試みた。

【方法】米粒を粉砕後、水抽出および硫安分画によりアルブミン画分を分離し、透析後、凍結乾燥して RA 粉末を得た。これをラットに経口投与後、腹腔内にグルコースを負荷し（IPGTT）、経時的に血糖値および血中インスリン濃度を測定した。また、RA をトリプシンで処理後、ゲル濾過クロマトグラフィーにより、難消化性の高分子ペプチドおよび低分子ペプチド画分に分離した。これらをグルコースと共にラットに経口投与し（OGTT）、経時的に血糖値および血中インスリン濃度を測定した。

【結果】IPGTT において、RA 投与時の血糖値および血中インスリン濃度は、コントロール群と比較して有意な変化は見られなかった。このことから、RA の血糖値上昇抑制効果は、血中から細胞内へのグルコースの取込促進作用ではなく、小腸内におけるグルコースの吸収抑制による可能性が高いと考えられた。また、RA のトリプシン処理により生成した高分子ペプチドと低分子ペプチド画分を、グルコースと共にラットに摂取させたところ、低分子ペプチド画分において血糖値上昇抑制効果が確認された。以上のことから、RA による食後血糖値上昇抑制作用は、低分子ペプチドによる小腸におけるグルコースの吸収阻害によることが示唆された。

rice albumin, postprandial hyperglycemia, mechanism of action

講演番号：3F37p09
講演日時、会場：3 月 28 日 15:38～ F 校舎 37 会場

膵β細胞における *S*-エクオールのエナンチオ選択的なインスリン分泌増強作用について
S-Equol enantioselectively enhances glucose-stimulated insulin secretion in pancreatic ß-cells
○堀内 寛子[1]、白井 理絵[1]、原田 直樹[1]、中野 長久[2]、乾 博[3]、山地 亮一[1]([1]大阪府大・生命環境、[2]大阪女子短大、[3]大阪府大・栄養)
○Hiroko HORIUCHI[1], Rie SHIRAI[1], Naoki HARADA[1], Yoshihisa NAKANO[2], Hiroshi INUI[3], Ryoichi YAMAJI[1] ([1]Div. Life Environ. Sci., Osaka Pref. Univ., [2]Osaka Women's Junior College, [3]Div. Comp. Rehab., Osaka Pref. Univ.)

【背景と目的】2 型糖尿病は膵臓ランゲルハンス島（膵島）に存在するβ細胞からのインスリン分泌の低下と，末梢組織におけるインスリン感受性の低下が原因となる．アジア人は欧米人と比べて健常時からインスリン分泌能が低く，糖尿病発症早期からインスリン分泌量の低下がみられる．そのため，インスリン分泌を増強する食品因子にはアジア人型 2 型糖尿病の予防効果が期待できる．β細胞における cAMP の濃度上昇によるプロテインキナーゼ A（PKA）の活性化は，高グルコース時にのみインスリン分泌を増強する増幅経路として作用するため，低血糖を生じさせるリスクが低い．*S*-エクオールは大豆イソフラボンであるダイゼインから腸内細菌によって鏡像異性体特異的に産生され，エストロゲン受容体に結合して活性化させるエストロゲン様作用を示す物質である．我々はこれまでに *S*-エクオールがβ細胞の生存亢進作用をもつことを見出してきた．本研究では，膵島またはβ細胞株でのインスリン分泌に及ぼす *S*-エクオールの作用について検討を行った．
【方法と結果】8 週令のオス ICR マウスから単離した膵島を用いて，インスリン分泌に及ぼす *S*-エクオールの作用を検討した．その結果，*S*-エクオール（10 μM）は高濃度のグルコース（16.7 mM）によって刺激されたインスリン分泌を増強した．このインスリン分泌促進作用は鏡像異性体である *R*-エクオールには観察されず，*S* 体に特異的であった．高グルコース条件下における *S* 体特異的なインスリン分泌促進作用は，β細胞株である INS-1 細胞と HIT-T15 細胞においても観察され，INS-1 細胞においては 1 μM 以上で有意なインスリン分泌促進作用が認められた．女性ホルモンである 17β-エストラジオール（10 nM）と *S*-エクオール（10 μM）はエストロゲン受容体の転写活性を同程度まで促進させたが，17β-エストラジオールはインスリン分泌を促進しなかった．細胞内 cAMP レベルの上昇はβ細胞の一過的なグルコース応答を増幅するため，*S*-エクオールが cAMP-PKA シグナルの活性化に与える影響を検討した．*S*-エクオールはエナンチオ選択的に INS-1 細胞の cAMP 濃度を上昇させた．また，INS-1 細胞およびマウス単離膵島において，*S*-エクオールは PKA の標的となる転写因子である cAMP 応答配列結合タンパク質（CREB）の Ser133 のリン酸化レベルを増加させた．これらの結果から，*S*-エクオールは女性ホルモン様作用とは独立したメカニズムにより，エナンチオ選択的にグルコース刺激によるインスリン分泌を一過的に促進させることが明らかになった．また、*S*-エクオールは cAMP-PKA シグナルを活性化させることでインスリン分泌増強作用を発揮すると推察された．

S-equol, glucose-stimulated insulin secretion, pancreatic ß-cells

講演番号：3F37p10
講演日時、会場：3 月 28 日 15:49～ F 校舎 37 会場

ルイボス抽出物およびその構成成分の抗糖尿病作用の解析

Analysis of the Antidiabetic Effect of Rooibos Extract and its Components

○清水 裕美子、鎌倉 麗未、孫 銘辰、矢ヶ崎 一三、三浦 豊（農工大・院・応用生命）
○Yumiko SHIMIZU, Remi KAMAKURA, Myoung Jin SON, Kazumi YAGASAKI, Yutaka MIURA
(Department of Applied Biological Chemistry, Tokyo University of Agriculture and Technology)

【目的】ルイボス茶は南アフリカ固有のハーブ茶であり、種々の生理作用を有する可能性が指摘されており、多くの研究が行われている。我々は、既にグリーンルイボス抽出物（GRE）およびその主要成分であるアスパラチンが培養筋管細胞およびインスリノーマ細胞において抗糖尿病作用を示すこと、また糖尿病モデルマウスに投与することで血糖値抑制作用を示すことを報告している。しかし、ルイボス抽出物の生理作用がアスパラチン単独の効果によるかについては不明であり、他の成分の関与の可能性も予想されている。そこで本研究では、GRE とアスパラチンの培養細胞系における抗糖尿病作用を比較・検討し、GRE の作用機構を詳細に明らかにすることを試みた。
【方法】グルコース取り込み能は、ラット骨格筋由来 L6 筋管細胞を 11mM の糖を含む Krebs-Henseleit-Hepes 緩衝液下で 4 時間インキュベートし、培養前後のグルコース濃度を比較することで測定した。また、ラット由来インスリノーマ細胞である RIN-5F を用いてインスリン分泌能を ELISA により測定した。また、過酸化物特異的な蛍光試薬である 2', 7'-DCFH-DA の存在下で RIN-5F 細胞をインキュベートした後、フローサイトメトリーを用いて細胞内酸化ストレスレベルを測定した。
【結果】GRE、アスパラチンは、ともに筋管細胞による糖取り込み量を増加させたが、GRE 中に含有されるアスパラチン濃度と同濃度のアスパラチン単独添加に比べて、GRE はより強い糖取り込み促進作用を発揮した。同様に細胞内酸化ストレスレベルに対しても、GRE はアスパラチン単独添加時よりも、より顕著な抑制作用を発揮することが確認された。さらにインスリン分泌能に関しては、アスパラチンは単独添加によってインスリン分泌促進作用を示さなかったが、同濃度のアスパラチンを含む GRE はインスリン分泌を有意に促進した。
【結論】 ルイボス抽出物中のアスパラチンは抗糖尿作用および膵β細胞保護作用を示す成分の一つであるが、GRE に含まれる他の成分もこれらの作用に関与している可能性があり、さらに GRE 中の複数の成分間の相互作用により、協調作用が発揮されている可能性が示唆された。この可能性を検証するため、現在、次世代シークエンサーを用いて、GRE およびアスパラチンを作用させた RIN-5F 細胞のトランスクリプトームの比較検討を実施中であり、その結果も併せて報告する予定である。

diabetes, rooibos extract, aspalathin

講演番号：3F37p11
講演日時、会場：3 月 28 日 16:10～ F 校舎 37 会場

乳児期の低栄養により誘導されるインスリン分泌能の低下に対する魚油の効果

The effect of the mother's fish oil intake during lactation on the decrease in insulin secretory capacity in the offspring

○都築 毅、畠山 雄有、鄂 爽、山本 和史、坂本 有宇（東北大院農）
○Tsuyoshi TSUDUKI, Yu HATAKEYAMA, Shuang E, Kazushi YAMAMOTO, Yu SAKAMOTO (Tohoku Univ.)

【目的】摂取エネルギー量を制限する「カロリー制限」は、糖尿病の予防に効果的であることが示されている。一方、妊娠・授乳期の母親の「カロリー制限」による胎児・乳児期の低栄養状態は、子が成長してからの糖尿病の発症率を増加させることが知られている。このように、「カロリー制限」は実施する時期によって健康に与える影響が異なる。しかし、乳児期のみの栄養状態に着目して、子の将来に与える影響を検討した報告はほとんどない。そこで本研究では、乳児期のみの「カロリー制限」が糖代謝に与える影響について、マウスを用いて詳細に検討した。
【方法】妊娠した C57BL/6J マウスを通常飼育条件で出産させ、雄の仔マウスのみ選別し、3 群に分けた。通常飼育条件であるコントロール群は母獣 1 匹に仔を 8 匹、過剰栄養摂取群は母獣 1 匹に仔を 4 匹、カロリー制限群は母獣 1 匹に仔を 12 匹として飼育した。3 週齢で離乳させ、肥満を誘導するために高脂肪食を 8 週間摂食させた。次に上記と同様に飼育し、離乳させ、通常飼育食を 8 週間摂食させた。さらに、授乳中に魚油を強化した食事を母親に与えた試験も行った。
【結果】乳児期に「カロリー制限」をしたマウスでは、白色脂肪組織重量は少なく、白色脂肪細胞の肥大化も抑えられた。一方で、血中グルコース濃度の上昇やインスリン分泌能の指標である HOMA-β の低下が見られた。以上より、乳児期のみの「カロリー制限」は、成長後の肥満発症リスクを低減させるが、糖代謝調節能を低下させる可能性が示された。離乳後に通常飼育食を与えて検討したところ、乳児期に「カロリー制限」をしたマウスは、血中グルコース濃度の上昇やインスリン濃度の低下、HOMA-β の低下が見られた。膵ランゲルハンス島をインスリン免疫染色して観察したところ、インスリンの量に大きな変化はなく、インスリン産生能に影響は認められなかった。そして LCM 法を用いて、ランゲルハンス島の mRNA を抽出し、インスリン分泌能にかかわる分子の発現量を測定したところ、グルコースの取り込みに関わる GLUT2 やその上流の PPARγ の mRNA 発現量が「カロリー制限」によって有意に低下した。さらにこの糖代謝能異常は、母親に魚油を摂取させることより、キャンセルされた。
【考察】本研究より、乳児期のみの「カロリー制限」は、成長後の肥満発症リスクを低減させるが、インスリン分泌能を低下させ、糖代謝調節能を低下させることが示された。この解決方法の 1 つとして、授乳期の母親への魚油の強化を行ったところ、インスリン分泌能の低下はキャンセルされた。授乳中の母親への n-3 系脂肪酸（EPA や DHA）の強化は、子の将来のメタボリックシンドローム発症リスクを低下させる可能性が示唆された。

fish oil, lactation, insulin

講演番号：3F37p12
講演日時、会場：3 月 28 日 16:21～ F 校舎 37 会場

食用菊熱水中抽出物における抗糖尿病作用およびそのメカニズムの解明

Hot water extracts of edible Chrysanthemum morifolium Ramat. exert antidiabetic effects in obese diabetic KK-Ay mice

○山本 純平、只石 幹、山根 拓実、大石 祐一、清水 誠、服部 一夫（東農大応生科栄養）
○Jyunpei YAMAMOTO, Miki TADAISHI, Takumi YAMANE, Yuichi OISHI, Makoto SHIMIZU, Kazuo HATTORI (Tokyo University of Agriculture)

【目的】現在、わが国の糖尿病患者数は、予備軍を含めて約 2200 万人以上と推定され、そのほとんどはⅡ型糖尿病患者である。Ⅱ型糖尿病の病態形成にはインスリン抵抗性が中心的な役割を担っている。そのインスリン抵抗性には、アディポネクチンなどのアディポサイトカインや、脂肪細胞のサイズ、脂肪組織の炎症などが大きく関与することが知られており、Ⅱ型糖尿病の予防・改善において脂肪組織は重要な臓器であるといえる。これまでに我々は、食用菊‘コトブキ’の熱水抽出物が、3T3-L1 脂肪前駆細胞の分化を促進し、また、アディポネクチン産生を増加させ、抗糖尿病作用を有する可能性を見出している。そこで本研究では、Ⅱ型糖尿病モデルマウスである KK-Ay マウスを用い、食用菊熱水抽出物（HW-ECM）による抗糖尿病作用およびその作用メカニズムの検討を行った。
【方法】実験動物には KK-Ay マウス（9 週齢、♂）を用いた。1 週間の馴化飼育後、試験飼育を 5 週間行った。試料は AIN-93M 組成に準拠して作製し、食用菊群には食用菊熱水抽出物を 1%および 5%の濃度で添加した。経時的な血糖値の変動を測定するために、週に一度採血を行い、また試験飼育 4 週目にインスリン負荷試験を行った。5 週目に解剖を行い、解剖時に血液、脂肪を採取し、各種アッセイに供した。
【結果】HW-ECM は、Ⅱ型糖尿病モデルマウスにおいて血糖値を低下させ、インスリン抵抗性を改善した。また、血漿中アディポネクチン量、脂肪組織中のアディポネクチン mRNA 発現量も増加させた。さらに、HW-ECM は脂肪組織中の PPARγおよびその下流遺伝子の発現量を増加させた。加えて、HW-ECM は脂肪細胞のサイズを低下させ、脂肪組織における炎症性アディポサイトカインの mRNA 発現量を減少させた。
【結論】
HW-ECM による抗糖尿病作用機序は、PPARγ発現量の上昇、脂肪細胞サイズの低下および脂肪組織における炎症の抑制が関与する可能性が示唆された。さらに、これらの変化がアディポネクチン量を上昇させ、インスリン抵抗性を改善したと考えられた。以上のことから、本研究は HW-ECM がⅡ型糖尿病に有用な機能性食品となりうる可能性を示した。現在は HW-ECM 中の活性本体の同定を行っている。

Chrysanthemum morifolium Ramat., Diabetes, Adiponectin

講演番号：3F37p13
講演日時、会場：3 月 28 日 16:32～ F 校舎 37 会場

分離緑豆タンパク質のインスリン感受性亢進作用の解析

Mung bean protein isolate improves insulin sensitivity in diabetic KK-A^y mice.

○木村 早佑[1]、佐伯 健太[1]、小林 美里[1]、村井 篤嗣[1]、橘 伸彦[2]、本山 貴康[2]、河野 光登[2]、堀尾 文彦[1] ([1]名大院農、[2]不二製油・基盤研)
○ Sasuke KIMURA[1], Kenta SAIKI[1], Misato KOBAYASHI[1], Atsushi MURAI[1], Nobuhiko TACHIBANA[2], Takayasu MOTOYAMA[2], Mitsutaka KOHNO[2], Fumihiko HORIO[1] ([1]Nagoya Univ., [2]Fuji Oil Co.,Ltd.)

【背景】モヤシ種子として利用されている緑豆(Mung Bean)の可食部の 20%は 8sα-グロブリンが占め、このタンパク質は大豆のβ-コングリシニン(β-CG)と高い相同性(約 70%)を持つ。β-CG は脂質代謝やインスリン感受性の亢進作用が報告されているが、8sα-グロブリンの生理機能に関する成果は少ない。そこで本研究では、8sα-グロブリンを高含量で含む分離緑豆タンパク質(MPI)の新規な機能性の確立を目的として、MPI のインスリン感受性亢進作用とそれに続く高血糖発症抑制作用を糖尿病モデルマウスを用いて検討した。

【方法】2 型糖尿病モデルである KK-A^yマウスはインスリン抵抗性を主因として若齢から高血糖を発症する。4 週齢の KK-A^y マウス（雄）を 3 群に分け、AIN-93G 飼料を基盤にした組成に Casein（対照群)、MPI もしくはβ-CG を 20%含む飼料をそれぞれに 3 週間与えた。実験 1 では摂食状態で解剖を行った。実験 2 では、末梢組織でのインスリンシグナル伝達を比較するために 14 時間の絶食後にインスリン投与（腹腔内注射、0.67U/kg BW）を行い、その 15 分後に肝臓、骨格筋、精巣上体脂肪組織を採取して凍結した。

【結果】実験 1 : 体重増加と摂食量に 3 群間で差はなかった。実験期間中、MPI とβ-CG 群は Casein 群と比較して有意に低い血糖値を示した。解剖時の血中インスリン濃度は MPI とβ-CG 群で Casein 群よりも低い傾向を示した。18 日目に行ったインスリン負荷試験においても、MPI とβ-CG 群では Casein 群に比べて有意な血糖値低下を示し、インスリン感受性の亢進が観察された。肝臓では SREBP1-c およびその支配下の遺伝子である FAS, ACC-1 の mRNA レベルが MPI とβ-CG 群で Casein 群よりも有意に低下していた。精巣上体脂肪組織では、インスリン抵抗性を誘発するサイトカインである MCP-1 の mRNA レベルが Casein 群と比較して MPI とβ-CG 群で有意に低下した。
実験 2 : インスリンシグナル伝達系の一因子である Akt のリン酸化（活性化）が、精巣上体脂肪組織において MPI とβ-CG 群では Casein 群よりも有意に増加していた。またインスリン受容体（IR）のリン酸化が Casein 群に比べてβ-CG 群では有意に増加していた。肝臓と骨格筋では Akt と IR のリン酸化レベルの群間の変化は観察されなかった。

【考察】これらの結果より、MPI がカゼインに比べて全身のインスリン感受性を亢進させ血糖値上昇を抑制する作用を持つことが示唆された。また、MPI 群では脂肪組織でのインスリンシグナル伝達の活性化がこの作用に寄与していると考えられた。

MPI, type 2 diabetes, insulin sensitivity

講演番号：3F37p14
講演日時、会場：3 月 28 日 16:43～ F 校舎 37 会場

シナモン熱水抽出物による 2 型糖尿病改善効果とそのメカニズム

Amelioration of type 2 diabetes by cinnamon extract.

○小林 克也[1]、沈 燕[1]、陳 静セン[1]、本間 貴大[1]、山口 夏澄[1]、細野 崇[1]、五十嵐 喜治[2]、関 泰一郎[1] ([1]日本大院生資科、[2]山形大・農)

○ Katsuya KOBAYASHI[1], Yan SHEN[1], Jingxuan CHEN[1], Takahiro HONMA[1], Kasumi YAMAGUCHI[1], Takashi HOSONO[1], Kiharu IGARASHI[2], Taiichiro SEKI[1] ([1]Nihon Univ. Grad. School, [2]Yamagata Univ. Fac. Agric.)

［目的］演者らは、１型糖尿病モデルラットにシナモン熱水抽出物(CE)を投与すると、顕著な糖尿病改善効果を示すこと（１)、またその作用メカニズムについて培養細胞を用いて検討してきた（２)。しかし､CE の 2 型糖尿病に対する効果とそのメカニズムは十分に明らかにされていない｡本研究では、２型糖尿病モデルマウスを用いて CE の糖尿病改善効果について検討するとともに、詳細な作用メカニズムを明らかにしようとした。

［方法］2 型糖尿病モデルマウス(KK-Ay/TaJcl, 5 週齢、雄性)に CE(100 mg/kg b.w./day)をショートニングに混合して投与する群、ショートニングのみを投与する対象群を設定し、8 週間飼育した。CE 投与開始 6 週間後に経口糖負荷試験(OGTT)とインスリン負荷試験(ITT)を実施し、CE の投与が 2 型糖尿病モデルマウスの耐糖能やインスリン抵抗性に及ぼす影響について検討した。さらに、実験終了時に回収した肝臓について ProteinLynx を用いたプロテオーム解析を実施した。

［結果]CE の投与により空腹時血糖値は有意に低下した｡CE 投与開始６週間後に実施した OGTT では、糖負荷 30 分後の血糖値は対照群と比較して CE 投与群において有意に減少した。一方、ITT においては、対照群と CE 群で差はなかった。肝臓のプロテオーム解析の結果、対照群 KK-Ay と比較して CE 投与 KK-Ay では、糖新生の律速酵素である Fructose 1,6 bisphosphatase をはじめとした糖新生関連酵素、解糖系の律速酵素 Pyruvate kinase の発現量が低下していた。

［結語］KK-Ay マウスの高血糖の原因がインスリン抵抗性に起因する糖新生の亢進による可能性が明らかになった。CE の投与により糖新生の亢進が抑制され耐糖能異常が改善することが推測された。

1)Biosci Biotechnol Biochem. 2010; 74(12):2418-25
2)PLoS One. 2014 Feb 14; 9(2):e87894.

type 2 diabetes, cinnamon, proteome

講演番号：3F37p15
講演日時、会場：3 月 28 日 16:54～ F 校舎 37 会場

ブルーベリー葉抽出物によるインスリン抵抗性改善作用

Improvement of insulin resistant by the dietary blue berry leaf extract

○松山 勇介[1]、早瀬川 倫太郎[1]、濱田 健作[1]、甲斐 孝憲[2]、亀長 浩蔵[2]、松浦 靖[3]、柚木崎 千鶴子[3]、西山 和夫[1]、山崎 正夫[1] ([1]宮崎大農、[2]（株）なな葉コーポレーション、[3]宮崎県食品開発センター)
○ Yusuke Matsuyama[1], Rintrou Hayasegawa[1], Kensaku Hamada[1], Takanori Kai[2], Kouzou Kamenaga[2], Yasushi Matsuura[3], Chizuko Yukizaki[3], Kazuo Nishiyama[1], Masao Yamasaki[1] ([1]Miyazaki Univ., [2]Nanaha Co. ,Ltd, [3]Miyazaki prefecture foods development center)

【目的】
エネルギーの過剰摂取、運動不足によるエネルギー消費の減少を原因とした肥満を伴う高血圧、高脂血症、糖尿病といった生活習慣病の増加が問題となっており、食品成分によるその予防、改善が期待されている。ブルーベリー葉は宮崎県における JST 地域結集型共同研究事業の成果として脂肪肝抑制、血圧降下作用が報告され、抗生活習慣病作用を有する新規な機能性食材として期待されている。一方で糖代謝への影響は不明であり、本研究では C57BL/6 マウスに高脂肪・高ショ糖食を与えたマウスを用いてブルーベリー葉の糖代謝に与える影響について検討した。
【方法】
ブルーベリー葉から熱水抽出を行い、スプレードライによる乾燥をした抽出物を実験サンプルとした（BLEx)。実験動物として C57BL/6 マウスを 2 群に分け、それぞれ通常食と 30％ 高脂肪、20％ 高ショ糖食を 4 週間給餌した。その後、高脂肪、高ショ糖食には 0、1、3 %の BLEx を混ぜた餌を給餌した。6 週間飼育後に経口グルコース負荷試験を実施し、その 2 週間後に屠殺を行い、血清、各臓器を解析に供した。通常食群では通常食の給餌を 8 週間継続させた。
【結果・考察】
摂食量および飲水量に食餌の影響はなかったが、BLEx 0 %群と比較して体重は BLEx 3 %群において減少傾向が認められた。さらに精巣上体脂肪組織、腎臓周囲脂肪組織重量も BLEx 3 %群において減少傾向が認められ、肝臓重量は有意に減少した。また、空腹時血糖値は BLEx 0 %群と比較し、BLEx 3 %群において有意な減少が認められ、空腹時インスリン値も減少傾向が認められた。さらに、グルコース経口負荷後 0 、60 、120 分後においても血糖値の有意な減少が認められた。以上の結果から BLEx はインスリン抵抗性を改善し、抗糖尿病作用を有する食品成分としての有用性が期待された。

blueberry leaf extract, insulin resistance, diabetes

講演番号：3F37p16
講演日時、会場：3 月 28 日 17:15～ F 校舎 37 会場

小麦タンパク質加水分解物による GLP-1 分泌促進機構の解明

Mechanism of GLP-1 secretion by wheat protein hydrolysate

○加藤 正樹、中西 健悟、谷 翼、津田 孝範（中部大応生）
○MASAKI KATO, Takenori Nakanishi, Tsubasa Tani, Takanori Tsuda (Chubu Univ.)

【目的】

Glucagon-like peptide-1 (GLP-1)は腸管内分泌細胞（L 細胞）から分泌され、血中グルコース濃度に依存してインスリン分泌を促す消化管ホルモンである。演者らはこれまでにクルクミンをはじめとする食品由来因子の GLP-1 分泌促進作用を明らかにした [1-3]。さらに GLP-1 の分泌を促進する食品由来因子として小麦タンパク質加水分解物を見出している。本研究では、小麦タンパク質加水分解物の GLP-1 分泌促進機構と動物個体での作用立証を目的とした。

【方法】

マウス大腸由来の GLP-1 産生細胞株を定法に従い培養した後、小麦タンパク質加水分解物または種々の阻害剤を投与し、培地中へ分泌される Total GLP-1 濃度を ELISA により測定した。雄性 Sprague-Dawley ラット（8 週齢）に 0.9%NaCl または小麦タンパク質加水分解物を経口投与し、腹腔内グルコース負荷試験（IPGTT）を行った。

【結果】

小麦タンパク質加水分解物の各種画分の中で、低分子画分の投与は GLP-1 分泌を有意に促進した。さらに、その促進には細胞内カルシウム濃度の上昇に関わる複数の経路が関与することが示唆された。動物個体での検討では、小麦タンパク質加水分解物の投与は腹腔内グルコース負荷後の血糖値上昇を有意に抑制した。現在、血糖値上昇抑制に GLP-1 が関与するか検討を進めている。

1) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 435: 165-70, (2013).
2) 日本農芸化学会 2014 年度大会講演要旨集（2014）
3) *Food Funct.* 5: 2309-16, (2014).

Glucagon-like peptide-1, diabetes, wheat protein hydrolysate

講演番号：3F37p17
講演日時、会場：3 月 28 日 17:26～ F 校舎 37 会場

アントシアニンによる GLP-1 分泌促進作用とその分泌経路の解明
Stimulation of glucagon-like peptide-1 secretion and identification of its secretory pathway by anthocyanins
○谷 翼、加藤 正樹、津田 孝範（中部大応生）
○Tsubasa Tani, Masaki Kato, Takanori Tsuda (Chubu Univ.)

[目的]

Glucagon-like peptide-1（GLP-1）は、食事摂取に伴い消化管から分泌され、膵β細胞に作用してグルコース濃度に依存してインスリン分泌を促すペプチド性の消化管ホルモンの一つである。これまでに当研究室では、クルクミンをはじめとする食品由来因子の GLP-1 分泌促進作用を明らかにしている [1-3]。本研究では、当研究室を中心に報告のあるアントシアニンの糖尿病予防・抑制作用に関わるメカニズムを、GLP-1 分泌促進作用の点から検討することを目的とした。

[方法]

マウス大腸由来の GLP-1 産生細胞株を定法に従い培養した後、各種アントシアニンを投与し、GLP-1 の分泌能を測定した。分泌を強く誘導したアントシアニン（Delphinidin 3-rutinoside; D3R）の GLP-1 分泌促進経路を検討した。

雄性 2 型糖尿病モデルマウス（KK-A^y 5 週齢）を 2 群に分け、コントロール食あるいは D3R を豊富に含む試料 Blackcurrant polyphenol extract；BPE 食を摂食させた。飼育期間中の随時血糖値を測定し、飼育開始 5 週目に経口糖負荷試験を行い、7 週目に屠殺し血漿、組織を得た。さらに C57BL/6J マウス（9 週齢）に BPE を経口投与後、腹腔内グルコース負荷試験を実施した。

[結果]

アントシアニンの異なる分子種での GLP-1 分泌促進作用の比較から、アントシアニンの GLP-1 分泌促進作用には、少なくとも B 環に 3 つのヒドロキシ基または 2 つのメトキシ基が必要であった。D3R の GLP-1 の分泌促進作用には細胞内カルシウム濃度の上昇に関わる経路が関与することが示唆された。KK-A^y マウスにおいて、D3R 食の摂取は飼育期間中の血糖値上昇を有意に抑制し、耐糖能を改善した。さらに門脈血中の Total GLP-1 濃度はコントロール群に比べ BPE 群で有意に増加した。C57BL/6J マウスへの D3R を豊富に含む試料の前投与は、腹腔内に投与されたグルコースによる血中濃度上昇を有意に抑制した。現在、これらの効果が GLP-1 の分泌促進作用から説明できるかに関する詳細な検討を行っている。

1) *Biochem. Biophys. Res. Commun.,* 435, 165-170, (2013).
2) 日本農芸化学会 2014 年度大会講演要旨集（2014）
3) *Food Funct.* 5: 2309-16, (2014).

glucagon-like peptide-1, diabetes, anthocyanin

講演番号：3F37p18
講演日時、会場：3 月 28 日 17:37～ F 校舎 37 会場

人参サポニン代謝物 M1 による GLP-1 分泌促進の作用機序解析

The mechanism of action of M1 that promotes GLP-1 secretion

○野渕 翠、下条 洋輔、宮崎 寿次（長瀬産業(株)）
○Midori NOBUCHI, Yosuke SHIMOJO, Toshitsugu MIYAZAKI (NAGASE & Co., Ltd)

【背景・目的】オタネニンジン(*Panax ginseng* C.A.Meyer）は高麗人参とも呼ばれ、古くより漢方や健康食品に利用されてきた。オタネニンジンの代表成分である人参サポニンには血糖降下作用をはじめとする多くの生理作用が報告されている。また、人参サポニン Rb1 は腸内細菌によって M1 (compound K)に代謝された後、血中へ取り込まれることが知られている。この代謝能には個人差があることから、我々は乳酸菌発酵によりこの人参サポニンを予め M1 に変換させた食品素材「発酵オタネニンジン」を開発した。この発酵オタネニンジンには血糖値上昇抑制効果が認められたため、インクレチンの一種である GLP-1 に着目し研究した結果、未発酵のオタネニンジンよりも高い GLP-1 分泌促進効果を示し、関与成分として M1 が重要であることを報告してきた*。本研究では M1 による GLP-1 分泌促進の作用機序を解明するため、GLP-1 産生に関与することが報告されている細胞内カルシウムや MAPK、PPARβ/δシグナルに対して M1 が及ぼす影響を検討した。
【方法】ヒト腸管由来 NCI-H716 細胞をマトリゲル上に播種し、高グルコース DMEM 培地で 2 日間培養した後に試験に使用した。
【結果・考察】はじめに、Fluo-4 アッセイにて細胞内カルシウム濃度変化を測定した結果、M1 は濃度依存的に細胞内カルシウム濃度を上昇させた。細胞内カルシウム濃度変化に伴い MAPK パスウェイの活性化が起こると予想されたため、次にウェスタンブロットにて MAPK タンパク質のリン酸化について検討したところ､M1 が ERK1/2 および p38 MAPK のリン酸化を誘導することが示された。また、ELISA 法で培養上清中の GLP-1 分泌量を測定した結果、ERK1/2 のリン酸化阻害剤である U0126 が M1 による GLP-1 分泌促進効果を減少させることが確認された。これらの結果より、M1 は MAPK パスウェイ、特に ERK1/2 の活性化を介して GLP-1 産生を調節することが示唆された。一方、PPARβ/δの活性化も GLP-1 産生に関与するとの報告があるため、M1 による影響をルシフェラーゼアッセイで調べたところ、M1 は PPARβ/δの転写活性を増加させる傾向があった。また、PPARβ/δのアンタゴニストである GSK0660 は M1 による GLP-1 分泌促進効果を部分的に阻害することが確認されたことから、M1 による GLP-1 産生促進には PPARβ/δも関与する可能性が示唆された。さらに詳細な作用機序は現在、検討中である。
*: 第 68 回日本栄養・食糧学会大会　講演要旨集 p. 309

GLP-1, M1, MAPK

講演番号：3F37p19
講演日時、会場：3 月 28 日 17:48～ F 校舎 37 会場

グァバ葉熱水抽出物が DPP-4 欠損ラットおよび 2 型糖尿病患者の血中 GLP-1 濃度に及ぼす影響
The influence of guava leaf extract on the blood GLP-1 levels in DPP-4-deficient rats and type 2 diabetic patients

牧野 久美子[1]、○吉田 康人[1]、神野志 ゆう[1]、中平 育恵[2]、鈴木 淳[3]、郷内 めぐみ[2]、倉崎 康太郎[2]、浜野 久美子[2]、長南 治[1]、宮崎 幸司[1] ([1]ヤクルト中研、[2]関東労災病院　糖尿病・内分泌内科、[3]横浜市立大大学附属市民総合医療センター　内分泌・糖尿病内科)
Kumiko Makino[1], ○Yasuto Yoshida[1], Yu Kounoshi[1], Ikue Nakadaira[2], Jun Suzuki[3], Megumi Gonai[2], Kotaro Kurasaki[2], Kumiko Hamano[2], Osamu Chonan[1], Kouji Miyazaki[1] ([1]Yakult Central Institute, [2]Department of Diabetes and Endocrine Internal Medicine, Kanto Rosai Hospital, [3]Department of Endocrinology and Diabetes, Yokohama City University Medical Center)

【目的】グァバ葉熱水抽出物（GTEx）は食後血糖上昇抑制作用を有する食品素材である。一方、α-グルコシダーゼ阻害薬(GI)は､糖吸収を遅延させるとともに小腸下部からの glucagon like peptide-1（GLP-1）分泌を増加させることで、GLP-1 分解酵素 dipeptidyl peptidase-4（DPP-4）阻害薬と相乗効果を示すことが報告されている[1]。GTEx は GI と類似した作用機序を有することから、DPP-4 阻害薬と食薬相互作用を示す可能性が危惧された。そこで今回、GLP-1 分泌に及ぼす影響をラットとヒトで評価した。
【試験方法】試験 1: 先天的に DPP-4 を欠損した F344/DuCrlCrlj ラット（雄性、5 週齢）を対照群、GI 群、GTEx 群の 3 群に分け、AIN93G 準処飼料を自由摂取させた。GTEx 群には 0.2%（w/v）GTEx 水溶液を飲水投与し、GI 群には Voglibose を 0.0001%（w/w）混餌投与した。投与 6 週目に非絶食下で腹部大動脈より採血し､随時血糖値､血中のインスリンおよび活性型 GLP-1 濃度を測定した｡試験 2: DPP4 阻害薬を 3 か月以上内服中の 2 型糖尿病患者 20 名を対象に、規定食負荷時の GTEx 含有茶飲料摂取の有無が食後血糖値、血中のインスリンおよび活性型 GLP-1 濃度の変動に及ぼす影響をクロスオーバー法で検証した。
【試験結果】試験 1: 対照群に比べて GI 群と GTEx 群では随時血糖値が有意に低値であった。活性型 GLP-1 の血中濃度は、GI 群で有意に高値であったが、GTEx 群では変化がみられなかった。また、GI 群でのみ軟便や盲腸の肥大を呈する個体が見受けられた。試験 2: GTEx 含有茶飲料の摂取は、規定食負荷後の血糖値、インスリンおよび活性型 GLP-1 濃度の推移に影響を及ぼさなかった。さらに、他の臨床所見において有害事象は観察されなかった。
【結論】GI とは異なり GTEx には GLP-1 分泌促進作用がないものと考えられた。また、DPP-4 阻害薬との食薬相互作用の観点からも、GTEx は安全な食品素材であることが示された。
[1] J. Pharmacol Sci., 104, 29-38, 2007

guava leaf extract, glucagon like peptide-1, dipeptidyl peptidase-4

講演番号：3F37p20
講演日時、会場：3 月 28 日 17:59～ F 校舎 37 会場

オリゴ糖の組み合わせがビフィズス菌の増殖に与える影響の検討

Effect of combined usage of prebiotic oligosaccharides on the growth of bifidobacteria

○江原 達弥、津田 宗哉、和泉 裕久、中里 友紀、岩本 洋、難波 和美、武田 安弘 (森永乳業（株）栄養科学研究所)
○Tatsuya EHARA, Muneya TSUDA, Hirohisa IZUMI, Yuki NAKAZATO, Hiroshi IWAMOTO, Kazuyoshi NAMBA, Yasuhiro TAKEDA (Morinaga Milk Industry Co., Ltd.)

【背景】健常なヒト乳児の腸内菌叢はビフィズス菌が圧倒的に優勢であり、乳児の感染症やアレルギー発症のリスク低減に貢献していると考えられている。人工栄養児は一般的に母乳栄養児と比較して腸内菌叢におけるビフィズス菌占有率が低いことが知られており、人工栄養児に母乳栄養児と同等のビフィズス菌優勢の腸内菌叢を形成させることは、乳児用調製粉乳の開発において重要な課題の一つである。この点に配慮し、乳児用調製粉乳には難消化性オリゴ糖などのプレバイオティクスが配合されている。オリゴ糖はその種類によりビフィズス菌の代謝様式、資化性が異なると考えられることから、複数種のオリゴ糖を組み合わせて使用することにより相加的、相乗的なビフィズス菌増殖効果が期待される。【目的】オリゴ糖の組み合わせがビフィズス菌増殖作用に与える影響を検討し、人工栄養児の腸内菌叢改善効果が期待されるオリゴ糖の組み合わせを探索した。【方法】ヒト乳児の腸内環境を模した *in vitro* の培養系を用いた試験により、オリゴ糖（ラクチュロース、ラフィノース、ガラクトオリゴ糖)の組み合わせが乳児腸管内に生育するビフィズス菌である *Bifidobacterium breve* 及び *Bifidobacterium longum* の増殖に与える影響を検討した。また、これらのオリゴ糖からいくつかの組み合わせを選択して乳仔マウスに *Bifidobacterium breve* と共に投与し、培養試験の結果が生体内で再現されるか検討した。【結果と考察】培養試験の結果、オリゴ糖の総量が等しい場合であっても、3 種類（ラクチュロース、ラフィノース、ガラクトオリゴ糖）を組み合わせたものは各オリゴ糖単独あるいは 2 種類を組み合わせたものと比較して *Bifidobacterium breve* 及び *Bifidobacterium longum* 双方に対する高い増殖作用を示した。乳仔マウスへの投与試験においても、3 種類のオリゴ糖の組み合わせは高い *Bifidobacterium breve* 増殖作用を示し、培養試験の成績が再現された。以上より、本 *in vitro* 試験がオリゴ糖のビフィズス菌増殖作用の迅速な評価系として有用であること、また 3 種オリゴ糖を組み合わせることで幅広いビフィズス菌種に対して増殖促進が期待され、人工栄養児の腸内菌叢改善に繋がることが示唆された。

bifidobacteria, oligosaccharide, infant formula

講演番号：3F45a01
講演日時、会場：3 月 28 日 09:00～ F 校舎 45 会場

鶏足由来ヒアルロン酸産生促進物質(HA-II)の開発

Hyaluronic acid inducer from chicken leg

○渡部 和哉、安 芝英、原田 清佑、青笹 正義、吉國 義明、金 武祚（（株）ファーマフーズ)
○Kazuya WATABE, Jiyeong AN, Seiyu HARADA, Masayoshi AOSASA, Yoshiaki YOSHIKUNI, Mujo KIM (PHARMA FOODS INTERNATIONAL CO., LTD.)

【目的】 わが国の変形性膝関節症の患者は 700 万人以上であり、老後の QOL を悪化させる大きな要因の一つとなっている。そのため、膝関節疾患の予防と改善は重要な課題であるが、発症時には膝関節へのヒアルロン酸(HA)注入や抗炎症剤、鎮痛剤等の対症療法しかないのが現状である。そのため食品によって日常的な膝関節疾患の予防や改善を行うことが必要である。そのような観点から、我々は軟骨細胞の活性化や HA 産生を促進する活性物質の探索を行ったところ、鶏足抽出物の分解物に、顕著な HA 産生促進活性を見出したので報告する。

【方法】 軟骨前駆細胞株（ATDC5）を培養プレートに播種後、各試料を添加し、48 時間後に産生された培養液中の HA 量を測定した。軟骨細胞の軟骨基質産生能は、分化した ATDC5 が産生する酸性ムコ多糖を Alcian blue で染色することにより確認した。また、HA 合成酵素(HAS2)遺伝子の発現量は、ATDC5 に試料を添加して培養後、total RNA を抽出してリアルタイム定量 PCR 法によって測定した。

【結果及び考察】 鶏冠抽出物、鶏足抽出物、ブタ軟骨抽出物及びサケ軟骨抽出物の各分解物を ATDC5 に添加したところ、鶏足抽出物の分解物である HA 産生促進物質（HA-Ⅱ）に有意（$p<0.05$）な HA 産生活性を有することを見出した。また、Alcian blue 染色試験の結果から、HA-Ⅱによって細胞外に分泌された軟骨基質（酸性ムコ多糖）が増加することも確認した。更に HA-Ⅱを ATDC5 に添加後、HAS2 遺伝子の発現量を測定したところ、コントロール群に比べて有意（$p<0.05$）に上昇していることが明らかになった。以上の結果から、HA-Ⅱは、軟骨細胞中の HAS2 の発現を上昇することで HA の生合成を亢進させ、細胞外へ HA の分泌を促進することが示唆された。現在、活性物質の単離、同定を実施し、今後ヒトでの臨床試験を行う予定である。

Hyaluronic acid, Joint cartilage, Chicken leg extract

講演番号：3F45a02
講演日時、会場：3 月 28 日 09:11～ F 校舎 45 会場

鶏足由来ヒアルロン酸産生促進物質（HA-II）の膝軟骨に及ぼす効果

Effects of chicken leg's hyaluronic acid inducer (HA-II) on a joint cartilage

○丸 勇史、安 芝英、原田 清佑、渡部 和哉、青笹 正義、吉國 義明、金 武祚（（株）ファーマフーズ)
○Isafumi MARU, Jiyeong AN, Seiyu HARADA, Kazuya WATABE, Masayoshi AOSASA, Yoshiaki YOSHIKUNI, Mujo KIM (Pharma Foods International Co., Ltd.)

【目的】　我々は、膝関節疾患の予防及び改善食品を開発することを目的に、ヒアルロン酸(HA)産生促進物質を探索したところ、*in vitro* 試験において鶏足由来 HA 産生促進物質（HA-Ⅱ）を見出した。この HA-Ⅱは、顕著な HA 産生促進活性及び HA 合成酵素(HAS2)遺伝子の発現亢進効果を示した。本研究では、HA-Ⅱの *in vivo* における有効性を明らかにすることを目的に、膝軟骨欠損ウサギを用いて、本物質の膝軟骨修復効果を検討したので報告する。

【方法】　22 週齢雄のウサギ（Slc ： JW）の右左大腿骨関節溝軟骨部に、直径 2 mm、深さ 4 mm の骨孔を作製（2 群、各 n=8）した後、縫合した。損傷手術翌日から胃ゾンデにより、50 mg/日の HA-Ⅱ水溶液または水（コントロール）を 3 週間投与した。投与後、大腿骨摘出時に欠損部位の肉眼観察を行い、修復スコアを測定した。欠損部位の修復度を明らかにするため、欠損部位の組織標本を作製し、Hematoxylin-Eosin 染色、Alcian Blue 染色及び Safranin O 染色後、欠損部の染色面積を測定した。得られた染色部位の面積は、それぞれパラメトリックの Dunnett 検定により統計処理を行った。

【結果及び考察】　3 週間の投与試験後、大腿骨を摘出し肉眼観察において欠損部の修復度をスコア化した。その結果、コントロール群に比べて HA-Ⅱ投与群は有意に修復（$p<0.05$）しており、良好な治癒効果を示した。更に修復度を詳細に測定するため、組織標本の Alcian Blue 染色を行ったところ、HA 投与群において有意な染色面積の増加（$p<0.05$）が認められた。また、Safranin　O 染色の測定においても、コントロール群に比べて高値を示した。以上の結果、HA-Ⅱは、顕著な膝軟骨修復効果を有することが明らかとなった。HA-Ⅱは、細胞試験において HA 産生促進作用を示し、当該動物試験においても軟骨再製促進作用を有することが示されたことから、HA-Ⅱは膝関節疾患の予防や改善用食品としての用途が期待できる。

hyaluronic acid, cartilage, chicken leg extract

講演番号：3F45a03
講演日時、会場：3 月 28 日 09:22～ F 校舎 45 会場

低濃度のアルコール摂取による変形性関節症予防効果

The effect of low-dose alcohol on osteoarthritis and its mechanism

○柴田 紗知[1]、味八木 茂[2]、石飛 博之[2]、萱島 知子[3]、伊豆 英恵[4]、藤井 力[4]、松原 主典[1]([1]広島大院教育、[2]広島大病院、[3]佐賀大文化教育、[4]酒総研(独))
○Sachi SHIBATA[1], Shigeru MIYAKI[2], Hiroyuki ISHITOBI[2], Tomoko KAYASHIMA[3], Hanae IZU[4], Tsutomu FUJII[4], Kiminori MATSUBARA[1] ([1]Hiroshima Univ., [2]Hiroshima Univ. Hosp, [3]Saga Univ., [4]NRIB)

【目的】多量のアルコール（エタノール）摂取はガン、肝臓障害や依存症などの問題を生じさせる。しかしながら、少量～適量のアルコール摂取は心臓病等の疾病リスクを低下させることが多くの疫学研究で明らかになっている（J カーブ効果)。我々は変形性関節症(osteoarthritis：OA)予防効果を持つ食品機能成分の探索とその作用機構の解明に取り組んでいる。OA は高齢者に多く発症し、高齢者の QOL 低下や運動不足による活動低下、更には脳機能低下とも関連していることが知られており、その予防は極めて重要である。複数の疫学研究により、飲酒習慣が OA の進行を抑制する可能性が示唆されている。そこで、低濃度アルコール摂取の OA 予防効果について検討を進めている。
【方法】老化促進モデルマウス SAMP8 系（11 週齢）に飲料水として脱イオン水に 1 もしくは 2％(v/v)エタノールを加え自由摂取させた。15 週間投与後、膝を回収し組織化学染色による病理評価を行った。また、C57BL/6J マウスの大腿骨から単離した初代培養軟骨細胞を用いて、 OA 発症に関わるサイトカイン IL-1β処理に対するエタノールの効果について、コラーゲン・プロテオグリカン・炎症サイトカイン（IL-6)・細胞外マトリックス分解酵素（MMPs)・アグリカン分解酵素 ADAMTS-5 の遺伝子発現への影響を定量 RT-PCR 法で検討した。さらに、初代培養軟骨細胞をエタノールで一定時間処理した後、タンパク質を抽出し、オートファジーの指標タンパク質である LC3 に対する特異的抗体を用いたウエスタンブロット法で検討した。膝や軟骨細胞に対する影響に加え、OA の発症・進行にも関わる筋力についても、握力測定やトレッドミルによる検討を行った。
【結果】SAMP8 の膝関節の状態については、対照群では OA を発症したマウスが見られたが、エタノール投与群では明確に OA を発症しているマウスは見られなかった。また、初代培養軟骨細胞の実験では、OA 発症に重要な役割を果たす細胞外マトリックス分解酵素 MMP13 等の OA 発症関連遺伝子の発現が低濃度のエタノールで抑制されることが分かった。また、ウエスタンブロット法において、LC3-II タンパク質量が増加したことから、オートファジーが誘導されることが示された。以上のことから、エタノールは経口摂取によって OA 予防効果が期待でき、その作用機構として OA 発症関連分子の発現抑制やオートファジー誘導作用が関連していることが示唆された。運動機能試験は、長期間低濃度のエタノール投与実験を行っている SAMP8 で検討したところ、対照群とエタノール投与群の差が認められた。

alcohol, osteoarthritis, senescence accelerated mouse

講演番号：3F45a04
講演日時、会場：3 月 28 日 09:33～ F 校舎 45 会場

含硫化合物の sulforaphane, sulforaphene 及び erucin は破骨細胞融合因子の発現抑制を介して破骨細胞分化を調節する

Sulforaphane, sulforaphene and erucin, sulfur containing compounds, regulate osteoclast differentiation by suppressing mRNA expression of cell-cell fusion molecules associated to osteoclast differentiation

○高木 智弘、井上 博文、高橋 信之、上原 万里子（東農大院）
○Tomohiro TAKAGI, Hirofumi INOUE, Nobuyuki TAKAHASHI, Mariko UEHARA (Tokyo Univ.of Agric.)

【目的】近年、我が国がでは急速な高齢化から骨粗鬆症罹患率の増加が問題となっており、その予防が重要課題となっている。骨は破骨細胞による骨吸収(古い骨を溶解)と骨芽細胞による骨形成(新しい骨を形成)をくり返しており、このバランスが破綻する事で骨脆弱化が引き起こされる。これまでの研究から抗炎症作用を示す食品成分は骨代謝改善効果を示す事が報告されている。しかしながら、抗炎症作用を有する食品成分の中で、含硫化合物である isothiocyanate 類(ITC)による骨代謝制御に関する詳細な作用機序は未だ明らかになっていない。そこで本研究では、ITC の一種である sulforaphane(SFA)、sulforaphene(SFE)及び erucin(ERN)が破骨細胞と骨芽細胞における骨代謝関連遺伝子発現に及ぼす影響について明らかにする事を目的とした。
【方法】5 週齢雄性 ddY マウス大腿骨と脛骨から採取した骨髄細胞を用いた。まず始めに SFA、SFE 及び ERN(0-3μM)をそれぞれ処理し、WST-8 法による細胞生存率の測定を行った。次に活性型ビタミン D_3(10^{-8}M)による多核破骨細胞分化誘導を行い、SFA、SFE 及び ERN の破骨細胞に対する作用を破骨細胞分化マーカーである酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ(tartrate-resistant acid phosphatase: TRAP)染色法により評価した。続いて、Osteoblast-Inducer Reagent を用い、骨芽細胞へ分化誘導後、アリザリンレッド染色法にて骨形成能を評価した。また各々に分化誘導後、total RNA 抽出を行い、real-time PCR 法にて破骨細胞分化/成熟に必要な分子(c-Fos, NFATc1, DC-STAMP, TRAP, cathepsin K)と骨芽細胞分化に必須な分子 (Runx2, osterix, ALP)の遺伝子発現変動を解析した。
【結果】細胞生存率は低濃度(SFA:～1μM, SFE:～0.5μM, ERN:～1μM)では影響を示さず、高濃度で有意に減少した。続いて破骨細胞への影響を解析した結果、破骨細胞形成率は低濃度(SFA:0.1μM, SFE:0.1μM, ERN:0.5μM)から減少を示した。また上記の遺伝子発現変動を解析した結果、c-Fos 以外の破骨細胞関連分子である NFATc1, DC-STAMP, TRAP, cathepsin K は無処理に対して有意に抑制された。骨芽細胞分化については、破骨細胞分化抑制作用を示した濃度ではアリザリンレッド染色及び遺伝子発現に影響を示さなかった。
【結論】SFA、SFE 及び ERN は細胞毒性と骨芽細胞分化に影響のない濃度で破骨細胞分化のみを抑制する事を明らかにした。その作用機構については、従来の破骨細胞分化因子(NFATc1,TRAP, cathepsin K)に加え、破骨細胞融合因子である DC-STAMP の抑制を介し、破骨細胞分化を制御する事が示唆された。現在、SFA、SFE 及び ERN 処理による網羅的遺伝子発現変動を DNA マイクロアレイ法にて解析中である。

Sulforaphane, Isothiocyanate, osteoclast-associated molecules

講演番号：3F45a05
講演日時、会場：3 月 28 日 09:44～ F 校舎 45 会場

Equol 鏡像異性体の有効性と安全性: *in vivo* と *in vitro* 評価系の差異
Risk-benefit analysis of equol enantiomers: Differences between *in vivo* and *in vitro* evaluations

○藤井 駿吾[1]、井上 博文[1]、高橋 信之[1]、上野 友美[2]、内山 成人[2]、上原 万里子[1] ([1]東農大院・農・食品栄養、[2]大塚製薬(株)・佐賀栄養製品研)
○ Shungo FUJII[1], Hirofumi INOUE[1], Nobuyuki TAKAHASHI[1], Tomomi UENO[2], Shigeto UCHIYAMA[2], Mariko UEHARA[1] ([1]Dept. of Food Nutr. Sci., Graduate School, Tokyo Univ. of Agric., [2]Saga Nutraceuticals Res. Institute. Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.)

【目的】超高齢社会を迎えたわが国では、骨粗鬆症が社会問題となっている。特にエストロゲン欠乏に起因する閉経後骨粗鬆症に対しては、ホルモン補充療法などが用いられるが、子宮がんなどのリスクを増大させる可能性が報告されていることからも、食品による予防や改善が期待されている。大豆イソフラボンである daidzein 代謝産物 equol はエストロゲンと構造が類似しており、骨代謝改善効果が報告されている。また equol には二種類の鏡像異性体(*S*)体と(*R*)体が存在し、その構造の違いと骨代謝に関する報告は少ない。これまでに我々は、生体での骨量減少抑制効果は(*S*)体の方が強いことを見出しているが、単一濃度のみでの検討であり、用量による詳細な影響や作用機序についての検討を行っていない。そこで本研究において、実験 1 では両異性体 equol の投与量を変化させ、閉経後骨粗鬆症に対する骨量減少抑制効果の差異について明らかにすることを目的とし、*in vivo* 試験にて解析を行った。実験 2 では両異性体 equol の破骨細胞分化に対する直接的な影響を明らかにするため、*in vitro* 試験を行った。【方法】実験 1：8 週齢の ddY 系雌性マウスに偽手術(Sham)または卵巣摘出術(OVX)を施した。投与量による影響を検討するため、OVX を施したマウスはさらに OVX 単独に加え(*S*), (*R*)体をそれぞれ 0.25～2mg/day 投与した 8 群に分け、計 10 群で 4 週間の飼育観察を行い、大腿骨骨密度およびリスク指標の一つである子宮重量を測定した。実験 2：マウス大腿骨および脛骨から採取した骨髄細胞を用い、まず初めに両異性体 equol(0.1～50 μM)で処理し、WST-8 法による細胞生存率を測定した。続いて、活性型ビタミン D_3 による破骨細胞分化誘導を行い、各 equol の破骨細胞分化に対する影響について破骨細胞分化マーカーである tartrate-resistance acid phosphatase を染色することにより破骨細胞形成率を、また、破骨細胞分化関連遺伝子の発現を real time PCR 法にて解析した。【結果】実験 1 において、大腿骨骨密度は Sham 群に対して OVX 群で有意に減少し、その減少は(*S*)体でのみ抑制された。子宮重量は OVX 群に対して(*S*)体、(*R*)体ともに濃度依存的に子宮重量の増加傾向がみられたが、(*S*)体の方が(*R*)体よりも低濃度から有意に子宮重量が増加した。しかし、最も高値を示した 2mg/day の濃度でも Sham 群に対して、明らかに低値であった。実験 2 において、(*S*)体、(*R*)体ともに細胞生存率に影響を与えない濃度で破骨細胞分化を抑制したが、その抑制率は(*S*)体に対して (*R*)体の方が低濃度で有意に抑制した。【結論】生体での骨量減少抑制効果は(*R*)体に対して(*S*)体の方が強く、*in vitro* 試験では逆の結果を示した。今後この差異を明らかにすることが必要である。現在、骨代謝関連遺伝子および血中 equol 濃度について解析中である。

equol, enantiomer, osteoporosis

講演番号：3F45a06
講演日時、会場：3 月 28 日 10:05～ F 校舎 45 会場

植物発酵エキス「OM-X」の筋持久力向上作用の検討

A study on the effect of fermented vegetable extract (OM-X) on enhancing muscular endurance

○三宅 康賀[1]、伊藤 智広[2]、塚口 祥太[2]、山口 剛幸[2]、御手洗 玲奈[2]、榎本 みゆき[2]、延生 聖也[2]、下宮 淑恵[1]、中村 由貴[1]、安藤 正史[2]、塚正 泰之[2]、高畑 宗明[1] ([1]バイオバンク、[2]近大農)
○Yasuyoshi Miyake[1], Tomohiro Itoh[2], Syota Tsukaguchi[2], Takayuki Yamaguchi[2], Rena Mitarai[2], Miyuki Enomoto[2], Seiya Ensyo[2], Yoshie Shimomiya[1], Yuki Nakamura[1], Masashi Ando[2], Yasuyuki Tsukamasa[2], Muneaki Takahata[1] ([1]Biobank, [2]Kinki Univ.)

【目的】我々はこれまで，野菜，果物，海藻，茸類などを乳酸菌や酵母で長期間発酵・熟成させた植物発酵エキス（OM-X）の抗酸化作用や抗アレルギー作用，抗炎症作用などの食品機能性を報告してきた。近年，イミダゾールペプチドやアスタキサンチンなど抗酸化作用を有する食品成分が，筋持久力を向上させることが報告されている。本研究では，OM-X をマウスに投与し，強制遊泳試験の遊泳時間と血液成分等の解析から，OM-X による筋持久力向上作用を評価した。
【方法】4 週齢雄性 ddY マウス 50 匹を飼育環境に 1 週間馴化させ，10 分間の水泳訓練を 3 度行い，遊泳時間および体重が一定となるよう群分けを行った。OM-X 無投与群，低濃度投与群（2.5 g/60 kg body weight/day）および高濃度投与群（5.0 g/60 kg body weight/day）に分け，滅菌水で設定濃度になるよう調製した。胃ゾンデにより 4 週間連続的に経口投与した。投与開始から試験終了 4 週目までの各週に強制遊泳試験（流速 12 L/min，水温 28℃）を行い，マウスの鼻先が水面下に 7 秒以上水没した時点までの時間を計測した。4 週目強制遊泳試験終了後，ただちにマウスをフォーレン麻酔下により屠殺後，腹部大動脈より採血し，放置後，遠心分離により血清を得た。また血清成分分析は血液検査用キットを用いて測定した。同時に，マウスの肝臓，腎臓，脾臓および腓腹筋を回収した。肝および腓腹筋中のグリコーゲン含量，肝および腎臓の 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine（8-OHdG）含量の測定を各種測定キットを用いて行った。肝臓から total RNA を調整後，オルニチン回路において作用する酵素 *Arg1* と *Cps1* の mRNA 発現量を Real time - PCR 法にて検討した。
【結果】マウスの遊泳時間は，OM-X 投与群において投与濃度依存的に有意に延長し，持久力の向上が認められた。また、マウスの血清成分を分析したところ，OM-X 投与群は OM-X 無投与群に比べて血中乳酸および TGF-β 濃度が有意に低下した。マウスの肝臓および腎臓における 8-OHdG 量を測定した結果，OM-X 投与群は無投与群より 8-OHdG 量が低い結果となった。
以上の結果から，OM-X はマウスの筋持久力を向上させる可能性が示唆された。

enhancement of muscular endurance, fermented vegetable extract, forced swim test

講演番号：3F45a07
講演日時、会場：3 月 28 日 10:16～ F 校舎 45 会場

E3 ユビキチンリガーゼに着目した筋萎縮予防効果を示すスパイス・ハーブの探索

Exploration of spices and herbs that prevent muscle atrophy via E3 ubiquitin ligase

○山下 貴仙[1]、山村 淳貴[1]、平山 善丈[3]、上野 正一[2]、南 俊哉[2]、加藤 久典[1]([1]東京大学総括プロジェクト機構食と生命、[2] ハウス食品グループ本社株式会社 中央研究所、[3] ハウスウェルネスフーズ株式会社 開発研究所)
○Takanori YAMASHITA[1], Junki YAMAMURA[1], Yoshitake HIRAYAMA[3], Seiichi UENO[2], Toshiya MINAMI[2], Hisanori KATO[1] ([1]the University of Tokyo Corporate Sponsored Research Program "Food for Life", [2]House Foods Group Inc. Central Research & Development Institute, [3]House Wellness Foods Corporation Research & Development Institute)

【背景と目的】
スパイス・ハーブは古くから抗酸化、抗炎症作用など多様な機能が知られており、近年ではその科学的な根拠も多数報告されているが、その豊富さゆえに未だ知見のない作用も大いに期待されている。一方、サルコペニアや脊椎損傷を始めとした骨格筋萎縮時にはユビキチンプロテアソーム系 (UPS) が関与していると考えられている。骨格筋萎縮時には UPS に関わる E3 ユビキチンリガーゼ F-box protein 32 (atrogin-1)およびMuscle RING-Finger protein-1 (MuRF-1)が発現亢進することが報告されている。そこで本研究では培養細胞を利用し、スパイス・ハーブの骨格筋萎縮に対する効果を評価することを目的とした。まず全 38 種のスパイス・ハーブ抽出物について、dexamethasone(Dex)誘導性の atrogin-1 および MuRF-1 の mRNA 上昇抑制効果を評価した。
【方法】
各スパイス・ハーブをメタノール抽出して乾燥させたものを用いた。ラット L6 筋管細胞を分化誘導した後、無血清 DMEM 培地で 12 時間培養後、10 nM Dex (Dex 群)またはこれに加えて各抽出物を含む DMEM 培地で 12 時間培養した後 total RNA を回収し、atrogin-1、MuRF-1 の mRNA 量を qRT-PCR で評価した。
【結果】
ローレル、クローブ、キャラウェイの抽出物それぞれ 50、200、200 μg/mL の添加により、atrogin-1 の mRNA 量は Dex 群の 13%、16%、30%となり、atrogin-1 の mRNA 上昇が有意に抑制された。またローレル(50 μg/mL)、クローブ(200 μg/mL)、セージ(10 μg/mL)、キャラウェイ(200 μg/mL)、ブラックカルダモン(50 μg/mL)、コリアンダー(200 μg/mL)、フェヌグリーク(100 μg/mL)の添加により、MuRF-1 の mRNA 量は Dex 群の 34%、43%、43%、63%、64%、65%、78%となり、MuRF-1 の mRNA 上昇が有意に抑制された。
【まとめ】
mRNA レベルの解析により骨格筋萎縮予防へのスパイス・ハーブの有用性が示唆された。両 E3 ユビキチンリガーゼのタンパク質量の評価とターゲットタンパク質である myosin heavy chain について測定を行っている。

spice and herb, muscle atrophy, E3 ubiquitin ligase

講演番号：3F45a08
講演日時、会場：3 月 28 日 10:27～ F 校舎 45 会場

食用担子菌アンニンコウ（*Grifola gargal*）抽出物の筋肉細胞におけるグルコース取り込み促進作用メカニズムの解明

The mechanism of hot water extracts from *Grifola gargal* on glucose uptake in L6 cells

○吉岡 泰淳[1]、葛 丹瑶[2]、澤田 圭介[2]、原田 栄津子[3]、森園 智浩[3]、芦田 均[2]([1]神戸大自然科学、[2]神戸大院農、[3]株式会社岩出菌学研究所)
○ Yasukiyo YOSHIOKA[1], Danyao GE[2], Keisuke SAWADA[2], Etsuko HARADA[3], Toshihiro MORIZONO[3], Hitoshi ASHIDA[2] ([1]Org. Adv. Sci. Tech., Kobe Univ., [2]Grad. Sch. Agr., Kobe Univ., [3]Iwade Research Institute of Mycology Co. Ltd.)

【目的】アンニンコウ（*Grifola gargal*）は、サルコシカケ科マイタケ属の食用担子菌であり、高血糖抑制作用や脂肪蓄積抑制作用が報告されている。また、アンニンコウ熱水抽出物はラット骨格筋由来 L6 細胞へのグルコース取り込みを促進することが明らかとなり、有効成分の一つとしてアデノシンを同定した。しかし、アデノシンの筋肉細胞における糖取り込み促進作用メカニズムについては未だ明らかとなっていない。そこで本研究では、アデノシンの筋肉細胞における糖取り込み促進作用メカニズムを解明することを目的とした。
【方法】L6 細胞を 2%FBS-MEM で 7 日間培養することで分化誘導を行い、筋管細胞を得た。筋管細胞にアデノシンを 4 時間処理後、2-deoxyglucose を処理し、細胞内への糖取り込みを測定した。また、糖輸送担体 4 型（GLUT4)はインスリンなどの刺激により細胞質から細胞膜へ移行し、細胞内へグルコースを取り込むことから、アデノシン処理後の筋管細胞の原形質膜を分画し、GLUT4 の発現量を western blotting により検討した。さらに、アデノシンの糖取り込み促進作用メカニズムの解明のため、インスリンシグナル経路及び AMPK のリン酸化について検討した。ノックダウン細胞株は、Lipofectamine RNAiMAX を用いて調製した。
【結果】アデノシンはインスリンと同様、GLUT4 を細胞膜上へ局在移行させることがわかった。次に、GLUT4 の膜移行を誘導するインスリンシグナル経路、ならびにインスリン非依存的にグルコース取り込みを促進する AMPK 経路のリン酸化を検討した結果、アデノシンは Akt、PKCλ/ξ 及び AMPK のリン酸化を促進することが観察された。さらに、アデノシンはアデノシンレセプターを介して細胞内にシグナル伝達することから、3 種のアデノシンレセプターA1、A2a 及び A2b をノックダウンさせた細胞を調製し、GLUT4 の膜移行を検討した。その結果、アデノシンレセプターA1 ノックダウン細胞において、アデノシンによる GLUT4 膜移行がキャンセルされた。
【結論】アンニンコウに含有されるアデノシンは、ラット骨格筋由来 L6 細胞において、アデノシンレセプターA1 を介して GLUT4 の膜移行を促進させることで、糖の取り込みを促進していることが示唆された。また、その糖取り込み促進作用メカニズムは、インスリンシグナル経路 Akt 及び PKCλ/ξ、ならびにインスリン非依存的経路 AMPK のリン酸化を介していることが明らかとなった。

adenosine, Grifola gargal, muscle

講演番号：3F45a09
講演日時、会場：3 月 28 日 10:38～ F 校舎 45 会場

黒ショウガ由来のメトキシフラボンは骨格筋におけるタンパク質合成を促進する

Methoxyflavone from *Kaempferia parviflora* promotes protein synthesis in skeletal muscle

○斧 伸太朗[1]、原田 直樹[1]、大桑（林） 浩孝[2]、藤田 貴則[2]、中野 長久[3]、山地 亮一[1]（[1]大阪府立大院生命環境、[2]日本タブレット株式会社、[3]大阪女子短大）
○ Shintaro ONO[1], Naoki HARADA[1], Hirotaka OHKUWA-HAYASHI[2], Takanori HUJITA[2], Yoshihisa NAKANO[3], Ryoichi YAMAJI[1] ([1]Div. Appl. Life Sci., Osaka Pref. Univ., [2]Japan Tablet Corporation, [3]Osaka Women's Junior College)

【目的】近年、日本を含む先進諸国では高齢化が進み、運動器に障害をもつ患者が増加している。骨格筋は、運動器として機能するだけでなく、糖や脂質の代謝も担う組織である。しかし、加齢に伴って骨格筋は萎縮（加齢性筋萎縮）する。骨格筋の萎縮は筋量や筋力を低下させ、運動機能の低下による寝たきりや代謝異常である肥満・糖尿病を誘発し、生活の質を著しく低下させる。したがって、骨格筋量を維持・増加することはこれらの疾病を予防・改善するために重要である。黒ショウガ (*Kaempferia parviflora*) はタイ王国で古来より滋養強壮の効果がある生薬として利用されており、この黒ショウガから 10 種類のメトキシフラボンが同定されている。メトキシフラボンの中には抗肥満作用や抗炎症作用など様々な生理活性を示すものがあるが、骨格筋量に及ぼす影響については不明である。そこで本研究では、これらのメトキシフラボンが骨格筋量に及ぼす影響について検討することを目的とした。
【方法と結果】メトキシフラボン (10 種類) 存在下でマウス由来筋芽細胞株 C2C12 細胞を筋管細胞に分化誘導させた。Myosin heavy chain (MyHC) の抗体を用いた免疫蛍光染色法により筋管細胞の短径を測定した結果、10 種類のうち 5-ヒドロキシ-7-メトキシフラボン、5-ヒドロキシ-3,7-ジメトキシフラボン、5-ヒドロキシ-3,7,4’-トリメトキシフラボン、5-ヒドロキシ-3,7,3’,4’-テトラメトキシフラボンが筋管細胞の短径を著しく増加させ、筋管細胞を肥大させることが判明した。さらに、筋管細胞におけるタンパク質合成の度合いを SUnSET 法で評価したところ、これら 4 種類のメトキシフラボンは筋管細胞におけるタンパク質の合成を促進させた。また、これら 4 種類のメトキシフラボンを含有する粗抽出物 (メトキシフラボン粗抽出物) (合計 76.3%含有) でも同様の効果が認められたため、ddY (雄性、7 週齢) にメトキシフラボン粗抽出物 (5 mg/日) を 4 週間摂食させ、骨格筋量に及ぼすメトキシフラボンの作用を検討した。その結果、コントロール群に比べてメトキシフラボン群のヒラメ筋 (p=0.060) と長趾伸筋 (p=0.066) の重量が増加傾向を示した。さらに、加齢性筋萎縮に対するメトキシフラボンの筋萎縮抑制作用を検討するため、老化促進モデルマウス SAMP1 (雄性, 24 週齢) にメトキシフラボン粗抽出物 (5 mg/日) を 4 週間摂食させた。その結果、SAMR1 (SAMP1 の陰性対照) に比べて SAMP1 のヒラメ筋重量は有意に低値を示したが、メトキシフラボン粗抽出物を摂取した SAMP1 では SAMR1 に比べてヒラメ筋重量に有意な差は認められなかった。以上の結果から、メトキシフラボン粗抽出物はタンパク質の合成を促進し、骨格筋量を維持・増加させることが示唆された。

Skeletal muscle, Methoxyflavone, Sarcopenia

講演番号：3F45a10
講演日時、会場：3 月 28 日 10:49～ F 校舎 45 会場

卵白ペプチドの筋肥大へ与える影響

Effect of chicken egg white peptides on muscle hypertrophy.

○坂下 真耶[1]、松原 守[2]、山下 裕輔[1]、丸 勇史[1]、吉國 義明[1]、金 武祚[1]([1]（株）ファーマフーズ、[2]京都学園大学・バイオ環境)
○ Maya SAKASHITA[1], Mamoru MATSUBARA[2], Yusuke YAMASHITA[1], Isafumi MARU[1], Yoshiaki YOSHIKUNI[1], Mujo KIM[1] ([1]Pharma Foods International Co.,Ltd., [2]Kyoto Gakuen Univ.)

【目的】

筋肉は体を構成する組織の中でも大きな割合を占めており、体を支え、動かすという日常生活で欠かすことのできない機能を担っている。また、筋肉の量および質を向上させることは運動選手にとって非常に重要なことである。さらに、高齢者にとっても、筋肉量を維持し、筋機能の低下を防ぐことは転倒、寝たきりの予防という点から大切である。筋肉の量および質の向上（筋肥大）を促すためにはタンパク質の摂取が効果的と言われている。そこで、我々は優良なタンパク質源である卵白を酵素分解し、機能性に優れた卵白ペプチドを作製した。これまでの卵白ペプチドを用いた研究において、我々は運動パフォーマンスの向上作用や血管拡張作用などの様々な機能性を見出してきた。本研究では卵白ペプチドの筋肥大に与える影響を、細胞および動物を用いた試験にて検証した。

【方法】

タンパク質合成を増加させ、筋肥大において重要な役割を担う p70 S6 kinase(p70S6K)のリン酸化を指標に、マウス由来筋芽細胞株に卵白ペプチドを 0.5～5.0 mg/mL の濃度で添加し、細胞溶解物を電気泳動後、Western blot 法にて、リン酸化 p70S6K および β-actin を検出した。β-actin の検出値に対するリン酸化 p70S6K の検出値の割合を算出した。また、雄性 SD ラットの上肢から摘出した単離筋（滑車上筋）を 95% O_2、5% CO_2 を通気した緩衝液中に浸漬し、卵白ペプチドを混合した緩衝液中で所定時間培養した。対照群は緩衝液のみとした。培養後の単離筋溶解物を用いて、上記と同様の方法でリン酸化 p70S6K および β-actin を検出した。

【結果・考察】

マウス由来筋芽細胞株を用いた試験では、卵白ペプチドを 2.5、または 5.0 mg/mL 添加した条件において、p70S6K のリン酸化が濃度依存的に亢進した。また、単離筋を用いた試験では、卵白ペプチド 5.0 mg/mL 添加条件において、対照群に比べて、p70S6K のリン酸化が約 4 倍亢進した($p<0.05$)。以上の結果より、卵白ペプチドは p70S6K のリン酸化亢進に寄与していることが明らかとなり、筋肥大への関与が示唆された。さらに、p70S6K の上流にある mammalian target of rapamaycin(mTOR)への卵白ペプチドの影響を確認するとともに、マウスを用いて、卵白ペプチドの経口摂取による筋肉中の p70S6K のリン酸化および筋肉量に与える影響についても検証を進めている。

peptide, muscle, sarcopenia

講演番号：3F45a11
講演日時、会場：3 月 28 日 11:10～ F 校舎 45 会場

β-カロテンの骨格筋量増加作用における mTOR シグナル経路の関与

Involvement of mTOR signaling pathway in β-carotene-induced skeletal muscle hypertrophy

○北風 智也[1]、原田 直樹[1]、中野 長久[2]、山地 亮一[1]（[1]大阪府大院生命環境、[2]大阪女子短大）
○Tomoya KITAKAZE[1], Naoki HARADA[1], Yoshihisa NAKANO[2], Ryoichi YAMAJI[1]（[1]Div. Appl. Life Sci., Osaka Pref. Univ., [2]Osaka Women's Junior College）

【背景・目的】骨格筋は体の大部分を占め、運動器としてだけでなく代謝機能も担う重要な組織である。骨格筋量は筋繊維のサイズに依存しており、筋繊維のサイズは筋タンパク質の合成と分解のバランスにより調節されている。タンパク質合成が促進すると筋肥大が起こり、筋タンパク質の分解が促進すると筋萎縮が起こる。タンパク質合成の促進には mTOR シグナル経路の活性化が重要である。一方で、タンパク質分解の亢進による筋萎縮時には筋特異的ユビキチン E3 リガーゼである Atrogin-1 と MuRF1 の発現量が増加する。これまで我々は、β-カロテンが骨格筋量を増加させることを見出している。そこで本研究では、β-カロテンがタンパク質の合成と分解に及ぼす影響について検討するとともに、タンパク質合成に関わる mTOR シグナル経路への影響についても検討を行った。
【方法・結果】8 週齢 ddY 雄性マウスにβ-カロテンを毎日 0.5 mg ずつ 2 週間経口投与を行った後に、骨格筋重量を測定した結果、β-カロテン投与群のヒラメ筋重量が有意に増加した。骨格筋重量の増加したヒラメ筋の筋切片を作製し、筋断面積を測定した。その結果、β-カロテン投与群で筋断面積が増加したことから、骨格筋重量の増加は筋肥大に起因することが明らかとなった。また、ヒラメ筋において、タンパク質合成の促進に関わる因子であるインスリン様成長因子（IGF-1）とそのアイソフォームである IGF-1Ea と MGF の発現量を検討した結果、IGF-1 と IGF-1Ea の mRNA 発現量がβ-カロテン投与群で増加したが、MGF の mRNA 発現量は両群で変化はみられなかった。一方で、タンパク質分解に関わる Atrogin-1 と MuRF1 の mRNA 発現量に変化はみられなかった。次に、β-カロテンが筋管細胞に及ぼす影響を検討するため、マウス筋芽細胞株 C2C12 細胞を筋管細胞に分化させた後、β-カロテン存在下で 4 日間培養した。IGF-1 の mRNA 発現量を測定した結果、β-カロテンによって IGF-1 の mRNA 発現量が増加した。さらにβ-カロテンによるタンパク質合成能に及ぼす影響を検討した結果、β-カロテンにより筋管細胞でタンパク質合成が促進した。次に、β-カロテンによる IGF-1/mTOR シグナルの活性化を検討するため、mTOR とその基質である p70S6K のリン酸化レベルの検討を行った。その結果、β-カロテンにより mTOR と p70S6K のリン酸化レベルが増加した。一方、C2C12 筋管細胞をβ-カロテン存在下で培養後、15 分、30 分、60 分、90 分、120 分における mTOR と p70S6K のリン酸化レベルの検討を行った結果、β-カロテンは mTOR と p70S6K のリン酸化レベルに影響を及ぼさなかった。以上の結果から、骨格筋においてβ-カロテンは IGF-1 の発現を亢進し、その結果として mTOR シグナル経路を活性化させ、タンパク質合成を促進することで筋肥大を誘発して骨格筋量の増加に寄与することが示唆された。

β-Carotene, Skeletal muscle, IGF-1

講演番号：3F45a12
講演日時、会場：3 月 28 日 11:21～ F 校舎 45 会場

特殊精米技術を用いた米の生活習慣病関連因子への影響

Influence of special processing rice on the factor of lifestyle related disease

○許 鳳浩[1,4]、浦田 哲郎[1]、上馬塲 和夫[1,3]、齋藤 義憲[2]、宇住 晃治[2]、鈴木 信孝[4]([1]医療法人ホスピィー 浦田クリニック、[2](株)ライフサイエンス研究所、[3]帝京平成大学 ヒューマンケア学部 東洋医学研究所、[4]金沢大学大学院 医薬保健学総合研究科 臨床研究開発 補完代替医療学講座)
○hoko KYO[1,4], Tetsurou URATA[1], Kazuo UEBABA[1,3], Yoshinori SAITOU[2], Kouji USUMI[2], Nobutaka SUZUKI[4] ([1]Medical corporation HOSPY group, Urata Clinic, [2]Institute of Life Science Co.,Ltd., [3]Department of Human Care, Institute of Eastern Medicine, Teikyo Heisei University, [4]Department of Complementary and Alternative Medicine Clinical Research and Development, Kanazawa University Graduate School of Medical Science)

【目的】新規開発された精米技術を用いた特殊精米（HMK 米：株式会社プレナスのほっともっと金芽ごはん）を連続摂取させ、生活習慣病の関連因子（血圧、HbA1c など）および体質に及ぼす影響について検討した。

【方法】重篤な疾患を有しない 40 歳以上（78±14.5 歳）の被検者 25 名を対象とし、通常精白米を 8 週間摂取（対照群)、その後特殊精米を 16 週間摂取させた（介入群)。評価項目は、血圧、HbA1c、体脂肪率などの生活習慣病関連因子とした。また、調査票（CCMQ-J）による体質調査も行った。試験は日本補完代替医療学会・倫理審査委員会の承認下に実施した。
【結果】１）対照群と介入群の収縮期血圧を比較した結果、介入群で有意に低下が見られ（$p<0.01$)、拡張期血圧も低下傾向を示した（$p=0.079$)。体脂肪率は、対照群と比較し、介入群の方が低値の傾向（$p=0.064$）を示した。摂取前と摂取 8 週目に測定した血中 Th1/Th2 は、介入群で上昇する傾向が認められた（$p=0.059$)。２）血中 HbA1c の層別解析では、摂取前に異常高値を示した者（n=5）では、有意差はみられなかったが、摂取前に正常値を示した者（n=19）では、対照群に比べ介入群の方が有意に低値であった（$p<0.01$)。３）体質への影響については、健康度の高い者では、気虚質、痰湿質、湿熱質、気鬱質などの改善に有益であることが示唆された。
【結論】特殊精米の連続摂取は、血圧や HbA1c を有意に低下させ、生活習慣病の改善に寄与する可能性が示された。また、体質得点の緩やかな改善がみられたことから、本精米の健康増進効果も期待できると考えられた。

special processing rice, lifestyle related disease, constitution of Traditional chinese medicine

講演番号：3F45a13
講演日時、会場：3 月 28 日 11:32～ F 校舎 45 会場

中高年者に対する乳たんぱく質 10g 摂取が身体栄養状態に及ぼす影響

Effects of 10 g milk protein intake on the nutritional status in middle-aged and elderly persons

○川上 智美[1]、宮崎 桂介[1]、秋山 正行[1]、牛田 吉彦[1]、山内 恒治[1]、冨永 友也[2]、熊谷 修[3]([1]森永乳業株式会社、[2]とみなが内科医院、[3]人間総合科学大学)
○Satomi KAWAKAMI[1], Keisuke MIYAZAKI[1], Masayuki AKIYAMA[1], Yoshihiko USIDA[1], Koji YAMAUCHI[1], Tomonari TOMINAGA[2], Shu KUMAGAI[3] ([1]Morinaga milk Industry Co.,LTD., [2]Tominaga Internal Medicine Clinic, [3]Univ. of Human Arts and Sciences)

【背景と目的】

高齢者では少食や偏食等による栄養素の摂取不足に起因する「新型栄養失調」が注目されている。特にたんぱく質の摂取不足は、筋肉や筋力の低下につながり、その結果として転倒・骨折のリスクや健康寿命にも影響することが指摘されている。そのため、中年期から良質なたんぱく質を継続的に摂取し、加齢に伴う筋肉・筋力の低下を予防することが重要となる。

これまでに、高齢者及び中高年者を対象にして運動負荷の条件下でのたんぱく質付加の影響は評価されているが、中高年を対象とするたんぱく質単独付加の効果に関する報告は少ない。そこで、40 歳～74 歳の中高年者を対象として、通常の食事に加えて 1 日 10g の乳たんぱく質を摂取した場合のたんぱく質栄養状態への影響を探索的に評価した。

【方法】

低栄養の可能性のある血清アルブミン値が 3.8～4.4g/dL の中高年者 31 名（年齢 53.5±9.4、男性 16 名・女性 15 名）を対象にランダム化並行群間比較試験を実施した。被験者には、試験内容の説明を十分に行い、文書による同意を得た上で参加させた。乳たんぱく質 10g 含有飲料を摂取する群（たんぱく質群、16 名）とたんぱく質を含有しない飲料を摂取する群（対照群、15 名）にランダムに割付け、1 日 1 本を 12 週間摂取させた。試験期間前後で血液検査と食事調査を、4 週毎に体組成測定（インピーダンス法）と体感調査を実施した。

【結果】

対象者全ての解析では、たんぱく質栄養の指標となる血清アルブミン値及びプレアルブミン値については有意な群間差は認められなかったものの、背景、栄養摂取量や食事多様性得点[1)]による部分集団解析では、多様性得点 7.5 点未満の集団（n=17）でたんぱく群は対照群に比べて試験終了摂取後のプレアルブミン値が有意に高値を示した（群間差 2.64mg/dL、p=0.025）。

【結論】

食事の多様性が低い中高年者が乳たんぱく質 10g を継続摂取することにより、たんぱく質栄養状態を改善する可能性が示唆された。

1) 日本公衛誌 2003;12:1117-1124

protein intake, nutritional status, prealbumin

講演番号：3F45a14
講演日時、会場：3 月 28 日 11:43～ F 校舎 45 会場

ビサクロン高含有秋ウコンエキスが健常成人の二日酔いに及ぼす影響

Effects of turmeric extract containing high bisacurone on hangover in healthy males

○井出 晋太郎[1]、向田 直弘[1]、田岡 幸一[1]、室崎 伸二[1]、山本 佳弘[1]、市川 寛[2]([1]ハウスウェルネスフーズ開発研、[2]同志社大院生命医)
○ Shintaro IDE[1], Naohiro MUKAIDA[1], Koichi TAOKA[1], Shinji MUROSAKI[1], Yoshihiro YAMAMOTO[1], Hiroshi ICHIKAWA[2] ([1]House Wellness Foods Corporation Research & Development Institute, [2]Doshisha University Graduate School of Life and Medical Sciences)

【目的】我々はこれまでの研究において、セスキテルペノイドの一種であるビサクロンを高含有した秋ウコンエキスが、エタノール投与後のマウスの行動量を指標にした二日酔いモデル系において有用であるとともに、エタノール誘導急性肝障害や炎症反応を抑制することを報告した。そこで本研究では、健常成人を対象にビサクロン高含有秋ウコンエキスが二日酔いに及ぼす影響を検討した。
【方法】アルコールパッチテストから ALDH2 遺伝子多型が NN 型と推定された 30 歳以上 49 歳以下の健常成人男性 18 名に、対照食品、試験食品 1(クルクミン)、試験食品 2(クルクミン＋ビサクロン)をクロスオーバー法で単回摂取させた。その後、一定量のお酒(エタノールとして 1.5g/kg)を飲料水とともに 120 分間で摂取させ、経時的に自覚症状のアンケート(VAS)、血中エタノール濃度、平衡バランスの測定を行った。
【結果】試験食品 1(クルクミン)および試験食品 2(クルクミン＋ビサクロン)摂取時の翌朝の血中エタノール濃度は、対照食品摂取時と比較して低い傾向が観察された。一方、翌朝の二日酔いの自覚症状について、試験食品 2(クルクミン＋ビサクロン)摂取時は対照食品摂取時と比較して良好だった人数が有意に多いことが観察された。また、試験食品 2(クルクミン＋ビサクロン)摂取時は、飲酒 120 分後のバランス保持時間が対照食品摂取時よりも長い傾向が観察された。以上の結果から、クルクミンとビサクロン高含有秋ウコンエキスを組み合わせることにより、二日酔いが効果的に改善されることが示唆された。アルコール代謝にはクルクミンが関与し、二日酔い症状の改善にはビサクロン高含有秋ウコンエキスが関与している可能性が考えられた。

Bisacurone, Turmeric, hangover

講演番号：3F45p01
講演日時、会場：3 月 28 日 14:00～ F 校舎 45 会場

イメージング質量顕微鏡によるファイトケミカルの高感度分布解析

High-sensitive analysis of distribution of phytochemicals by using imaging mass microscope

○藤村 由紀[1]、中村 純也[2]、一瀬 智美[1]、金 允喜[3]、佐々木 雅子[2]、海野 結実[4]、緒方 是嗣[4]、中島 宏樹[4]、立花 宏文[1,3,5,6]、割石 博之[1,3,5,7]、三浦 大典[1] ([1]九大レドックスナビ、[2]九大院生資環、[3]九大院農院、[4]島津製作所、[5]九大バイオアーク、[6]九大食品機能デザイン、[7]九大基教)

○Yoshinori Fujimura[1], Jyunya Nakamura[2], Tomomi Ichinose[1], Yoonhee Kim[3], Masako Sasaki[2], Yumi Unno[4], Koretsugu Ogata[4], Hiroki Nakajima[4], Hirofumi Tachibana[1,3,5,6], Hiroyuki Wariishi[1,3,5,7], Daisuke Miura[1] ([1]ICRMN, Kyushu Univ., [2]Grad. Sch. Biores. Bioenviron. Sci., Kyushu Univ., [3]Fac. Agric., Kyushu Univ., [4]Shimadzu Co., [5]KBAC, [6]Food Funct. Design Res. Cent. Kyushu Univ., [7]Fac. Arts Sci., Kyushu Univ.)

多彩な生理作用を有するファイトケミカルの詳細な作用機構の解明には、それらの組織内微小領域における局在情報が必要不可欠であるが、現状ではほとんどわかっていない。近年、生体分子の局所変動を非標識で捉える *in situ* 生体分子マッピング法（質量分析イメージング）の開発が新規分子イメージング法として注目されており、我々も本法を独自に最適化することで緑茶カテキンとその代謝物の組織内分布情報の同時画像化に世界に先駆けて成功している（*Sci. Rep.*, 3, 2805, 2013）。そこで本研究では、既存法よりもさらに高感度・高空間分解能でのファイトケミカルの分布を捉えるマトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析（MALDI-MS）イメージング技術の開発を試みた。

MALDI 法におけるファイトケミカルのイオン化に最適なマトリックス（イオン化助剤）を見出すため、ファイトケミカルと一連のマトリックス混合物をサンプルプレートにスポットし、MALDI-TOF-MS（AXIMA Performance, Shimadzu）に供することで最適イオン化条件を検討した。さらに、C57BL/6J マウスにファイトケミカルを経口投与した後の摘出組織を用いて凍結切片を作成し、そこに選別されたマトリックスを塗布し、MALDI-TOF-MS（空間分解能: 50 μm）に供してイメージング実験を行った。また、同一試料をイメージング質量顕微鏡 iMScope *TRIO*（Shimadzu）に供し、高感度・高空間分解能（10 μm 以下）での分布解析も試みた。

低分子化合物の可視化で汎用されるマトリックス（DHB、CHCA、SA、9-AAなど）を含む約40種類の化合物の中で、1,5-diaminonaphthalene（1,5-DAN）が代表的なファイトケミカルであるケルセチンに対する高い検出能（pmol オーダー）を示した。本化合物は、腎臓組織上でのケルセチンスポットの検出も可能であったが、ケルセチン投与後の腎臓内分布を可視化できなかった（MALDI-TOF-MS）。これに対して、1,5-DAN をマトリックスとして用いた iMScope *TRIO* 分析では、ケルセチン分布の検出が可能であった。また、iMScope *TRIO* は、MALDI-TOF-MS で計測困難なエラグタンニンの一種であるストリクチニンの経口投与後の腎臓内分布（*J. Agric. Food Chem.*, 62, 9279, 2014）も捉えることができた。さらに、本装置は、緑茶カテキン摂取後の腎臓における内在性代謝物群の分布情報の一斉可視化やトマト果実内代謝物群の分布ならびに果実内微小領域の種子代謝物の局在を高感度に捉えることにも成功した。

以上の結果より、イメージング質量顕微鏡 iMScope *TRIO* が、ファイトケミカルをはじめとした植物ならびに動物の組織内代謝物分布の高感度・高空間分解可視化に極めて有用であることが示された。

Phytochemicals, Imaging mass microscope, Label-free imaging

講演番号：3F45p02
講演日時、会場：3 月 28 日 14:11～ F 校舎 45 会場

ケルセチン抱合体代謝物に対する腎臓の脱抱合化反応の解析

Evaluation of deconjugation of quercetin metabolites in kidney

○向井 理恵[1]、鈴木 里穂[1]、田中 義章[1]、嶺川 祥子[1]、河合 慶親[2]、寺尾 純二[1]([1]徳島大 HBS 研・食品、[2]名大院・生命農)
○Rie MUKAI[1], Riho Suzuki[1], Yoshiaki Tanaka[1], Shoko Minekawa[1], Yoshichika Kawai[2], Junji Terao[1] ([1]Tokushima Univ. Food Sci., [2]Grad. Sch. of Bioagr., Nagoya Univ.)

（目的）経口摂取したフラボノイドの多くは、抱合体代謝物として血液循環する。代表的な野菜フラボノイドであるケルセチンの抱合体代謝物は、活性型アグリコンの前駆体として作用することにより生理機能を発現することを我々は明らかにした（1)。さらに活性化マクロファージがβ-グルクロニダーゼ（GUSB）による代謝物の脱抱合反応に寄与することを示した（2)。一方各種組織中には抱合体代謝物とともに脱抱合体であるアグリコンが蓄積することが報告されたが（3)、組織へのアグリコン蓄積を分析するための試料調整段階においてケルセチンの脱抱合反応がおこる可能性が指摘されている。そこで本研究は、マウス組織中のアグリコン蓄積に影響する GUSB 活性を比較評価するとともに、ケルセチンの主要標的臓器である腎臓におけるアグリコンの生成を検討することを目的とした。
（方法と結果）フラボノイドを摂取した C57BL/6 マウスの肝臓のホモジネート作製時に、GUSB 阻害剤である d-saccharic acid 1,4-lactone（SL)を添加すると、UV-HPLC で定量したアグリコン量が低下したことから、ホモジネート作製段階で抱合体代謝物からアグリコンへの変換が起こることが明らかになった。次に C57BL/6 マウスの各組織の 25%(w/w)ホモジネートを作成し、その希釈液に基質である quercetin-3-*O*-β-glucuronide (Q3GA)を加えて反応を開始した。SL 添加により反応を停止させた後にアグリコンの生成量を HPLC で測定することにより GUSB 活性を評価した。GUSB の活性は腎臓、肝臓、脾臓、肺で顕著であったが、心臓、筋肉、脳では低い傾向であった。ケルセチン摂取後のマウスやケルセチン含有食品を摂取したヒトの尿中でも総ケルセチン量に対して数%のアグリコンが検出された。摂取ケルセチンは血中ではほぼ全てが抱合体代謝物として存在することから、尿中のアグリコンは腎臓での脱抱合反応に由来すると推察された。
(まとめ)腎臓などの生体組織中に蓄積するケルセチンアグリコンの定量分析では、組織が有する GUSB 活性によって操作中に抱合体代謝物から artifact としてアグリコンが生成するため、SL などの GUSB 阻害剤添加が必要である。また、腎臓においてはアグリコンが一定量蓄積する可能性があるので、アグリコンおよび抱合体代謝物の両者での機能性評価が必要であることが判明した。
(1) Kawai et al. J Biol Chem. 2008, 283:9424-34 (2) Ishisaka et al. PLoS ONE 2013:8:e80843 (3) Bieger et al. J. Nutr. 2008:138:1417-1420 (4) Lu et al. J. Pharmaceut. Biomed. Anal. 2013:88:364-369

quercetin, deconjugation, flavonoids

講演番号：3F45p03
講演日時、会場：3 月 28 日 14:22～ F 校舎 45 会場

O-desmethylangolensin 産生菌 SY8519 株の代謝に関する研究
Study of the metabolic profile on *O*-desmethylangolensin-producing bacterium, SY8519
○丹羽 利夫[1]、横山 慎一郎[2]、鈴木 徹[3]、大澤 俊彦[4] ([1]尚絅学院大学総合人間、[2]岐阜県・生物工学研、[3]岐阜大・連農、[4]愛知学院大心身科学)
○Toshio Niwa[1], Shin-ichiro Yokoyama[2], Tohru Suzuki[3], Toshihiko Osawa[4] ([1]Shokei Gakuin Univ., [2]Industrial Technology Center, Gifu Pref. Gov., [3]Gifu Univ., [4]Aichi Gakuin Univ.)

【目的】近年われわれは daidzein および genistein のヒト腸内細菌（*Clostridium* rRNA cluster XIVa strain SY8519）による代謝（分解）について検討してきた（*1,2*)。そこでさらに大豆イソフラボノイドの生体内代謝を明らかにするため、大豆に含まれる daidzein および genistein のモノメチルエーテルである formononetin と biochanin A について検討を行なうこととした。
【方法】既報に従い SY8519 株を Gifu Anaerobic Medium 中で生育させ、この培地に各サンプルのエタノール溶液を添加し、嫌気条件下 37℃で反応を行った。培地を酸性条件下酢酸エチルで抽出し、HPLC による分析をおこなった。
【結果と考察】formononetin と biochanin A を SY8519 株に与えたところそれぞれ *O*-desmethylangolensin (*O*-DMA)および 2-(4-hydroxyphenyl)propionic acid を生成することが確認された。これらの結果より、formononetin および biochanin A がそれぞれ daidzein、genistein を中間体として生成していることが示唆された。そこで formononetin を SY8519 株に与えたときの経時変化を調べたところ脱メチル化物である daidzein は検出されたものの、いずれにおいても比較的低い濃度であったことから formononetin からの脱メチル反応が daidzein から *O*-DMA への反応に比較して遅いということが示唆された。

ついで SY8519 株による脱メチル化反応について検討するため 3,4,5-tri-*O*-methylgallic acid methyl ester について検討を行ったところ、ほぼ単一の化合物を与えた。この生成物の ^{1}H NMR 等による構造解析を行なった結果 3-*O*-methylgallic acid methyl ester であった。さらに 3,5-di-*O*-methylgallic acid methyl ester を基質としたところ同様に一つのメチル基の脱離のみが起こったことから、SY8519 株による脱メチル化反応がメチル基の位置や基質によって異なることが示唆された。

現在 equol をはじめとした大豆イソフラボノイドの腸内細菌による代謝変換を考慮した生体内機能が注目されているが、今回の研究は自然界にも数多く存在するメチルエーテルを持つポリフェノールの生体内機能にも腸内細菌が関与することを示唆するものである。

(1) Niwa *et al.*, *Food Chem.*, **138**, 122 (2013).
(2) Niwa *et al.*, *Food Chem.*, **171**, 153 (2015).

human, metabolism, soy isoflavonoids

講演番号：3F45p04
講演日時、会場：3 月 28 日 14:33～ F 校舎 45 会場

黒ショウガ(*kaempferia parviflora*)のポリメトキシフラボンにおける時計遺伝子発現調節

Polymethoxyflavones from black ginger (*kaempferia parviflora*) regulate the expression of circadian clock genes

○吉田 泉、熊谷 百慶、小泉 慶子、渡辺 章夫、三嶋 隆、藤田 和弘、渡井 正俊 (日本食品分析セ)
○Izumi Yoshida, Momochika Kumagai, Keiko Koizumi, Akio Watanabe, Takashi Mishima, Kazuhiro Fujita, Masatoshi Watai (Japan Food Research Laboratories)

【目的】概日リズムは生物個体が持つ約 24 時間周期のリズムで，生物自身が持つ体内時計によって制御されている。体内時計は，摂食行動，睡眠覚醒，体温，ホルモン分泌などをはじめ様々な生体機能を制御しており，近年，不規則な生活による体内時計の乱れが，癌，うつ病，肥満，メタボリックシンドローム，老化等のリスクを上昇させていることが明らかになっている。体内時計には，脳の視床下部視交叉上核にある中枢時計と肝臓・肺・腎臓・心臓・筋肉など種々の組織に存在する末梢時計があり，中枢時計は光によって調整されるのに対し，末梢時計は主に食事によって調整されることが知られている。本研究では，体内時計を調節する新たな機能性成分の発見を目的としてスクリーニングを行った。その結果，時計遺伝子の発現調節作用が認められた黒ショウガについて，遺伝子発現を経時的に調べた。さらに，時計遺伝子を調節する成分の同定も行った。
【方法】黒ショウガは 50%エタノールにより抽出を行った。マウス繊維芽細胞である NIH-3T3 細胞をデキサメタゾンで同調化させたのち,黒ショウガの 50%エタノール抽出物を NIH-3T3 細胞に添加した。4 時間毎に NIH-3T3 細胞から RNA を抽出し，時計遺伝子(*Per1*, *Per2*, *Cry1*, *Bmal1*, *Clock* a, *Dec1*)の発現を定量的 RT-PCR により調べた。また，黒ショウガにおいて時計遺伝子調節機能を持つ成分を同定するため，分取 HPLC により分画を行った。分画した画分のうち，時計遺伝子を調節する画分の同定は，FT-MS および ^{1}H-NMR を用いて行った。
【結果】NIH-3T3 細胞に黒ショウガの 50%エタノール抽出物を添加し，時計遺伝子の発現を経時的に調べた結果，*Per2* および *Cry1* の発現には黒ショウガ添加後 4-6 時間でピークとなるリズムが認められた。一方，*Bmal1* の発現は添加後 20-24 時間で上昇した。次いで，時計遺伝子の発現を調節する成分の同定を行った。黒ショウガの成分のうち、*Per2* 遺伝子の発現調節に関与する成分は，3,5,7,3’,4’-ペンタメトキシフラボン，5,7,4’-トリメトキシフラボンおよび 5,7-ジメトキシフラボンであった。*Bmal1* 遺伝子の発現調節には、5,7-ジメトキシフラボンおよび 5,7,4’-トリメトキシフラボンが関与していた。以上のことから，黒ショウガのポリメトキシフラボンには，体内時計を調節し，乱れた概日リズムを改善する可能性があることが示唆された。

polymethoxyflavone, black ginger, circadian clock

講演番号：3F45p05
講演日時、会場：3 月 28 日 14:44～ F 校舎 45 会場

食品ポリフェノールによる世代を超えての代謝改善に関わるエピジェネティクス修飾

Epigenetic modification related with trans-generational metabolic improvement by food polyphenol

○高須 亮佑[1]、ホナーギエ クレア[4]、近藤 隆[3]、阿部 啓子[1,3]、三坂 巧[1]、白髭 克彦[2]、安岡 顕人[3]、岡田 晋治[1]([1]東大院農生科・応生化、[2]東京大学分子生物学研究所、[3]神奈川科学技術アカデミー、[4]東京大学 先端科学技術研究センター)
○Ryosuke Takasu[1], Claire Renard-Guillet[4], Takashi Kondo[3], Keiko Abe[1,3], Takumi Misaka[1], Katsuhiko Shirahige[2], Akihito Yasuoka[3], Shinji Okada[1] ([1]Dept. Appl. Biol. Chem., Grad. Sch. Agri. Life Sci.,Univ. Tokyo, [2]Dept. Biophy. Biochem., Grad. Sch. Sci., Univ. Tokyo, [3]KAST, [4]Research Center for Advanced Science and Technology)

【背景・目的】

近年、親世代への代謝ストレスがエピジェネティックな修飾を経て子世代の健康に影響を与えることが明らかになりつつある。マウスを用いた研究により、父親への高脂肪食や低葉酸食の投与が仔のインスリン分泌や生殖能力に影響し、関連する遺伝子のエピジェネティックな修飾を変化させることが明らかになっている。一方、食品非栄養成分にはこのような代謝ストレスを軽減するものが存在する。我々はアルコール性脂肪肝マウスをモデルとして、食品ポリフェノールによる代謝ストレス軽減効果をトランスクリプトームの面から解析してきた。その結果、エタノール摂取は肝臓の遺伝子発現変動を引き起こすが、レスベラトロール(RSV)の共投与はこれに拮抗するような遺伝子制御を行い、脂肪肝も抑制することが明らかになった(文献)。このアルコール性脂肪肝マウス(オス)の仔の表現型を解析したところ、エタノール摂取(E)群仔は体重と血中中性脂肪値が対照(C)群仔に比べて高く、RSV 共摂取(ER)群仔は C 群仔と同程度であった。昨年度の本学会では C、E、ER 各群オス親精子ゲノム DNA のメチル化をバイサルファイトシークエンス法により解析し、エタノール摂取によるメチル変動が RSV 共摂取で緩和されるような染色体部位を探索したことについて報告した。本研究では、このような代謝改善に関与するエピジェネティック修飾が仔に継承される可能性について検討した。

【方法・結果】

6 週齢 C3H/HeN 雄マウスに Lieber の液体対照食（C)、5%エタノール含有食（E)、5%エタノール＋73mg/L RSV 含有食（ER）を 5 週間摂取させた。一部のマウスの遊走精子を採取し、残りを正常な 8 週齢の C3H/HeN 雌マウスと交配させた。雄仔マウスを 3 週齢で解剖し、血清・肝臓を採取した。前回の実験と同様に、E 群仔の体重は有意に高く、ER 群ではその増加が緩和されていた。各群の雄親精子と雄仔肝臓の DNA メチル化状態を効率的に解析するため、メチル化 DNA 結合タンパク質で DNA を精製し、配列解析した(MBD-seq)。MBD-seq は高メチル化部位を特異的に解析することができる。各群 n=3 でメチル化 DNA の精製を行ったのち、各群を一つに混合したサンプルを用いてライブラリを作成した。現在、読み取り深さを検討するため、100 塩基 x 3000 万リード程度の解析を C 群親精子に対して行っている。今後は Bowtie2 や MACS などの解析ソフトを用いて親精子及び仔肝臓のメチル化 DNA の配列をゲノムにマッピングし、群間で比較する。さらにこの結果をバイサルファイトシークエンス法によって得たデータと比較し、仔に継承されるメチル化変動部位を探索する予定である。

polyphenol, epigenomics, methylation

講演番号：3F45p06
講演日時、会場：3 月 28 日 15:05～ F 校舎 45 会場

グァバ葉のスキンケア化粧品素材としての機能性

Function of guava leaf for skin care

○西川 規代[1]、吉金 優[2]、中島 悦子[2]、樋口 慶郎[2]、沢村 正義[2]([1]（有）アフロディア、[2]高知大土佐 FBC)
○Kiyo NISHIGAWA[1], Yu YOSHIKANE[2], Etsuko NAKASHIMA[2], Keiro HIGUCHI[2], Masayoshi SAWAMURA[2] ([1]Aphrodite, [2]Kochi Univ.)

【目的】

グァバ（*Psidium guajava* L.）は、フトモモ科バンジロウ属の亜熱帯性の常緑樹である。弊社は高知県南国市の有機 JAS 認定の自家農園において、2011 年 6 月よりグァバを栽培し、その葉を茶葉に加工、販売している。これまでに高知県産グァバ茶葉は海外産茶葉に比べて、高いチロシナーゼ阻害作用及び抗酸化活性をもつことを明らかにした[1)]。そこで、本研究ではグァバ茶葉のスキンケア化粧品素材としての可能性を追求するために、マウス B16 メラノーマ細胞を用いたメラニン産生抑制試験を行った。また、皮膚の弾力性を保つコラーゲン、ヒアルロン酸およびエラスチンに対する各分解酵素の阻害試験を行った。

【方法】

グァバ茶葉を 15% 1,4-ブチレングリコール（BG）を用いて抽出した溶液を被験液として用いた。メラニン生成試験は、マウス B16 メラノーマ細胞 JCRB0202（JCRB 細胞バンク）と各濃度の被検液を共培養し、培養 2 日後のメラニン量を吸光度法により測定した。細胞毒性試験は、MTT 法により測定した。コラーゲナーゼ、ヒアルロニダーゼおよびエラスターゼ阻害試験は、それぞれウシ精巣、*Clostridium histolyticum* およびブタ膵臓由来の酵素を用いて行った。

【結果】

グァバ茶葉は濃度依存的にマウス B16 メラノーマ細胞のメラニン生成を抑制し、その 50%阻害濃度は 0.2 mg 茶葉/mL であった。グァバ茶葉は、美白剤として知られるβ-アルブチン（0.1 mg/mL）の約半分の阻害作用を示した。また、試験した濃度条件下では、メラノーマ細胞の増殖および生存率に影響を与えなかった。グァバ茶葉は濃度依存的にコラーゲナーゼ、ヒアルロニダーゼおよびエラスターゼ活性を阻害し、その 50%阻害濃度はそれぞれ 0.12、1.9 および 1.3 mg 茶葉/mL であった。以上のことから、グァバ茶葉は美白作用および、抗シワ・たるみ作用を持つ可能性が期待され、スキンケア化粧品素材として有望であることが明らかとなった。

1)西川ら、日本農芸化学会中四国支部第 39 回講演会講演要旨集、p.29（2014）.

guava, melanin, tyrosinase

講演番号：3F45p07
講演日時、会場：3 月 28 日 15:16～ F 校舎 45 会場

ヘアレスマウスにおいてアスタキサンチンの経口摂取は UVA に誘導される皮膚光老化を抑制する
Dietary astaxanthin prevents UVA-induced skin photoaging in hairless mice

佐々木 克[1]、小松 俊之[1]、真鍋 祐樹[1]、斎藤 仁美[2]、平田 孝[1,3]、○菅原 達也[1]（[1]京大院農、[2]富士フイルム（株）、[3]四条畷学園大）
Suguru SASAKI[1], Toshiyuki KOMATSU[1], Yuki MANABE[1], Hitomi SAITO[2], Takashi HIRATA[1,3], ○Tatsuya SUGAWARA[1] ([1]Kyoto Univ., [2]FUJIFILM Co., [3]Shijonawate Gakuen Univ.)

【目的】紫外線は、活性酸素種を発生させ、光老化とよばれる皮膚の老化現象を引き起こす。なかでも真皮層にまで到達できる UVA による影響が注目されており、その防御法が検討されている。アスタキサンチンは、天然脂溶性色素カロテノイドの一種であり、極めて強い抗酸化作用を有し、様々な生理活性を示すことが知られている。したがって、アスタキサンチンを経口摂取することで皮膚への到達が可能であれば、紫外線による皮膚光老化に対して、塗布するよりも効率的に体内から抑制できると期待される。そこで本研究では、UVA 照射ヘアレスマウスを光老化モデルとして用い、ヘマトコッカス藻由来アスタキサンチンの経口摂取が光老化に与える影響を調べた。
【方法】ヘマトコッカスから精製した脂肪酸モノエステル型アスタキサンチンまたはヘマトコッカス油乳化組成物の乾燥粉末（ナノ化アスタキサンチン）を試料として用いた。AIN93G 組成に準じた基本食に、アスタキサンチン当量として 0.01 または 0.1%となるようにそれぞれ配合したものをアスタキサンチン含有試験食とした。ヘアレスマウス（Hos:HR-1）を 1 週間予備飼育後、6 群に分け、ノーマル群とコントロール群には AIN93G 食を、アスタキサンチン食群にはアスタキサンチン試料を含むそれぞれの飼料を自由摂食させ、10 週間の試験飼育を行った。試験期間中、ノーマル群以外に対して、1 週間に 5 日、一日当たり 20 J/cm2 となるように UVA 照射を背部に対して行った。経時的に経皮水分蒸散量（TEWL）の測定と背部皮膚レプリカの三次元画像解析を行い、アスタキサンチン摂取による影響を調べた。試験期間終了後、皮膚を採取し、真皮層と表皮層に分け、それぞれのアスタキサンチン含有量について HPLC と LC/MS を用いて測定した。
【結果】コントロール群の TEWL は、試験開始後 8 週目と 10 週目にノーマル群と比較して有意に増加した。一方、10 週目において、すべてのアスタキサンチン食群で、コントロール群と比較して有意に TEWL が抑制された。背部皮膚レプリカを用いたシワ解析では、10 週目において、ノーマル群と比較してコントロール群で有意に増加したが、すべてのアスタキサンチン食群でコントロール群と比較して有意に抑制された。試験期間終了後、試験群の表皮層と真皮層からアスタキサンチンが検出されたが、真皮層の蓄積量は表皮層の約 10 倍であった。
以上の結果から、アスタキサンチンの経口摂取は、皮膚の光老化を効率的に抑制できることが示された。

astaxanthin, photoaging, skin

講演番号：3F45p08
講演日時、会場：3 月 28 日 15:27～ F 校舎 45 会場

清酒に含まれる甘苦味物質エチル-α-D-グルコシドの味覚受容体刺激

Ethyl-α-D-glucoside, sweet/bitter substance in sake stimulates human taste receptors

○中島 香奈[1]、中尾 暁彦[1]、木野内 春香[2]、股野 麻未[2]、柏木 豊[1,2]、前橋 健二[1,2] ([1]東京農大院醸造、[2]東京農大醸造)
○ Kana NAKAJIMA[1], Akihiko NAKAO[1], Haruka KINOUCHI[2], Mami MATANO[2], Yutaka KASHIWAGI[1,2], Kenji MAEHASHI[1,2] ([1]Dept. Fermentation Sci. Technol. Tokyo Univ. Agric., [2]Dept. Fermentation Sci. Tokyo Univ. Agric.)

【目的】

味覚は 5 つの基本味に分類され、甘味、苦味、及びうま味は味細胞に存在する G タンパク質共役型受容体により、塩味や酸味はイオンチャンネル型受容体により受容され、味神経を介して認識される。これらのうち甘味はエネルギー源の存在を示唆する栄養シグナルであり美味しさを形成する主要因である。一方、苦味は本来忌避性のシグナルであるが、程度によってはコク味の要素として美味しさに寄与する。清酒の甘味成分は原料米デンプンが麹菌の α-アミラーゼ、グルコアミラーゼ等の作用により生じるグルコースが大部分を占めるが、他にもイソマルトース、マルトース、イソマルトオリゴ糖等様々な糖類が含まれる。また、麹菌の α-グルコシダーゼによる糖転移反応でマルトオリゴ糖とエタノールから生成するエチル-α-D-グルコシド（α-EG）は、甘味と苦味の両方を有する物質である。清酒に比較的多く含まれていることから、清酒の苦味及び濃厚味を与える因子の一つとして、清酒の風味構成に寄与している可能性が指摘されている。しかしながら、α-EG の特徴的な呈味性について官能試験による検討は見られるものの味覚受容体レベルでの分子生物学的作用についての知見は見られない。

そこで、本研究では清酒特有の甘苦味成分 α-EG の甘味受容体及び苦味受容体への作用を培養細胞アッセイ系にて調べた。

【方法】

ヒト甘味受容体 hT1R2 及び hT1R3 の各遺伝子は、ヒトゲノム（Clontech）から PCR にて増幅した後アッセンブルし、それぞれ発現ベクターに組み込んだ。これらを用いて甘味受容体を G タンパク質を安定発現している HEK293 細胞にて一過性発現させた。その後、カルシウム指示薬を負荷した後、リガンド溶液を添加し、甘味受容体応答による細胞内カルシウム濃度変化を計測した。また、各種ヒト苦味受容体 hT2R 安定発現細胞を用いて、同様に苦味受容体応答を調べた。

【結果】

α-EG はグルコースやマルトース等の糖類と同様に甘味受容体を刺激することが確認された。さらに、α-EG が複数の苦味受容体にも作用することを見出した。従って、α-EG に特徴的な味質は甘味受容体と苦味受容体の両方を刺激することによって生じる複合味覚であると推定された。

ethyl-α-D-glucoside, sweet receptor, bitter receptor

講演番号：3F45p09
講演日時、会場：3 月 28 日 15:38～ F 校舎 45 会場

甘味受容体における甘味抑制物質作用モデルの構築

Construction of docking models between human sweet taste receptor and it's inhibitor

○中北 智哉[1]、広川 貴次[2]、三坂 巧[1] ([1]東大院農生科・応生化、[2]産業技術総合研究所)
○Tomoya Nakagita[1], Takatsugu Hirokawa[2], Takumi Misaka[1] ([1]Dept. Appl. Biol. Chem., The Univ. Tokyo, [2]National Institute of Advanced Industrial Science and Technology)

[背景・目的] 甘味受容体はGタンパク質共役型受容体(GPCR)であるT1R2及びT1R3がヘテロダイマーを形成することによって機能する。これらはClass C GPCRに分類され、複数のリガンド作用部位が存在することが知られる。その中の一つ、T1R3 の膜貫通領域には甘味増強物質及び甘味抑制物質の双方が作用することが明らかとなっている。

我々はこれまでに甘味増強・抑制物質の作用機序の違いについて解析を実施してきた。甘味抑制剤ラクチゾールについては既に作用部位が報告されているものの(Jiang *et al.*, 2005)、ラクチゾールよりも強力な抑制能を有する類縁体 2,4-DP に対しては詳細な作用残基が明らかにされていなかった。そこで、両者の作用部位の違いを見出すことを目的に受容体の点変異体を用いた解析により網羅的な作用部位の探索を実施した。

一方で昨年、T1Rs と同じく Class C GPCR に属する代謝型グルタミン酸受容体 mGluR1 の膜貫通構造における不活性型の結晶構造が明らかとなったことから、この結晶構造を基にすることで従来よりも精度の高い T1R3 の膜貫通領域のホモロジーモデルを作製することが可能となってきた。そこで、我々が実施した点変異体解析結果と照らし合わせ、ラクチゾール類縁体の作用機序を詳細に明らかにし、より強力な抑制剤を探索することを目的とした。

[方法・結果] T1R2、T1R3(またはその点変異体)及びキメラ G タンパク質 G16gust44 を安定的に発現するコンストラクトを用いて、ラクチゾール、2,4-DP に対して点変異体解析を実施した。この結果から T1R3 の膜貫通領域に存在する 2 ヶ所の残基が抑制剤として作用するために重要であることが示唆された。そこで、mGluR1 の結晶構造を鋳型としてホモロジーモデルを作製し、これら 2 ヶ所の残基とそれぞれの抑制剤が相互作用するようにドッキングを実施した。ドッキングにはシミュレーションソフト Maestro 及び Glide (Schrödinger Inc.)を用いた。得られたモデルは我々の点変異体解析結果を十分に説明することが可能であったことから、実際のデータを反映した精度の高いドッキングモデルが得られたと判断した。現在この結果に基づいてより強力な抑制剤の探索を行っている。

本研究の一部は総合科学技術・イノベーション会議の SIP(戦略的イノベーション創造プログラム)「次世代農林水産業創造技術」よって実施された。

sweet-taste-receptor, modeling, inhibitor

講演番号：3F45p10
講演日時、会場：3 月 28 日 15:49～ F 校舎 45 会場

ヒト甘味受容体の活性を抑制するフレーバー化合物

Study on flavor compounds which inhibit the human sweet taste receptor

○野尻 健介[1,2]、藤原 聡[1]、小黒 大地[1]、山本 直人[1]、三坂 巧[2]([1]長谷川香料（株）、[2]東大院農生科・応生化)
○Kensuke NOJIRI[1,2], Satoshi FUJIWARA[1], Daichi OGURO[1], Naoto YAMAMOTO[1], Takumi MISAKA[2] ([1]R&D Center, T. Hasegawa Co., Ltd., [2]Dept. Appl. Biol. Chem., The Univ. Tokyo)

【目的】
香料化合物の中には匂いを呈するのみならず、味に影響するものが知られている。例えばダマスコンはスクロースの甘味を抑えることが官能的に確認されている。我々はヒト甘味受容体発現細胞を用いて、ダマスコンの甘味抑制作用がヒト甘味受容体の活性抑制を介した作用であることを強く示唆する結果を示した。この結果により様々な香料化合物がヒト甘味受容体の活性を抑制する可能性が示唆された。そこで本研究では、甘味抑制物質として知られているラクチゾールとの構造活性相関から甘味に影響を与えうる香料化合物の甘味受容体活性への影響を検討した。
【方法】
ヒト甘味受容体およびキメラGタンパク質を安定発現させた細胞へ香料化合物を各種甘味料とともに投与した。リガンド投与により生じるヒト甘味受容体発現細胞内のCa^{2+}濃度変化を受容体活性の指標とし、甘味料のみの場合をコントロールとして甘味調節活性を評価した。
【結果】
検討の結果、2-methyl-3-(4-propan-2-ylphenyl)propanal（シクラメンアルデヒド）がヒト甘味受容体発現細胞の応答を強く抑制した。ヒト甘味受容体発現細胞のスクラロースに対する応答はシクラメンアルデヒド存在下で有意に抑制され、この抑制効果は濃度依存的に観察された。IC_{50}値はラクチゾールよりも小さかった。またシクラメンアルデヒドによる甘味受容体の応答抑制効果は、様々な甘味料を用いても認められた。したがって、シクラメンアルデヒドはヒト甘味受容体の強力な阻害剤として機能することが期待される。

flavor, sweet inhibitor, taste receptor

講演番号：3F45p11
講演日時、会場：3 月 28 日 16:10～ F 校舎 45 会場

ハチドリにおける甘味受容能の進化
Evolution of sweet taste perception in hummingbirds

○戸田 安香[1]、Baldwin Maude[2]、中北 智哉[3]、Connell Mary[4]、Klasing Kirk[5]、Edwards Scott[2]、Liberles Stephen[6]、三坂 巧[3]（[1]東大院農生科・応生化（現・キッコーマン株式会社）、[2]Dept. OEB, Harvard Univ.、[3]東大院農生科・応生化、[4]Sch. Biotech. Dublin City Univ.、[5]Dept. Anim. Sci., UC Davis.、[6]Dept. Cell Biol., Harvard Med. Sch.）
○Yasuka Toda[1], Maude Baldwin[2], Tomoya Nakagita[3], Mary Connell[4], Kirk Klasing[5], Scott Edwards[2], Stephen Liberles[6], Takumi Misaka[3] ([1]Dept. Appl. Biol. Chem., The Univ. Tokyo (currently Kikkoman Corporation), [2]Dept. OEB, Harvard Univ., [3]Dept. Appl. Biol. Chem., The Univ. Tokyo, [4]Sch. Biotech. Dublin City Univ., [5]Dept. Anim. Sci., UC Davis., [6]Dept. Cell Biol., Harvard Med. Sch.)

【背景と目的】近年、動物の食性と味覚に深い結びつきがあることが明らかになってきた。嗜好味である甘味と旨味は、それぞれ G タンパク質共役型受容体である T1R2 と T1R3 または T1R1 と T1R3 のヘテロダイマーで受容される。肉食動物であるネコは甘味受容体を構成する T1R2 を失っており、肉の旨味を感じることができるが、糖の甘味を感じることはできない。一方で、肉食から竹食に転向したパンダは T1R1 を失っており、旨味を感じることができないと考えられている。鳥類においても、ニワトリ、シチメンチョウなどのゲノム解析から T1R2 の欠失が報告され、鳥類は甘味を感じることができないと考えられてきたが、鳥類の味覚受容体のレパートリーと食性の関連は明らかになっていなかった。鳥類の食物は穀物、小動物、昆虫など多様性に富んでいるが、ハチドリは花の蜜を主食にすることで知られる。ハチドリには現在 300 以上の種が確認されているが、この種の繁栄には花蜜食という他の鳥類とは別の食性を獲得したことが貢献したと考えられている。しかし、甘味受容体がないはずのハチドリがどうやって花蜜の味を感知しているのかは謎だった。そこで、本研究では鳥類における T1R 遺伝子の探索と味覚受容体の機能解析を行い、ハチドリの糖の受容機構の解明を行った。
【方法と結果】まず、食性の異なる 13 種の鳥の全ゲノム配列から T1R の遺伝子を探索した。その結果、全ての鳥において T1R1 と T1R3 をコードする遺伝子が確認された。一方で、T1R2 をコードする遺伝子（*Tas1r2*）は認められなかった。鳥類に最も近縁なワニ類では *Tas1r2* 遺伝子が確認されたため、T1R2 の欠失は鳥類の祖先（例えば、肉食恐竜）で生じたものだと示唆された。以上の結果から、ハチドリには甘味受容体 T1R2/T1R3 とは異なる糖の受容体が存在すると考えられた。
　糖の受容体を同定するために、ニワトリ、ハチドリ、アマツバメの味覚受容体の機能解析を行った。その結果、ハチドリにおいては脊椎動物において広くアミノ酸受容体として知られる旨味受容体 T1R1/T1R3 がスクロースなどの甘味物質に応答することが明らかになった。一方で、穀物食のニワトリや、昆虫食のアマツバメの T1R1/T1R3 は甘味物質には応答せず、アミノ酸のみに応答した。ハチドリ T1R1/T1R3 が糖の受容能を獲得した機構を解明すべく、ハチドリとニワトリのキメラ T1R1/T1R3 の機能解析を行った。その結果、ハチドリ T1R1/T1R3 は T1R1 と T1R3 両方に広がる複数の変異の末、糖の受容能を獲得したことが明らかになった。以上の結果から、祖先が一旦失った糖の味を感知する能力を、ハチドリは旨味受容体のダイナミックな構造変化の末に再び獲得したことが明らかになった。本成果は食物選択における味覚の重要性を証明するものだと考えられる。

taste, bird, evolution

講演番号：3F45p12
講演日時、会場：3 月 28 日 16:21～ F 校舎 45 会場

細胞系を用いた低甘味度甘味料の評価
Evaluation of low-sweetness sweeteners using a sweet taste receptor hT1R2/T1R3-expressing cell line
○久野 美菜子、鈴川 縁、三坂 巧（東大院農生科）
○Minako KUNO, YUKARI SUZUKAWA, TAKUMI MISAKA (Dept. Appl. Biol. Chem., the Univ. Tokyo)

【背景•目的】
ヒトは甘・酸・塩・苦・旨味の五基本味を含む様々な味を識別することができる。中でも甘味は嗜好性が強く、食行動を決定する重要な情報となっている。甘味物質は、舌上皮層に分布する味蕾中の味細胞に存在するGタンパク質共役受容体である甘味受容体(T1R2とT1R3のヘテロダイマー)を介して認識されることが知られている。
当研究室ではT1R2,T1R3およびキメラGタンパク質を安定発現させた、応答性の非常に高いヒト甘味受容体安定発現細胞株の構築に成功しており、これを用いてスクラロースやスクロースなどの高甘度の甘味に対する応答を測定し、客観的な応答強度を呈示することが可能となっている。
一方、マルトース、イソマルトース、マルトトリオースなどの糖類も様々な食品中に含有され日常的に摂取されている甘味物質である。しかしながら、低甘度であり、細胞応答が非常に弱いため、本細胞系を用いた客観的な味の評価がこれまで行えていなかった。そこで、ヒト甘味受容体に作用し、広範な甘味物質に対して増強能を持つことが示されているネオヘスペリジンジヒドロカルコン(NHDC)(Fujiwara et al., Food Chem., 2012)を用いることで、低甘味度甘味料の甘味を本細胞で評価できるかどうかについて検討を行った。
【方法・結果】
甘味受容体であるT1R2/T1R3およびキメラGタンパク質を発現させたヒト甘味受容体安定発現細胞株に、カルシウム蛍光指示薬を負荷した後、リガンドを添加した。リガンド添加時に甘味受容体が活性化されると細胞内カルシウムイオンの濃度変化が生じるので、これを蛍光色素の蛍光強度変化として測定することで、それぞれのリガンドの甘味受容体活性化能について評価した。マルトースをはじめとする少糖類をリガンドとして用いたところ、100 mMの濃度で単独で投与した時には細胞応答がほとんど観察されなかった。一方これらの糖類にごく少量のNHDCを添加したところ、弱いながらも甘味受容体安定発現細胞の細胞応答が確認できた。したがって、弱い甘みを持つ甘味料についてもスクロース、グルコース同様に、NHDCによる甘味の増強が確認された。この結果より、従来評価できなかったその他の低甘味料も、甘味増強剤を用いて細胞応答を増強することにより、その甘味強度を間接的に評価可能になることが推測される。

taste receptor, sweet enhancer, oligosaccharide

講演番号：3F45p13
講演日時、会場：3 月 28 日 16:32～ F 校舎 45 会場

ルシフェラーゼレポーターアッセイを用いた味覚受容体評価系の構築

Constitution of a taste receptor evaluation system using a luciferase reporter assay.

○鈴川 縁、三坂 巧（東大院農生科・応生化）
○Yukari SUZUKAWA, Takumi MISAKA (Dept. Appl. Biol. Chem., the Univ. Tokyo)

【背景】近年、旨味・甘味・苦味など基本味の受容を担う受容体が G タンパク質共役受容体として同定され、その機能解析が盛んに行われている。その代表的な手法の一つが、味覚受容体と G タンパク質を培養細胞に共発現させ、味覚受容体から生じる細胞内シグナルを細胞応答を介して評価する手法である。特に Gq 系キメラ G タンパク質を用いると、味物質に対する味覚受容体の活性化により、細胞内 Ca^{2+}イオンの濃度変化が生じる。これを Ca^{2+}感受性蛍光色素や Ca^{2+}依存性発光タンパク質を用いて測定する手法が汎用されている。この実験法はリガンドによる刺激直後に、リガンドの共存下で蛍光強度変化または発光を検出するため、自家吸光・自家蛍光・濁りを持つ物質の評価は困難である。しかし食品成分中には多くの物質及び呈味物質が共存しており、測定可能なリガンドの範囲を広げるような測定手法の開発が必要だと考えられた。そこで新たにレポーターアッセイ法を試行することを考えた。レポーター遺伝子としてルシフェラーゼを利用する本手法では、刺激に用いる成分を洗浄した後に活性測定を行うため、旧来の方法では測定できないような食品サンプルの評価が可能になると考えられる。
【方法】レポーター遺伝子として G タンパク質の活性化を検出できる市販の各種コンストラクトを用いた。培養細胞に味覚受容体、G タンパク質、レポーター遺伝子を一過的に発現させ、6 時間のリガンド処理を行った。細胞外液を洗浄後、細胞溶解液を用いて細胞を溶解し、細胞内に蓄積されたルシフェラーゼ酵素量をルミノメーターを用いて測定した。
【結果】
様々の条件検討の結果、キメラ G タンパク質を用いた Gq 系のシグナル、または Ggust を含む Gi 系のシグナルを介し、いくつかの味覚受容体の活性をレポーターアッセイにて測定する系を構築できた。本測定系は、リガンドの自家吸光・自家蛍光・濁りに関わらず評価が行える点で、従来の Ca^{2+}感受性蛍光色素を用いた測定では不可能であったサンプルも評価しうるという特徴を有する。従って味覚受容体の機能解析において有用な手段の一つになることが期待される。

taste receptor, reporter assay, luciferase

講演番号：3F45p14
講演日時、会場：3 月 28 日 16:43～ F 校舎 45 会場

pH 低下を伴う蛍光イメージングにおける局所 pH センサーの開発

Development of a spatially defined pH detection around cultured cells in fluorescent imaging analysis

○三島 誠、吉本 靖東、三坂 巧（東大院農生科・応生化）
○Makoto MISHIMA, Joto YOSHIMOTO, Takumi MISAKA (Dept. Appl. Biol. Chem., The Univ. Tokyo)

【目的】真核生物の細胞にとって、pH は非常に大切な環境要因の一つであり、細胞内外の pH 変化は細胞に対して様々な影響を及ぼすことが知られている。一般に生体内では細胞周辺は間質液に覆われているため細胞外の pH は 7 付近に保たれていることが多いが、口腔内や消化管などの上皮細胞では、摂食物や消化液などにより細胞外の pH が大きく変化することがある。味覚受容体をはじめとしたタンパク質の機能を研究する手法の一つとして、候補タンパク質を発現させた培養細胞に蛍光色素を用いた蛍光イメージングが挙げられる。蛍光イメージングで細胞外 pH を変化させた際、培養細胞周辺の局所 pH 変化をモニターすることが出来れば、周辺 pH とタンパク質の詳細な機能解析が可能となる。しかしながら培養細胞の直径は数十μm 程度であり、細胞外の局所 pH をモニターするためには、従来用いられているガラス電極や素子では大きくて正確に測定できないという問題がある。そこで本研究では、培養細胞そのものを用いて細胞外の局所的な pH を測定する系を構築すべく、検討を行った。
【方法】EGFP は緑色蛍光タンパク質であり、pH 低下に伴い蛍光強度が減少することが知られている。EGFP を培養細胞の細胞質に発現させ、細胞内の EGFP 蛍光強度を測定することで細胞外の pH 変化をモニター可能かどうか検証した。細胞内部は細胞膜で保護されているため、細胞外の pH が大きく変化したとしても、細胞内はそれと同等までには変化しない。しかしながら、酢酸のような疎水性の高い有機酸は細胞膜を透過しやすく、従って細胞外に投与しても速やかに細胞内酸性化を引き起こすことが知られている。そこで、このような投与条件において EGFP が pH センサーとして機能し得るか検討するため、酢酸により細胞外 pH を低下させた際の蛍光強度変化をプレートリーダーあるいは蛍光顕微鏡下で測定した。
【結果】酢酸を用いて細胞外 pH を低下させた際、細胞外 pH 依存的な EGFP 蛍光強度の減少が観測された。このときの EGFP 蛍光強度と細胞外 pH には高い相関が見られ、EGFP 蛍光強度変化から細胞外 pH を算出する近似式が得られた。このことから、酢酸刺激による細胞内の EGFP 蛍光強度変化により細胞外局所の pH 低下の検出が可能であることが示唆された。今後は、本研究で作製した EGFP 安定発現細胞を用いて、カルシウムイメージングで実際に細胞外の局所的な pH を測定するとともに、塩酸やクエン酸といった細胞膜透過性の低い酸に対する感度を向上させるような検討を行う予定である。

fluorescent imaging, EGFP, pH

講演番号：3F45p15
講演日時、会場：3 月 28 日 16:54～ F 校舎 45 会場

メダカ味覚受容体の転写制御配列の取得
Identification of the transcriptional regulatory region of a taste receptor in medaka fish
○横井 京子、三坂 巧、岡田 晋治（東大院農生科・応生化）
○Kyoko YOKOI, Takumi MISAKA, Shinji OKADA (Dept. Appl. Biol. Chem., The Univ. Tokyo)

【背景・目的】
食品中に含まれる味物質は、口腔や咽頭などの上皮層に存在する味蕾という器官で受容される。味情報は味蕾に投射する味神経を介し、中枢へと伝達され、味として認識される。われわれが感じる５つの基本味（甘味、旨味、苦味、酸味、塩味）は、味蕾では別々の細胞（味細胞）集団で受容することが知られているが、その味情報が味神経から中枢までどのように伝達され、中枢で認識されているかについては未だ明らかになっていない。このような味の受容・伝達・認識システムを研究する上で、特定の味細胞種において外来遺伝子の発現を誘導できる転写制御配列は、非常に有用な解析ツールとなり得る。われわれの研究グループでは、小型魚類の一種であるメダカを脊椎動物の味覚研究のモデルとして解析を行ってきたが、これまでに、味蕾に発現するエフェクター分子であるメダカホスホリパーゼ Cβ2(mfplcb2)遺伝子上流 1.6kbp の配列や味覚受容体 T1R ファミリーのうち旨味(アミノ酸)受容体サブユニットの構成分子であるメダカ T1R1(mfT1R1)遺伝子の上流 3.0kbp の配列が転写制御配列として機能することを示してきた。しかし、メダカ味細胞のうち利用可能な転写制御配列は他に報告がないのが現状である。そこで、本研究においてわれわれは新たな味細胞種特異的に機能する転写制御配列を取得することを目的とした。

【方法・結果】
メダカ味覚受容体遺伝子の１つの上流配列を転写制御配列候補とし、メダカゲノム DNA を鋳型とした PCR によって配列を取得した。転写制御活性を調べるため、取得した配列の下流にレポーター（EGFP）を接続したコンストラクトを作製し、メダカ受精卵に微量注入してトランスジェニック(Tg)メダカを作出した。得られた Tg メダカの稚魚で EGFP 蛍光を口唇や鰓耙の味蕾存在部位において観察し、蛍光が観察された Tg メダカを野生型メダカと交配し系統化を行っている。今後、系統化した Tg メダカにおいて、内在味覚受容体分子と発現誘導された EGFP との発現相関を詳細に解析するため、薄切切片における蛍光二重 *in situ* ハイブリダイゼーションを行い、内在味覚受容体分子の mRNA が存在する細胞のうち 発現誘導された EGFP mRNA が共存する細胞の割合を示すことで、取得した配列が転写制御配列として機能するかどうかを判断する予定である。

medaka fish, transcriptional regulator, taste receptor

講演番号：3F45p16
講演日時、会場：3 月 28 日 17:15～ F 校舎 45 会場

アスタキサンチン含有鶏卵摂取による高血圧抑制に関する研究

Antihypertensive effects of astaxanthin enriched-egg in SHR rats

○原田 巧[1]、堀内 達也[2]、望月 厚哉[2]、山里 明弘[2]、近藤 康博[1]、畑生 俊光[1]（[1]岡山大学、[2]ケイアイ化成）
○ Takumi HARADA[1], Tatsuya HORIUCHI[2], Atsuya MOCHIZUKI[2], Akihiro YAMASATO[2], Yasuhiro KONDO[1], Toshimitsu HATABU[1] ([1]Okayama Univ., [2]K.I chemical industry co. ltd.)

【目的】アスタキサンチン（ASX）は抗酸化力を有するカロテノイドで、高血圧抑制作用や動脈硬化抑制作用など様々な生理活性を有することが知られている。ファフィア酵母は ASX を豊富に含有する酵母であり、卵黄の色揚げ材料として利用されている。本研究では、ファフィア酵母を産卵鶏に与え、ASX 入り鶏卵を作出し、その卵黄摂取による高血圧抑制効果ならびにその作用機構を検討することを目的とした。

【方法】供試動物は、高血圧自然発症ラット（SHR）雄 7 週齢を 1 群 4 頭使用した。ASX 含有試験飼料は、ASX 含有鶏卵（58.2 μg ASX/g 卵黄）の乾燥粉末を用いて、0.01 mg ASX/g（高濃度投与群）、0.006 mg ASX/g（中濃度投与群）0.002 mg ASX/g（低濃度投与群）、0 mg/g（コントロール群）の割合で調整し、20g/日/ラット 、7 週齢から 22 週齢の 15 週間給餌した。テールカフ法により収縮期血圧、拡張期血圧、平均血圧を投与期間中 1 週間毎に測定した。飼料投与終了後、ラットから摘出した胸部大動脈を用いて、カルバコールによる血管弛緩反応を測定した。また、胸部大動脈のパラフィン切片を作製し、エラスチカ・ワンギーソン染色を行ったのちに血管内腔のサイズおよび血管壁の弾性繊維の構造等を観察した。

【結果】高濃度投与群、中濃度投与群では、コントロール群に対して飼料投与 11 週（18 週齢）ごろまで収縮期血圧、拡張期血圧、平均血圧の全てが有意に低下したが、その後は 22 週齢まで投与群間の血圧の差は認められなかった。低濃度投与群とコントロール群間の血圧の差は試験期間を通じて認められなかった。血管張力測定試験の結果、高濃度投与群と中濃度投与群ではカルバコールに対する弛緩反応の有意な増強が認められた。胸部大動脈の組織観察では内腔のサイズ、血管壁の弾性繊維の様態共に投与群間の違いは認められなかった。以上の結果から、ASX 含有鶏卵黄摂取による高血圧抑制作用が認められ、高血圧抑制作用に関する最少有効量は 0.002 から 0.006 mg ASX/g 飼料の間であることが推測された。

Astaxanthin, SHR rat, Yolk

講演番号：3F45p17
講演日時、会場：3 月 28 日 17:26～ F 校舎 45 会場

高血圧自然発症ラットを用いた無塩みそ風調味料の有効性の検討

Evaluation of the effectiveness of the salt-free miso-like seasoning with the SHR rat

○中原 達雄[1]、川野 隆史[2]、加藤 範久[3]（[1]丸善製薬株式会社、[2]株式会社ますやみそ、[3]広島大院生物圏科学）
○ Tatsuo NAKAHARA[1], Takashi KAWANO[2], Norihisa KATO[3] ([1]Maruzen pharmaceuticals Co.,Ltd, [2]Masuyamiso Co.,Ltd., [3]Hiroshima Univ.)

【目的】昨年度本大会において我々は、圧力酵素分解装置を用いて、食塩を用いない「味噌」、いわゆる「無塩みそ風調味料」の開発を通常の味噌製造より短期間で行うことに成功したことを報告した[1)]。これまで「味噌」の有効性試験は、*in vitro* 及び臨床試験が中心であったが、これは「味噌」は食塩を含有するため、*in vivo* での試験は実施しにくいことが要因であった。本研究では、「無塩みそ風調味料」を使用し、高血圧自然発症ラットを用いた血圧降下、血糖値抑制、脂質代謝に関しての有効性試験を行うことを目的とした。
【方法】11 週令高血圧自然発症雄性ラット（SHR/Izm）に高脂肪食飼料（コントロール群）、10%無塩みそ風調味料を含む高脂肪食飼料（無塩みそ群）を与え、11 週間飼育した。血圧については各週で測定をした。また、最終週に糖負荷試験、最終日に血中総コレステロール、トリグリセライド、GOT、GPT の測定、各器官重量の測定を行った。
【結果】コントロール群と無塩みそ群において体重増加に変化は認められなかった。しかし、コントロール群と無塩みそ群を比較して、無塩みそ群では血圧の上昇抑制作用が認められた。また、盲腸重量の増加が認められた。その他の結果については大きな差は認められなかった。
これらの結果から、「無塩みそ風調味料」は血圧降下作用に有効であることが示された。また、「無塩みそ風調味料」は腸内環境に何らかの影響を及ぼしていることが示唆された。

１）　2014 年度　日本農芸化学会　講演番号 3B02p20

miso, hypertension, Pressure Enzyme Decomposing Device

講演番号：3F45p18
講演日時、会場：3 月 28 日 17:37～ F 校舎 45 会場

血圧降下作用を有する新規糠漬けの開発

A new type of pickles that reduce the blood pressure of spontaneously hypertensive rats

○小田 耕平[1]、永井 武[2]、上野 義栄[3]、森 義治[4]（[1]京工繊、[2]日本食品分析センター、[3]京都府中小企業技術センター、[4](株）もり）
○Kohei ODA[1], Takeshi NAGAI[2], Yoshie UENO[3], Yoshiharu MORI[4] ([1]Kyoto Inst. of Technol., [2]Japan Food Research Lab., [3]Kyoto Prefecture Technology Center for Small and Medium Enterprises, [4]Mori Co., Ltd.)

「目的」漬物は、日本食文化の一端を担う重要な食品の一つである。しかし、日本全体の漬物販売総額は、年々減少の途にある。その一因は、消費者が食塩含量の高い漬物を食すと血圧が高くなると心配することにあると思われる。この問題を解決すべく、糠漬けを対象に、血圧降下作用のあるＧＡＢＡとＡＣＥ阻害ペプチドの付与を試みた。
「材料と方法」新規糠床は、米糠と白味噌を混合して作製し、５５℃２４時間熟成処理後使用した。京野菜を含む７種類の野菜発酵は、１０℃１週間行った。ＧＡＢＡ量の測定はＨＰＬＣ法で、ＡＣＥ阻害活性はＡＣＥ　Ｋｉｔ－ＷＳＴを使用して行った。ＡＣＥ阻害活性は、血圧降下治療薬、カプトプリル換算とした。動物実験には、自然発症高血圧ラット(SHR/Izm-type)と食塩感受性モデルラット(DIS/Eis-type)の２種類を使用した。試料の投与は、短期強制投与(1 日、２g/kg body weight)と自由摂取長期投与(1 か月)で行った。これら動物実験は、日本食品分析センターに依頼した。
「結果」各種野菜の糠漬けを対象に２年間にわたってＧＡＢＡ量を測定した結果、約 0.2%程度のＧＡＢＡを含んでいることを発見した。これをヒントにＡＣＥ阻害ペプチドを含む白味噌を米糠に混合した新規糠床を開発した。この新規糠床を使用し、京野菜を含む７種類の野菜の糠漬けを作製し検討した。それらの風味、色、味は、通常の糠漬けに比べ良く、特にキュウリは、1 週間の発酵後でも、元の緑色を保持していた。高血圧自然発症ラットへの短期投与では、テストした７種類全ての糠漬けで血圧が一時的に低下した。特に、大根($p<0.05$)、鹿ケ谷カボチャ（$p<0.01$）、キュウリ（$p<0.01$）、聖護院大根（$p<0.01$）、金時ニンジン（$p<0.01$）で、有意な血圧降下が見られた。また、大根と聖護院大根を用いた長期投与で、いずれの糠漬けに於いても有意な血圧降下（$p<0.01$）が観察された。更に、食塩感受性モデルラットを対象にした長期投与(大根)でも、有意な血圧降下（$p<0.01$）を観察することが出来た。
「結論」新規開発した糠漬けは、食塩(１０－１５%)を含むにもかかわらず、上記２種類のラットの血圧を上げることなく、むしろ逆に降下させる作用のあることが判明した。今後ヒトを対象とした検討が期待される。

gamma-aminobutyric acid (GABA), angiotensin-converting enzyme (ACE)-inhibitory peptides, pickles

講演番号：3F45p19
講演日時、会場：3 月 28 日 17:48～ F 校舎 45 会場

Processed soymilk significantly reduced blood pressure in spontaneously hypertensive rats compared to regular soymilk.

○ Alauddin Md[1], Hitoshi Shirakawa[1], Kazuyuki Hiwatashi[2], Atsushi Shimakage[3], Saori Takahashi[2], Mamoru Shinbo[3], Michio Komai[1] ([1]Laboratory of Nutrition, Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University, [2]Akita Research Institute of Food and Brewing, [3]Yamada Foods Co., Ltd.)

Processed soymilk was produced from regular soymilk by treatment with commercially available proteinase (PROTIN SD NY10) to generate inhibitory peptides against angiotensin I-converting enzyme (ACE) and was investigated for its hypotensive effect on spontaneously hypertensive rats (SHR). Single and chronic oral administration of processed soymilk at a dose of 0.0167, 0.167 and 0.583 ml/kg body weight and 2 ml/kg body weight non-processed soymilk as control was conducted using animal model hypertension 10 weeks old male SHR. Single oral administration of processed soymilk significantly reduced systolic blood pressure at a dose of 0.167 and 0.583 ml/kg body weight compared to regular soymilk. Chronic administration (3 weeks) of processed soymilk reducing both systolic and diastolic blood pressure elevation at same doses in SHR. After chronic administration**,** inhibitory activity of ACE in serum was found significantly higher compared to regular soymilk. Serum angiotensin II (vasoconstrictor) level was found significantly lower compared to regular soymilk. Furthermore, serum and liver lipid profile was found almost similar to regular soymilk. In conclusion, processed soymilk ingestion may have high blood pressure lowering effect and ameliorate cardiovascular diseases related to hypertension.

processed soymilk, angiotensin I converting enzyme, angiotensin II

講演番号：3F45p20
講演日時、会場：3 月 28 日 17:59～ F 校舎 45 会場

茶葉タンパク質分解物の血圧降下作用

Antihypertensive effect of tea leaf protein hydrolysate

武田 和哉、小林 泰次、鳥田 祥子、後藤 慶一、○南条 文雄（三井農林株式会社）
Kazuya Takeda, Hirotsugu Kobayashi, Shoko Torita, Keiichi Goto, ○Fumio Nanjo (Mitsui Norin Co.,Ltd.)

【目的】茶葉には約 30%ものタンパク質が含まれているが、そのほとんどが不溶性のタンパク質であり、茶を抽出した後も茶殻に残留したまま廃棄されている。本研究では、茶殻の有効利用を目的として、茶葉タンパク質をプロテアーゼ処理した分解物を調製し、血圧上昇作用を有するアンジオテンシンⅠ変換酵素(ACE)の阻害活性、および動物を用いた in vivo での血圧降下作用について調べた。さらに、主要な活性成分の特定を試みた。
【方法および結果】茶葉からアルカリ処理により抽出した粗タンパクを、各種プロテアーゼを用いて酵素処理し、分解物を調製した。得られた茶葉タンパク質分解物について以下の方法で ACE 阻害活性を調べた。基質として Bz-Gly-His-Leu を含む HEPES 緩衝液(pH8.3)に各茶葉タンパク質分解物を添加し、ACE を加えて 30 分間 37℃でインキュベーションを行った。遊離した Bz-Gly を Capcell Pak MG Ⅱを用いた HPLC により測定し、各茶葉タンパク質分解物の ACE 阻害率を算出した。各種プロテアーゼで処理した茶葉タンパク質分解物の ACE 阻害活性を測定した結果、サモアーゼおよびスミチームによる 2 段階での酵素処理を行った茶葉タンパク質分解物で高い ACE 阻害活性が確認された。次に ACE 阻害活性の高かった茶葉タンパク質分解物について、Spontaneously hypertensive rat(SHR) を用いて血圧降下作用を確認した。試験動物は 13～14 週齢雄性 SHR を使用し、コントロールとして生理食塩水を投与した群と茶葉タンパク質分解物を投与した群で試験した。安静時の血圧を測定した後に、被験物質（2.5mg/kg BW）を投与し、投与後 2、4、6 時間の血圧を測定した結果、コントロール群と比較して各測定時間で有意な血圧降下作用を有することが観察された。さらに血圧降下作用に関与する物質の特定を試みた。茶葉タンパク質分解物の水溶性画分を Sephadex G-15 を用いたゲルろ過により分画し、各画分について ACE 阻害活性を調べた。活性の高かったゲルろ過画分をさらに HP20 により処理し、非吸着画分を SunFine™ PrepC18 OBD™ を用いた分取 HPLC に供し、活性物質の精製を行った。NMR、LC/MS/MS 分析を行った結果、ACE 阻害活性を示した物質は Ile-Tyr, Val-Tyr, Ala-Trp, Val-Trp であることが明らかになった。
【結論】本研究で調製した茶葉タンパク質分解物は、血圧降下作用を有することが示されたが、同定できた活性成分はすべて既知成分であった。しかし、本分解物は血圧降下作用を示すことから機能性食品素材として利用できる。

tea, antihypertensive effect, protein hydrolysate

講演番号：3G41a01
講演日時、会場：3 月 28 日 09:00～ G 校舎 41 会場

オリーブ果実に含まれるマスリン酸摂取によるロコモティブシンドローム（軽度膝関節炎）軽減効果
The effect of oral administration of an olive fruit extract in subjects with mild knee joint pain

○福光 聡、間 和彦、栗本 洋一（日本製粉中研）
○Satoshi FUKUMITSU, Kazuhiko AIDA, Youichi KURIMOTO (Nippon Flour Mills Co., Ltd.)

【目的】
現在、日本は超高齢社会に突入しており、関節炎を含めたロコモティブシンドロームの推定患者数は約 4700 万人と言われ、年々、関節対応市場は増加している。また、私達は香川県小豆島の国産オリーブ果実に含まれる、マスリン酸というトリテルペン類に着目し、動物細胞や関節炎惹起マウスにより抗炎症効果や作用メカニズムを解明してきた。そこで、軽度関節炎の人を対象に、オリーブ果実エキス（OFE）を摂取することによる痛みや QOL に及ぼす影響を検討した。
【方法】
無作為化二重盲検並行群間比較試験で、医師の問診で軽度変形性膝関節症と診断され、かつ治療を必要としない人を計 20 名（OFE 摂取群 12 名 vs コントロール摂取群 8 名）選定した。1 日当たりオリーブ果実エキス 500 mg（マスリン酸 50 mg）含有サプリメント（OFE）を 12 週間毎日朝食前に摂取させた。主要評価項目として、痛みの度合い（VAS）、QOL（生活の質）の調査（SF-8）を試験開始前（0 週）、8 週、試験終了時（12 週）で行い、副次評価項目として、0 週、12 週で血中骨代謝マーカーや炎症の程度を測定した。
【結果】
OFE を 12 週間摂取することで VAS、身体的 QOL が摂取前後で有意に改善した。OFE 摂取群とコントロール摂取群の間で有意差は認められなかったが、OFE 摂取群でより改善効果が顕著であった（OFE 摂取群 vs コントロール群, VAS；**p=0.00002 vs **p=0.002, SF-8；**p=0.0005 vs *p= 0.014）。また、PIIANP 値（軟骨合成マーカー）について、OFE 摂取群とコントロール摂取群で摂取前後、群間ともに有意差は認められなかったが、OFE 摂取群で平均値が上昇したのに対して、コントロール摂取群では平均値が低下した（OFE vs コントロール；106% vs 99.6%）。また、hsCRP 値（炎症マーカー）についても OFE 摂取群で平均値が低下したのに対して、コントロール群では平均値の上昇傾向が認められた（OFE vs コントロール；85.2%% vs 113%）。さらに、OFE 摂取群で体重、BMI が摂取前後で有意に低下することが明らかになった。以上の結果から、オリーブ果実エキス摂取により体重減少や関節における骨合成能の改善や炎症が抑制される可能性が示され、その結果、痛みや身体的 QOL を改善したことが考えられた。

Maslinic acid, Olive, knee joint pain

講演番号：3G41a02
講演日時、会場：3 月 28 日 09:11～ G 校舎 41 会場

大麦若葉末の性状の違いによる整腸作用に及ぼす影響の比較

Comparison of the influence of particle size of Young Barley Leaf powder on mice intestinal function

○北村 整一、佐藤 敬、上野 栞、森川 琢海、友澤 寛、山口 和也、高垣 欣也（株式会社東洋新薬）
○ SEIICHI KITAMURA, KEI SATO, SHIORI UENO, TAKUMI MORIKAWA, HIROSHI TOMOZAWA, KAZUYA YAMAGUCHI, KINYA TAKAGAKI (TOYO SHINYAU CO.,LTD.)

【目的】近年青汁の市場は拡大し大麦若葉、ケール等をはじめとした多くの青汁素材が流通している。それに伴い各々の素材が持つ機能性に着目し他素材との比較をした例がしばしば見受けられるが、素材の加工時における性状に着目した機能性比較の例は少ない。我々はこれまでに青汁素材の微粉砕製法を確立し、大麦若葉末に関しては整腸作用、血中コレステロール低下作用、血糖値上昇抑制作用など様々な機能性を報告してきた。本研究では大麦若葉末の粉砕加工時の粒度の違いに着目し、その違いがマウスの整腸作用に及ぼす影響を比較することを目的とした。
【方法】粒度の異なる 4 種類の大麦若葉末を混餌し 5 週齢雄性 ICR マウスに 14 日間摂取させた。摂取期間中糞便を回収し湿糞便重量、乾燥糞便重量を測定し、摂取期間終了時の糞便中 IgA 量を測定した。また摂取期間終了後解剖し、盲腸重量、盲腸内容物 pH を測定した。
【結果】大麦若葉末は粒度の違いに関わらず摂取 2 日目以降で湿糞便重量、乾燥糞便重量を増加させた。摂取後 14 日目では最も粒度の粗い粉末を混餌した群と最も粒度の細かい粉末を混餌した群の糞便重量の増加が大きかった。盲腸重量は各大麦若葉末の混餌により増加し、盲腸内容物の pH は低下した。糞便中の IgA を測定した結果、最も粒度の粗い粉末を摂取した場合には IgA 量の増加はみられなかったが、その他の群で IgA 量が増加した。
【考察】大麦若葉末は粒度の違いによらず糞便重量を増加させることが分かり、摂取からの経過時間が長いほど粒度の小さい群と最も粒度の粗い粉末を混餌した群で糞便重量が増加していた。しかしながら糞便中の IgA 量では粒度による差が見られたため、微粉砕製法の大麦若葉末には整腸作用に加えて腸管免疫機能を亢進させる作用があり、一方で粒度が粗い場合では腸管免疫機能には影響を与えないことが示唆された。

intestinal function, Young Barley Leaf, IgA

講演番号：3G41a03
講演日時、会場：3 月 28 日 09:22～ G 校舎 41 会場

褐藻サガラメ由来フロロタンニンによる抗アレルギー性の免疫調節作用
The anti-allergic and immunomodulating effects of phlorotannins from *Eisenia arborea*, a brown alga
○杉浦 義正、野元 つかさ、布施 美保子、百合野 瑛子、宮田 昌明（水大校 食品科学）
○Yoshimasa SUGIURA, Tsukasa NOMOTO, Mihoko FUSE, Eiko YURINO, Masaaki MIYATA (Natl. Fish. Univ.)

【目的】褐藻サガラメは「刻みアラメ」等の原料として三重県伊勢・志摩地区で古来より食品利用されている。これまでに、in vitro 試験でサガラメ由来の海藻ポリフェノール（フロロタンニン）が抗アレルギー成分であることを明らかにした [1, 2]。本研究では、フロロタンニンの動物個体における、免疫調節による抗アレルギー作用の機序を調べた。
【方法】雌性 BALB/c マウス（4 週齢）を陰性対照群、陽性対照群および試験群に区分けした（各群 n = 6）。試験群には、サガラメからクロロフォルム／メタノール抽出して調製したフロロタンニン濃縮物を 21 日間経口投与（0.9 mg および 4.5 mg/day/body）し、各群とも 22 日目に全採血して血清と脾臓を得た。また、経口投与開始 7 日目と 14 日目に、陽性対照群および試験群に卵白アルブミン（OVA）を腹腔内投与して免疫負荷した。各群の血清中の抗体量（IgG1, IgE, IgG2a）を ELISA 法により測定し、脾臓中のサイトカイン mRNA レベル（IL-4, IFN-γ）をリアルタイム PCR 法で計測した。
【結果】①OVA 特異的抗体量 : BALB/c マウス血清中の Th2 型細胞活性化に起因する OVA 特異的 IgE 量は試験群（4.5 mg 投与群）では陽性対照群に比べて、有意に低下した。一方、OVA 特異的 IgG1 量は、陽性対照群と試験群で有意差はみられなかった。Th1 型細胞活性化に起因する OVA 特異的 IgG2a 量は、試験群（0.9 mg および 4.5 mg 投与群）では陽性対照群に比べて低下傾向であった。②総抗体量 : IgG1 および IgE レベルについては、陽性対照群に対して 0.9 mg 投与群は低下傾向であり、4.5 mg 投与群で有意に低下した。また、IgG2a レベルは試験群間で有意差は認められなかった。③脾臓 mRNA レベル : IL-4 および IFN-γ mRNA レベルは試験群（0.9 mg および 4.5 mg 投与群）では陽性対照群に比べて有意な低下が認められた。
【考察】フロロタンニン濃縮物を投与した試験群は、血清中の抗体量、脾臓サイトカイン mRNA レベル何れも、総じて低下する傾向を示した。このことから、フロロタンニンは一様な Th1/Th2 バランス改善による作用ではなく、免疫制御系（Treg 細胞など）によるアレルギー応答抑制を示す可能性が示唆された。現在、脾臓リンパ球を調製し、脾臓中のサイトカインレベルを ELISA 法にて検討中である。

1) Sugiura Y, et al., *Food Sci. Technol. Res.*, **13**, 54-60 (2007). 2) Sugiura Y, et al., *J. Funct. Foods*, **1**, 387-393 (2009).

phlorotannin, anti-allergic, immunomodulating

講演番号：3G41a04
講演日時、会場：3 月 28 日 09:33～ G 校舎 41 会場

接触過敏症抑制効果に与えるザクロポリフェノール濃縮物の投与量の影響

Inhibitory effect of pomegranate polyphenol concentrate on dinitorofluorobenzene-induced contact hypersensitivity in mice

○長野 隆男[1]、烏 烏日娜[1]、西田 典永[2] ([1]川崎医福大臨床栄養、[2]森下仁丹)
○Takao Nagano[1], Wurina Wu[1], Norihisa Nishida[2] ([1]Kawasaki Univ. Med. Welfare, [2]Morishita Jintan Co.)

【目的】マウスを用いた接触過敏症(CHS)モデル動物実験系は，ヒトでの接触性皮膚炎のよいモデル動物実験系と考えられている。我々は，このモデル動物実験系を用いてザクロポリフェノール濃縮物(PPC)に CHS 抑制効果があることを見出した。しかし，その実験でマウスが摂取したと推定される PPC 量はヒトで 10g/日に相当し，投与量が多いと考えた。そこで、ヒトで 0.5g/日に相当する PPC 量で CHS 抑制効果について検討をおこなった。
【方法】6 週齢雌 BALB/c マウスを用い，dinitrofluorobenzene (DNFB)非感作群（n=3），DNFB 感作群（n=6），0.01%PPC 摂取群（n=6），0.2%PPC 摂取群（n=6）の 4 群でおこなった。なお，PPC 摂取群では、PPC 水溶液を水の代わりに摂取させ，その投与は 1 回目 DNFB チャレンジをおこなう 3 週間前から開始した。まず，実験 0 日目と 1 日目にマウスの腹部に 0.5% DNFB で感作をおこなった。実験 5 日目と 12 日目に 0.15%DNFB を耳介部分にチャレンジした。耳介の腫れは，チャレンジ前とその 24 時間後に耳介部分の厚みをマイクロメータで測定し，その差として求めた。耳介を実験 13 日目に採取をおこない，組織化学的観察と遺伝子発現解析をおこなった。組織化学的観察は，HE 染色と免疫組織化学(IHC)染色をおこない，IHC 染色には抗 Ly-6G 抗体を使用して、耳介組織に浸潤した細胞の染色をおこなった。遺伝子発現解析は，DNA マイクロアレイとリアルタイム PCR を用いておこなった。
【結果】2 回目に DNFB チャレンジした 24 時間後に CHS 反応による耳介の腫れの増加が観察され，0.01%と 0.2%PPC 摂取群で耳介の腫れに有意な抑制効果が認められた。HE 染色した耳介組織の観察をおこなったところ，0.01%と 0.2%PPC 摂取群で耳介組織の腫れが抑制されていた。IHC 染色された細胞の数をカウントしたところ，0.01%と 0.2%PPC 摂取群で有意な細胞数の低下がみられた。DNA マイクロアレイによる解析結果から，0.2%PPC 摂取群でケモカイン *Cxcl3*，*Cxcl2*，*Ccl3* と炎症性サイトカイン *Ifng*，*Il1b* の遺伝子発現抑制が示唆された。さらに，リアルタイム PCR による解析から，0.01%と 0.2%PPC 摂取群で *Cxcl3* と *Cxcl2* が有意に発現抑制されていることが示された。以上の結果から、ヒトで 0.5g/日に相当する PPC 量で CHS 抑制効果が確認された。PPC の CHS 抑制効果のメカニズムとして，好中球の遊走に関与している CXCL2 と CXCL3 の発現が耳介で抑制されることが考えられた。現在、ELISA を用いて CXCL2 の定量をおこない，タンパク質レベルでの抑制効果について検討をおこなっている。

contact hypersensitivity, pomegranate, polyphenol

講演番号：3G41a05
講演日時、会場：3 月 28 日 09:44～ G 校舎 41 会場

マウス NK 活性低下モデルにおける各種食品成分の効果

Effects of various food constituents in mouse model of reduced natural killer cell activity

○山澤 拓実、緒里 真一、守住 孝輔、片山 誠一、西 勝英（株式会社ＬＳＩメディエンス　創薬支援事業本部　試験研究センター　薬理研究部）
○Takumi Yamazawa, Shinichi Ozato, Kousuke Morizumi, Seiichi Katayama, Katsuhide Nishi (LSI Medience Corporation Drug Development Service Segment Nonclinical Research Center Pharmacology Department)

NK 細胞は自然免疫に寄与するリンパ球の一種であり，ウイルス感染防御やアレルギーの応答などに関わる重要な因子として知られている．近年，食品素材を用いて体内の NK 細胞の活性を高めることで，免疫力の向上に繋げることが考えられており，NK 細胞の活性を動物実験で評価する必要性が高まっている．このような背景から，我々はこれまで水浸ストレス負荷によるNK活性低下マウスモデルとフローサイトメーターを組み合わせたNK活性測定法を確立した．そこで本研究では，免疫増強効果が期待される食品化合物を4週間投与し，NK 活性増強が評価できるか検証した．

5 週齢の C57BL/6J 雄マウスに，各種食品成分（海藻，植物，乳成分，乳酸菌由来成分を含有した市販サプリメント）を 4 週間混餌投与した．解剖前 3 日より日中（8:00～20:00）の間，足先が浸る程度に水を張ったケージで 3 日間飼育して水浸ストレス負荷を与え，NK 活性を低下させた．解剖前 18 時間に poly I:C（polyinosinic-polycytidylic acid）を静脈内投与して，疑似感染状態にすることで免疫機能を活性化し，その後脾臓を採取した．採取した脾臓から脾細胞を分離後，CFSE（5-(6)-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester）染色処理を施した YAC-1 細胞（マウスリンパ腫由来細胞）と 5 時間共培養し，死細胞を 7-AAD（7-amino-actinomycin D）で染色した． その後，CFSE および 7-AAD で共染色された細胞（YAC-1 死細胞）の割合をフローサイトメーターで測定し，NK 活性とした．その結果，非ストレス負荷群に対して非投与／ストレス負荷群の NK 活性は約 20%低値を示した．また各種食品成分投与／ストレス負荷群では，非投与／ストレス負荷群に対して NK 活性は 5～15%高値を示した．

以上のことから，本研究で検証したマウス水浸ストレス負荷モデルとフローサイトメーターを組み合わせた評価法は，NK 細胞活性に関する新規化合物の薬効評価に有用な方法であると考えられる．

Natural killer cell activity, flow cytometry, stress

講演番号：3G41a06
講演日時、会場：3 月 28 日 10:05～ G 校舎 41 会場

緑茶カテキン代謝物の免疫機能調節作用

Immunomodulatory effect of microbial metabolites from green tea catechin

○楊 雪[1]、金 允喜[1]、原 彩[2]、高垣 晶子[2]、後藤 慶一[2]、立花 宏文[1,3]([1]九大院農院・生機科、[2]三井農林、[3]九大食品機能デザイン)
○ XUE YANG[1], YOONHEE KIM[1], AYA HARA[2], AKIKO TAKAGAKI[2], KEIICHI GOTO[2], HIROFUMI TACHIBANA[1,3] ([1]Department of Bioscience and Bioscience and Biotechnology, Kyushu University, [2]Food Research Laboratories, Mitsui Norin. Co., Ltd., [3]Food Functional Design Research Center, Kyushu University)

【背景及び目的】免疫機能の低下は、様々な疾患の発症リスクを高めることが知られており、免疫機能を高める食品を摂取することによる疾病予防が期待されている。緑茶カテキンを摂取することにより免疫機能に報告されているが、その関与成分ならびに作用機構には不明な点が多い。そこで本研究では、緑茶カテキンの腸内細菌代謝物が免疫調節作用に及ぼす影響を検討した。

【方法および結果】カテキン代謝物が免疫賦活作用に与える影響を検討するため、マウスの脾臓から$CD4^+$細胞を分離し、緑茶カテキン(EGCG, EGC, ECG, EC, Catechin, Catechin gallate, Gallocatechin, Gallocatechin gallate)とそれらの代謝物(28種)が$CD4^+$細胞のATPレベルに及ぼす影響について検討した。その結果、8種類の主な緑茶カテキンでは$CD4^+$細胞の活性化効果が見られなかったことに対し、13種類のカテキン代謝物が$CD4^+$細胞のATPレベルを増加させた。これらATP産生増加活性が認められた代謝物の中で、5-(3', 5'-dihydroxyphenyl)-γ-valerolactone (BM6)を用いて免疫賦活作用について検討した。8週齢雌BALB/cマウスに、EGCまたはBM6を10 mg/kg body weightとなるように毎日経口投与した。二週間の経口投与後、脾臓細胞における免疫細胞の割合、細胞増殖能、サイトカインの分泌能とナチュラルキラー細胞の細胞傷害性を測定した。その結果、BM6の経口投与により免疫細胞の割合、細胞増殖能、サイトカインの分泌能には影響を与えなかったことに対し、ナチュラルキラー細胞の細胞傷害性がコントロール群やEGC投与群と比べ増加した。

【結論】緑茶カテキンの代謝物であるBM6はナチュラルキラー細胞の細胞傷害性を増加させることで免疫調節作用を発揮する可能性が示された。

Green tea catechin, Microbial metabolites, Immunomodulation

講演番号：3G41a07
講演日時、会場：3 月 28 日 10:16～ G 校舎 41 会場

自然免疫リガンドとしての EGCG 修飾アルブミン
EGCG modified albumin as a ligand of innate immunity

○畑佐 行紀[1]、古橋 麻衣[2]、伊藤 美香[1]、近澤 未歩[1]、柴田 貴広[1]、赤川 貢[3]、田中 浩士[4]、立花 宏文[5]、内田 浩二[1]([1]名大院・生命農、[2]名大農、[3]大阪府大・生命環境科学、[4]東工大院・理工、[5]九州大院・農)
○ Yukinori HATASA[1], Mai FURUHASHI[2], Mika ITOU[1], Miho CHIKAZAWA[1], Takahiro SHIBATA[1], Mitsugu AKAGAWA[3], Hiroshi TANAKA[4], Hirofumi TACHIBANA[5], Koji UCHIDA[1] ([1]Grad. Sch. of Bioagric. Sci., Nagoya Univ., [2]Sch. of Agric., Nagoya Univ., [3]Sch. of Life and Env. Sci., Osaka Pref. Univ., [4]Grad. Sch. of Sci. and Eng., Tokyo Inst. of Tech. Univ., [5]Grad. Sch. of Agric., Kyushu Univ.)

【目的】自然抗体は B 細胞の亜群である B-1 細胞によって産生され、その多くが IgM 抗体である。自己分子を含めた複数の抗原を認識するなど高い交差反応性を有することが報告されており、生体内の様々な抗原を認識することで、生体からの異物の排除や恒常性の維持を担っていると考えられている。自然抗体による自然免疫系の適度な活性化は恒常性維持・疾病予防に寄与する。本研究では、緑茶に含まれるカテキンによる自然免疫系の活性化について検討し、血中タンパク質の大部分を占め、種々の物質の輸送タンパク質である血清アルブミンに着目し、茶カテキンと共存した際のアルブミンの自然抗体リガンドとしての新たな機能を見出したので報告する。
【方法及び結果】茶カテキンを含む 25 種の食品成分を血清アルブミンとインキュベートして作製した食品成分修飾アルブミンを固相抗原タンパク質とし、様々な系統のマウス血清や、モノクローナル IgM 自然抗体との交差性を ELISA 法により検討した結果、主要なカテキンであるエピガロカテキンガレート（EGCG）によって修飾されたアルブミンが特に自然抗体に認識されることが確認された。また、EGCG によるタンパク質の化学修飾が関わっているものと予想し、酸化及び共有結合修飾について検討した。その結果、タンパク質カルボニルについて、ヒドラジンを用いた誘導体化による検出を行ったところ、食品成分処理したアルブミンの中でも特に EGCG 修飾アルブミン中でタンパク質カルボニルの生成が進行しており、さらに LC-MS/MS による質量分析の結果、タンパク質カルボニルはアルブミン中のリジン残基に由来することが確認された。また、アジド誘導体化 EGCG（N_3 EGCG）を用いたクリックケミストリーの結果から、EGCG がアルブミンに結合していることが明らかとなったことから、EGCG のアルブミンへの結合及びそれに続く酸化修飾が抗原性付与に重要である可能性が示唆された。以上の結果から、EGCG とアルブミンの相互作用によって形成されるカルボニル化タンパク質は、IgM 自然抗体による認識に関与しており、緑茶による恒常性の維持・健康増進に寄与していると考えられる。現在、EGCG によりカルボニル化されるリジン残基の同定やマウスを用いた in vivo での検討など、より詳細なメカニズムについて研究を進めている。

Innate Immunity, EGCG, Albumin

講演番号：3G41a08
講演日時、会場：3 月 28 日 10:27～ G 校舎 41 会場

ルテオリンの炎症抑制効果に対するフラボノイド同時摂取の影響
Effect of co-administration with other flavonoids on the anti-inflammatory activity of luteolin
○山下 紗枝、橋本 堂史、藍原 祥子、水野 雅史（神戸大院・農）
○Sae YAMASHITA, Takashi HASHIMOTO, Yoshiko AIHARA, Masashi MIZUNO (Kobe Univ.)

【目的】フラボノイドは腸管吸収時、小腸上皮細胞による代謝を受けてグルクロン酸抱合体や硫酸抱合体となって吸収されるため、一般的にアグリコンでの吸収量は少ない。我々はルテオリンの *in vitro* 及び *in vivo* における腸管炎症抑制効果を明らかにしたが、ルテオリンについても摂取後の血中アグリコン量は少ないことが報告されている。一方で、ルテオリンの過剰摂取はデキストラン硫酸ナトリウム（DSS）誘導性腸炎に悪影響を及ぼすことが報告されている。また、フラボノイド類の同時摂取は単独摂取時と比較して血中代謝物濃度を変化させるという報告がある。本研究では、ルテオリンと他のフラボノイド類を同時摂取することによる、ルテオリンの吸収量及び抗炎症効果への影響を検討した。
【方法】トランズウェル上に播種した Caco-2 細胞単層膜にルテオリンと他のフラボノイドをそれぞれ 15 nmol ずつ混合した溶液を添加した。6 時間後の管腔側及び基底膜側の培地を回収し、HPLC を用いてルテオリン量を測定した。抱合体は β−グルクロニダーゼ及びスルファターゼ酵素処理により脱抱合した後、HPLC に供し測定した。Caco-2/RAW264.7 細胞共培養系に、LPS 刺激を与えることで RAW264.7 細胞から TNF-α が産生され、Caco-2 細胞中の IL-8 mRNA 発現量が増加する擬似腸管炎症モデルを用い、ルテオリンの抗炎症効果に及ぼす他のフラボノイドの影響を調べた。さらに DSS 誘導性腸炎モデルマウスを用いて *in vivo* における効果を調べた。7 週齢 C57BL/6 雌マウスを DSS 非投与群、DSS 投与群、DSS＋サンプル投与群に分けた。サンプルの経口投与開始 7 日後、3% DSS 水溶液を飲水として 7 日間自由摂取させた。その後 3 日間水に切り替えた。実験期間中の体重変化及び解剖後の結腸の長さを測定した。
【結果】ケルセチンまたはケンフェロールとの同時添加により、基底膜側へのルテオリン透過量が約 2 倍に増加した。一方、ルテオリンの抱合体量は減少していた。これらのフラボノイドは擬似腸管炎症モデルにおいて、ルテオリンの抗炎症効果を亢進させた。一方、DSS 誘導性腸炎モデルマウスにおいては、ルテオリン単独摂取(0.1 mg/day/mouse)は腸管炎症を抑制したが、ケルセチンと同時摂取させるとその効果が打ち消された。ルテオリンの過剰摂取は DSS 誘導性腸炎を悪化させるという報告があるため、ケルセチンとの同時摂取はルテオリンの吸収量を高めすぎたため、腸炎を悪化させたと考えた。現在、ルテオリンの単独摂取では効果がみられない濃度において、フラボノイド類共存下で炎症抑制効果が亢進するかどうかを検討中である。

luteolin, anti-inflammatory, Caco-2 cells

講演番号：3G41a09
講演日時、会場：3 月 28 日 10:38～ G 校舎 41 会場

植物由来食品因子エリオジクチオールによるマウス制御性 T 細胞誘導機能の解析
Analysis of mouse regulatory T-cell inducing function of eriodictyol.
○松本 優樹[1]、松田 幸[1]、古川 智宏[1]、鈴木 道生[1]、作田 庄平[1]、清水 誠[1,2]、戸塚 護[1] ([1]東大院農生科・応生化、[2]東京農大・応生・栄養)
○Yuki MATSUMOTO[1], Miyuki MATSUDA[1], Tomohiro FURUKAWA[1], Michio SUZUKI[1], Shohei SAKUDA[1], Makoto SHIMIZU[1,2], Mamoru TOTSUKA[1] ([1]Dept. Appl. Biol. Chem., The Univ. Tokyo, [2]Dept. Nutr. Sci., Tokyo Univ. Agric.)

【目的】制御性 T 細胞(Treg)は T 細胞応答を抑制し、過剰な免疫応答を調節する役割を果たしている。いくつかの食品因子は未分化な CD4+T 細胞から Treg の分化を誘導することが知られている。これまでに私たちはレモンなどに含まれるフラボノイドであるエリオジクチオールがマウス脾臓 CD4+T 細胞において、Treg 特異的転写因子である Foxp3 の発現を上昇させることを報告した。これは以前に報告したナリンゲニンより強い Foxp3 誘導活性を示すが、誘導された Treg の抑制活性やエリオジクチオールの Foxp3 発現誘導機構はいまだ不明である。そこで本研究ではエリオジクチオールで誘導した Treg の抑制活性を確認するとともに、T 細胞内のタンパク質の発現変化を網羅的に解析することにより、エリオジクチオールの Treg 誘導メカニズムの解析を試みた。
【方法】BALB/c マウス脾臓由来の CD62L+ CD4+未分化 T 細胞を、エリオジクチオールの存在下、プレートコーティングした抗 CD3 抗体、溶液中の抗 CD28 抗体および IL-2 と共に培養し、培養後の T 細胞における Foxp3 発現をフローサイトメトリーによって解析した。また、培養後の T 細胞の抑制活性を調べるため、CFSE で染色した DO11.10 マウス脾臓由来 CD4+CD25-T 細胞を、BALB/c マウス脾臓由来抗原提示細胞および抗原ペプチドとともに培養し、CD4+CD25-T 細胞の増殖の様子をフローサイトメトリーにより解析した。タンパク質の発現変化の解析については、(1)エリオジクチオールで Treg 分化誘導した T 細胞から全タンパク質を抽出し、2 次元電気泳動に供した。この泳動図を(2)TGF-β で Treg 分化誘導した T 細胞および(3)Treg 分化誘導していない対照群の T 細胞由来のタンパク質の泳動図とそれぞれ比較することで、(1)の T 細胞で特異的に発現が上昇するタンパク質の解析を行った。
【結果】エリオジクチオールで誘導された Treg は、他の CD4+T 細胞の増殖を抑制する効果を示した。また、タンパク質発現解析の結果、(1)エリオジクチオール誘導 Treg を含む T 細胞と(2) TGF-β 誘導 Treg を含む T 細胞では、(3)対照群の T 細胞と比較して、共通して発現上昇するタンパク質の存在が明らかにされた一方で、(1)の T 細胞でのみ特異的に発現上昇するタンパク質が存在することが明らかとなった。このことから、エリオジクチオールの Treg 分化誘導には、TGF-β 誘導時と共通した経路が関わっている一方で、TGF-β 誘導時とは異なる経路も関わっている可能性が考えられた。現在、(1)の T 細胞で特異的に発現が上昇したタンパク質群を MALDI-TOF/MS 解析により同定中である。

regulatory T cell, eriodictyol, proteomics

講演番号：3G41a10
講演日時、会場：3 月 28 日 10:49～ G 校舎 41 会場

フラボノイド類による制御性 B 細胞の IL-10 および IL-35 産生増強効果と形質細胞分化誘導活性との関連

Relationship between the IL-10 and IL-35 secretion of regulatory B cells induced by flavonoids and the activity of plasma cell induction

○堀内 準矢[1]、葉 鎮豪[1]、清水 誠[1,2]、戸塚 護[1]([1]東大院農生科・応生化、[2]東京農大・応生・栄養)
○JUNYA HORIUCHI[1], CHENHAO YEH[1], MAKOTO SHIMIZU[1,2], MAMORU TOTSUKA[1] ([1]Dept. Appl. Biol. Chem., The Univ. Tokyo, [2]Dept. Nutr. Sci., Tokyo Univ. Agric.)

【目的】制御性 B 細胞（Breg）は抑制性サイトカインである IL-10 を産生する B 細胞として見出され、過剰な免疫反応を抑制することで免疫系の恒常性維持を担う B 細胞である。これまでに Toll 様受容体（TLR）リガンドによって刺激した B 細胞は IL-10 を高産生する Breg へと分化することが明らかにされているが、私たちはそこへさらに食品由来フラボノイドである Kaempferol または Tamarixetin を添加すると、IL-10 産生量が濃度依存的に増加することを報告してきた。最近、Breg は抑制性サイトカインである IL-35 も産生すること、抑制性サイトカインを産生する B 細胞は形質細胞の性質を示すことが報告され、Breg と形質細胞の関係が注目されている。そこで本研究では、Kaempferol と Tamarixetin、さらにこれらと類似した活性をもつ Apigenin, Chrysin, Galangin が Breg からの IL-10 および IL-35 産生に及ぼす影響を比較し、形質細胞関連遺伝子の発現を調べることで形質細胞分化誘導効果との関連を検討した。

【方法】8 週齢の C57BL6/J マウス脾臓から B 細胞を調製し、リポ多糖（LPS, 10 μg/ml）の存在下、フラボノイド（1.25～10 μM）のいずれかを添加し、48 時間培養した。その培養上清中に含まれる IL-10 量を ELISA 法により測定した。また、フローサイトメトリーにより細胞の生存率の変化を解析した。さらに培養過程の B 細胞から RNA を経時的に回収し、IL-10 mRNA、IL-35 のサブユニットである Ebi3 および p35 の mRNA、その他形質細胞の分化に関わる遺伝子の mRNA 発現量をリアルタイム RT-PCR によって解析した。

【結果】ELISA およびフローサイトメトリー解析の結果から、Kaempferol, Tamarixetin, Apigenin, Chrysin, Galangin は細胞の生存率に影響を与えることなく Breg からの IL-10 産生量を増加させることが明らかとなった。また、Kaempferol あるいは Tamarixetin 存在下で Breg 誘導した場合には IL-10 に加えて、Ebi3 の mRNA 発現も増加したことから、IL-35 の発現も増加していることが示唆された。また、形質細胞分化に必須の転写抑制因子である Blimp-1 の mRNA 発現は 5 つのフラボノイド全てに共通して増加した。以上のことから、フラボノイドは IL-10 に加えて IL-35 の発現も増強すること、形質細胞分化を誘導する効果を有することが示唆された。

regulatory B cell

講演番号：3G41a11
講演日時、会場：3 月 28 日 11:10～ G 校舎 41 会場

Diallyl trisulfide の LPS/D-GaIN 誘導性劇症肝炎予防効果

Prevention of severe hepatitis induced by LPS/D-GaIN by diallyl trisulfide.

○日吉 滉平[2]、細野 崇[1,2]、関 泰一郎[1,2] ([1]日本大生資科、[2]日本大院生資科)
○Kohei HIYOSHI[2], Takashi HOSONO[1,2], Taiichiro SEKI[1,2] ([1]Nihon Univ., [2]Nihon Univ. Grad School)

【背景】 ガーリックは抗がん作用、抗菌作用、血小板凝集抑制作用などのさまざまな薬理効果を持つことが報告されている。また、これらの作用は、ガーリックに含まれる有機硫黄成分によるものであると考えられている。演者らはガーリック由来香気成分である diallyl trisulfide (DATS)が、がん細胞に対し、細胞分裂時に関わる紡錘糸形成タンパク質 β-チューブリンの特定の SH 基と反応して *S*-allyl 修飾して細胞分裂を抑制し、アポトーシスを誘導することなどを明らかにしてきた。炎症は、感染や外傷に対する生体の生理的な防御反応であるが、炎症状態の持続によるマクロファージの浸潤や活性化は、組織の線維化、インスリン抵抗性、がんなどの様々な疾患と関連することが知られている。これまでに我々は、炎症関連シグナルである NF-κB に着目し、DATS の抗炎症効果を RAW 264.7 細胞を用いた in vitro 実験系で明らかにした。本研究では、DATS の抗炎症効果とそのメカニズムについて、リポ多糖(LPS)と D-galactosamine(D-GaIN)共投与による劇症肝炎モデルマウスを用いて in vivo で明らかにしようとした。
【方法】 BALB/c マウス（8~10 週齢、オス）を予備飼育後、生理食塩水に溶解した LPS(50 μg /kg b.w.)と D-GaIN(700 mg/kg b.w.)、もしくは同量の生理食塩水のみを腹腔内に投与し、投与後 6 時間後までに経時的に血液と肝臓を回収した。DATS は carboxymethyl cellulose (CMC)に溶解し、LPS/D-GaIN 投与の 1 時間前に 100, 250 μmol/kg b.w.の投与量で腹腔内に投与した。対照には同量の CMC のみを投与した。血漿 ALT, AST 活性は富士ドライケムを用いて測定し、肝臓における iNOS や IkBα をはじめとした NF-κB 関連因子の発現やリン酸化は、Western blotting により検出した。
【結果】 血漿 ALT, AST 活性は LPS/D-GaIN 投与 6 時間後に最も高値を示し、顕著な肝障害の惹起が示唆された。DATS を前投与したマウスおいては、血漿 ALT, AST 活性の上昇は著しく抑制され、DATS が LPS/D-GaIN 誘導性肝障害を抑制することが示唆された。また、LPS/D-GaIN 投与 6 時間後の IκBα のリン酸化が顕著に抑制されていた。
【結論】 DATS は IkB のリン酸化を抑制することで、LPS/D-GaIN 誘導性劇症肝炎から肝臓を保護する可能性が明らかとなった。

garlic, inflammation, hepatitis

講演番号：3G41a12
講演日時、会場：3 月 28 日 11:21～ G 校舎 41 会場

米糠アラビノキシラン誘導体（MGN-3）のラットにおける急性アルコール性肝炎への影響

The effect of Arabinoxylan rice bran (MGN-3) on acute ethanol-induced liver injury in rats.

○杉田 俊祐[1]、仲村 英里[1]、朱 霞[2]、猪狩 直樹[2]、平井 静[1]、江頭 祐嘉合[1]([1]千葉大院・園芸・応生化、[2]大和薬品株式会社)
○Shunsuke SUGITA[1], Eri NAKAMURA[1], Xia ZHU[2], Naoki IGARI[2], Shizuka HIRAI[1], Yukari EGASHIRA[1] ([1]Chiba Univ., [2]Daiwa Pharmaceutical Co.ltd.)

【目的】
米糠由来アラビノキシラン誘導体（MGN-3）は、米糠の水溶性ヘミセルロースにシイタケ由来の複数の炭水化物加水分解酵素を作用させて生産される部分加水分解物である。MGN-3 には免疫賦活効果や抗がん作用が報告されている。また、本研究室において、MGN-3 の D-GalN 肝障害抑制効果が認められている。しかし、アルコール性肝炎についての効果は明らかとなっていない。そこで本研究では、アルコール性肝炎を誘発したラットを用いて、MGN-3 のアルコール性肝炎への作用を検討した。
【方法】
・実験 1
8 週齢の Wistar 系雄ラットを、Standard 群、Control 群、MGN-3 低濃度投与群、MGN-3 高濃度投与群の 4 群に分け、本飼育 3 日目に Standard 群以外の群に 40%エタノールを経口投与した。エタノール経口投与前に、Standard 群、Control 群には生理食塩水を、MGN-3 投与群には MGN-3 水溶液を経口投与した。エタノール投与 4 時間後に麻酔下で解剖を行い、回収した血液は血清中トランスアミナーゼ活性、TNF-α レベル、SOD 活性の測定に供した。
・実験 2
8 週齢の Wistar 系雄ラットを、Standard 群、Control 群、MGN-3 投与群の 3 群に分け、本飼育 3 日目に Standard 群以外の群に 40%エタノールを経口投与した。エタノール経口投与前に、Standard 群、Control 群には生理食塩水を、MGN-3 投与群には MGN-3 水溶液を経口投与した。エタノール投与 1 時間後に麻酔下で解剖を行い、肝臓を回収した。肝臓における NF-κB 経路および MAPK 関連タンパク質の発現を Western blotting 法で測定した。
【結果】
・実験 1
MGN-3 低濃度群において、血清トランスアミナーゼ活性、TNF-α レベルの有意な減少が確認された。SOD に関しては活性の上昇傾向が確認された。
・実験 2
肝臓中 NF-κB、MAPK 関連タンパク質発現の測定は現在解析中である。
以上の結果から、MGN-3 はアルコール性肝炎を抑制する可能性が示唆された。

rice bran, liver injury, alcohol

講演番号：3G41a13
講演日時、会場：3 月 28 日 11:32～ G 校舎 41 会場

染毛剤および関連化合物によるマウスの炎症性皮膚炎におけるフルボ酸の抑制作用

Inhibitory effects of fulvic acid on inflammatory dermatitis of mice by hair dye and related substances

○安蒜 明成、滝口 泰之（千葉工大工）
○Akinori ANBIRU, Yasuyuki TAKIGUCHI (Chiba Tech.)

[背景及び目的] パラフェニレンジアミン(PPDA)，チオグリコール酸(TGA)，システアミン塩酸塩(CH)は，染毛剤やパーマ液の主成分として用いられてきたが，これらの使用時にアレルギー性接触皮膚炎を引き起こすことが報告されている。接触蕁麻疹や滲出性紅斑様などの強い重篤な臨床像も報告されている。本研究は上記の抗原物質の接触感作によるマウス接触過敏症モデルを，Hos:HR-1 マウスを用いて作成した。また，これらの抗原物質によるアレルギー症状の予防及び緩和剤として抗酸化活性を持ち，水溶性の腐食物質であるフルボ酸を使用し検討した。

[方法] 実験動物は，Hos:HR-1 雌マウスを 8 週齢で購入し，市販飼料と水で飼育室環境に馴化させるため 1 週間予備飼育を行い，各実験群は 3 ～ 5 匹で構成した。各実験群に PPDA などの抗原物質をアセトン：オリーブオイル（4：1）に溶かした液をマウスの背部に 100µl を 3 日連続で塗布して感作させた。そして，感作終了 2 日後に各群のマウスの右耳にそれぞれの抗原物質を表裏 10µl ずつ塗布し，0h，1h，3h，24h，48h 及び 72h に耳介の厚さをマイクロメーター(Mitutoyo)で測定した。その後，海綿静脈洞から尾部採血を行い，血中の IgE 濃度を ELISA キット(森永生科学研究所)で測定した。また，緩和剤としてフルボ酸を各実験群に 100 mg/ml を塗布し，その 1 時間後にそれぞれの抗原物質を塗布し，耳介の厚さ及び血中の IgE 濃度の測定を検討した。

[結果及び考察] 10% PPDA 群では耳介が厚くなり 24～48h 後にピーク値が得られた。また, 5% TGA 群では 3h 後と短時間で耳介の厚さのピーク値が得られ，10% CH 群では 24h 後に耳介の厚さのピーク値が得られた。上記の結果から，PPDA 及び CH は遅延型アレルギーであり，TGA は即時型アレルギーであることが考えられる。Control の IgE 濃度は 0.093ng/ml であったが, 10% PPDA 群の IgE 濃度は 0.487 ng/ml であり, 5%TGA 群では 0.303 ng/ml であった。また, 10% CH 群では 0.159 ng/ml となった。フルボ酸を塗布後に抗原物質を塗布したものではそれぞれの IgE 濃度の値の減少が確認されたが，フルボ酸のみを塗布した場合には IgE 濃度は 0.284 ng/ml となり Control より値が高くなった。そこで，フルボ酸を塗布することで皮膚を介し，マスト細胞やリンパ球などが活性化され IgE 濃度が上昇し，それによってアレルギー症状が抑制されたと考えられる。

Fulvic acid, hair dye, mice

講演番号：3G41a14
講演日時、会場：3 月 28 日 11:43～ G 校舎 41 会場

Modulatory effect of apple polyphenols on chemokine expression in mouse intestinal epithelial cells.

○PENG LI[1], YASUHARU ISHIHARA[1], TAKU IWAMOTO[1], MAKOTO SHIMIZU[1,2], MAMORU TOTSUKA[1] ([1]Dept. Appl. Biol. Chem., The Univ. Tokyo, [2]Dept. Nutr. Sci., Tokyo Univ. Agric.)

Apple condensed tannin (ACT) is a complex of procyanidin dimer, trimer and oligomers with higher degrees of polymerization ranging 4-10. ACT possesses a variety of physiological activities including antioxidant and anti-allergy properties. In the present study, we examined the modulatory effect of ACT on gut immunity, especially chemokine expression in intestinal epithelial cells (IEC) in vivo and in vitro.

After feeding BALB/c mice with drinking water containing 1% ACT for 2 weeks, DNA microarray analysis of small intestinal epithelial cells was performed. We found the increased mRNA expression of chemokines including CCL4, CCL5, CCL8, CXCL1, CXCL9, and CXCL16. Among them, the increased mRNA expression of CXCL9 by feeding ACT was confirmed reproducibly by real-time RT-PCR in the different experiments.

To examine the effect of ACT on chemokine expression in IEC in vitro, an IEC cell line derived from mouse small intestine, MoS13, was used. ACT was found to increase the mRNA expression of CXCL9, CXCL10, and CXCL11 in MoS13 cells stimulated with a TLR3 ligand, Poly I:C.

These results suggest that ACT can modulate gut immune responses by up-regulating chemokine expression in IEC. Oral ACT was previously shown to suppress food allergic reaction in mice and to increase a population of intraepithelial lymphocytes (IEL) expressing γδ T-cell receptors. The increased population of the γδ IEL can be possibly caused by the increased expression of the chemokines in IEC observed in this study.

Tannin, IEC, Chemokine

講演番号：3G41p01
講演日時、会場：3 月 28 日 14:00～ G 校舎 41 会場

ペクチンの炎症応答調節構造の探索

Structural and functional characterization of pectin harboring anti-inflammatory activities

○石其 慧太[1]、北口 公司[1,2]、矢部 富雄[1,2] ([1]岐阜大院・応生科・応用生命、[2]岐阜大・応生科・応用生命)
○KEITA ISHISONO[1], KOHJI KITAGUCHI[1,2], TOMIO YABE[1,2] ([1]Grad. Sch. of Appl. Biol. Sci., Gifu Univ., [2]Fac. of Appl. Biol. Sci., Gifu Univ.)

【目的】

水溶性食物繊維の一種であるペクチンは，ポリガラクツロン酸を主成分とする主鎖に複数の中性糖からなる側鎖が付加した構造をもつ多糖類である。ペクチンは，便通改善，血中コレステロール低減作用や血糖上昇抑制作用などの種々の生体調節作用を有することが報告されている。近年，これらの生体調節機能の発現に，腸内細菌による食物繊維の代謝産物が重要な役割を担うことが多数報告されている。一方，ペクチンは，炎症の起点となるマクロファージに直接作用し，炎症応答を制御することも示唆されているが，その作用機序は不明である。そこで本研究では，マクロファージにおける炎症性サイトカインの産生にペクチンが及ぼす影響を調査し，炎症応答の調節に関与するペクチンの分子構造を明らかにすることを目的とした。

【方法および結果】

マウスマクロファージ様細胞株 RAW264.7 にリンゴおよび柑橘由来のペクチンを添加し，24 時間培養した後，Lipopolysaccharide (LPS)刺激で誘導される炎症性サイトカイン発現量をリアルタイム RT-PCR 法と ELISA 法により測定した。その結果，ペクチン非添加群に比べて，ペクチン添加群で有意に Interleukin-6 (IL-6)の mRNA 発現量とタンパク質産生量が低下した。ペクチンが直接マクロファージに作用し，炎症性サイトカインを産生の制御することで，抗炎症機能を示す可能性が考えられた。次いで，炎症性サイトカインの産生抑制活性を有するペクチンの分子構造を明らかにするため，ペクチナーゼを用いて主鎖構造を分解したペクチンを調製した。この主鎖分解ペクチンを RAW264.7 に添加したところ，未処理ペクチン添加群に比べて，有意に LPS 誘導性 IL-6 産生が抑制された。また，酸加水分解により低分子化したペクチンにおいても LPS 誘導性 IL-6 産生の抑制が保持されていた。

以上の結果より，ペクチン分子中の特定の多糖構造が，マクロファージに直接作用して，炎症性サイトカインの産生を調節している可能性が示唆された。

pectin, inflammatory cytokine, macrophage

講演番号：3G41p02
講演日時、会場：3 月 28 日 14:11～ G 校舎 41 会場

ヤマブシタケ由来エルゴステロール誘導体の LPS 誘導炎症に対する抑制作用

Effects of an ergosterol derivative from *Hericium erinaceus* on LPS-induced inflammation

○森 光一郎[1]、菊地 晴久[2]、大島 吉輝[2]、大内 謙二[1] ([1]ホクト（株)、[2]東北大薬)
○Koichiro Mori[1], Haruhisa Kikuchi[2], Yoshiteru Oshima[2], Kenji Ouchi[1] ([1]Hokuto Corp., [2]Tohoku Univ.)

【目的】我々はこれまでに、ヤマブシタケ抽出物が、LPS 刺激したマクロファージにおいて TLR4 シグナルを強く阻害し、炎症性サイトカイン産生を抑制することを報告した。さらにマクロファージと脂肪細胞の共培養系においては、LPS 刺激による脂肪細胞の炎症変化も強く抑制し、IL-6 産生抑制やアディポネクチン遺伝子発現の上昇など、脂肪組織炎症の抑制に繋がる作用を有することも示してきた。今回は、ヤマブシタケに含まれる抗炎症成分の探索を行った結果、活性成分の一つを同定し、その作用を詳細に検討したので報告する。

【方法】LPS 刺激した RAW264 マクロファージの IL-6 発現上昇に対する抑制活性を指標として、ヤマブシタケ子実体に含まれる抗炎症活性成分を分画、精製した。ヤマブシタケ子実体のエタノール抽出物を、酢酸エチルと水で分配して得た酢酸エチル可溶画分をシリカゲル、ODS、又はアルミナを用いたカラムクロマトグラフィーで順次分画し、活性成分を単離した。単離成分は、NMR スペクトルにより構造解析を行った。抗炎症作用の解析は、RAW264 マクロファージの培養上清にヤマブシタケ成分を添加して 20 分間培養した後、さらに LPS 30 ng/ml を加えて炎症誘導し、TNF-α、IL-6、COX2 および iNOS の遺伝子発現量を定量的 RT-PCR 法により、TNF-α、IL-6 のタンパク質発現量を ELISA 法により、NO 産生量を Griess 法により測定した。さらに TLR4 シグナルに対する作用を調べるため、MAPK（ERK、JNK、p38MAPK)、および NF-κB の活性化をウェスタンブロット法により解析した。

【結果・考察】ヤマブシタケの抗炎症活性成分を探索した結果、1 種類の活性成分を単離し、6β-methoxyergosta-7,22-diene-3β,5α-diol（MEDD）と同定した。MEDD はこれまでに多数の菌類および海綿類から単離報告がある既知化合物であったが、今回明らかとなった抗炎症活性の報告は初めてである。MEDD は LPS 刺激したマクロファージの TNF-α、IL-6、COX2 および iNOS の各遺伝子発現を濃度依存的に顕著に阻害し、同様に TNF-α、IL-6 タンパク質および NO の産生を抑制した。また、MEDD は LPS による MAPK および NF-κB の活性化を抑制した。一方、MEDD と類似の構造を有するエルゴステロールは、MEDD と同様の抗炎症作用を示さなかった。菌類には多くのエルゴステロール誘導体が含まれるが、その中でも LPS 誘導炎症に対する抑制効果は、MEDD を含む一部の化合物に特徴的な活性であると推測された。MEDD は TLR4 シグナルを阻害して抗炎症作用を示し、メタボリックシンドロームなどの炎症関連疾患に対して有用な成分となり得ることが示唆された。

mushroom, macrophage, ergosterol

講演番号：3G41p03
講演日時、会場：3 月 28 日 14:22～ G 校舎 41 会場

The anti-viral activities and mode of action of a herbal medicines from Salvia miltiorrhiza (Danshen) & Angelica tenuissima Nakai.

○Myun Soo KIM[1,2], Prasanna Weeratunga[2], Tae-Sik Yoon[2], Byeong-Hoon Lee[2], Ki Jong Yu[1], Hongik Kim[1], Jong-Soo Lee[2] ([1]R&D Division, Vitabio, [2]College of veterinary medicine, Chungnam National University)

Medicinal plants have long been used as remedies against viral infections since the beginning of human civilization. Danshen, the root and rhizome of *Salvia miltiorrhiza*, & *Angelica tenuissima* Nakai(AT*) are* highly valued in traditional Chinese medicines and have several immunomodulatory properties.

In this study, the antiviral activities and the antiviral mode of action of extracts from Danshen & AT were investigated *in-vitro* and *in-vivo.*

The antiviral activity of Danshen & AT were evaluated against the infection of Influenza A virus (PR8), Vesicular Stomatitis Virus (VSV) and Newcastle Disease Virus (NDV) on RAW264.7 cells. Western Blotting, ELISA and RT-PCR were performed to investigate the antiviral mode of action of the extracts in RAW264.7 cells, including protein phosphorylation, cytokine secretion and cellular mRNA expression. Anti-influenza A activity of Danshen & AT were evaluated with divergent influenza A subtypes in a BALB/c mouse infection model.

Danshen & AT significantly suppressed the replication of Influenza A virus (PR8), Vesicular Stomatitis Virus (VSV) and Newcastle Disease Virus (NDV) in RAW264.7 cells. Danshen & AT also induced the production of type I interferon and pro-inflammatory cytokines, both at the mRNA and protein levels. Additionally, Danshen & AT induced the phosphorylation of various molecules present in the type I IFN signaling pathway. Oral administration of Danshen & AT exhibited both preventive and therapeutic effects on BALB/c mice infected lethal doses of highly pathogenic influenza A sub types (H1N1, H5N2, H7N3 and H9N2). Danshen & AT treated mice displayed higher survivability, rapid recovery, lower lung virus titers and lungs with moderate signs of virus infection.

Overall, Danshen & AT strongly inhibited viral replication both *in vitro* and *in vivo*. Moreover, Danshen & AT could play a role as immunomodulators and may be potential candidates for new antiviral drugs.

Herbal medicine, Antiviral activity

講演番号：3G41p04
講演日時、会場：3 月 28 日 14:33～ G 校舎 41 会場

Zerumbone の抗炎症作用におけるタンパク質ストレスの役割

Zerumbone-induced proteo-stress may contribute to its anti-inflammatory functions

○五十嵐 洋子[1]、大西 康太[2]、入江 一浩[1]、村上 明[1]([1]京大院・農・食品生物、[2]名大院・生命農・応用分子生命)
○Yoko IGARASHI[1], Kohta OHNISHI[2], Kazuhiro IRIE[1], Akira MURAKAMI[1] ([1]Grad. Sch. of Food. Sci. Biotechnol., Kyoto Univ., [2]Grad. Sch. of Bioagr. Sci., Nagoya Univ.)

【目的】ハナショウガの根茎に含まれる zerumbone は、α,β-不飽和カルボニル基を介して、タンパク質のチオール基の非選択的付加を受けることによって、細胞にタンパク質ストレスを与える[1)]。本研究では、zerumbone によるタンパク質ストレスに対応して活性化した適応応答機構が、生体に有益な生理作用をもたらす可能性を想定した。この仮説は、医薬品等と比較して標的特異性の低い植物二次代謝産物に特有な活性発現機構の一部を説明するものである。

炎症性マクロファージを zerumbone で処理すると、prostaglandin E_2 の生成に関与する cyclooxygenase-2 (COX-2) や一酸化窒素 (nitric oxide, NO) を過剰に産生する誘導型 NO 合成酵素 (inducible NO synthase, iNOS) などの炎症関連遺伝子の発現が低下する[2)]。本抗炎症作用におけるタンパク質ストレスの関与について検討した。

【方法・結果】マウスマクロファージ様細胞 RAW264.7 に、熱ショックによるタンパク質ストレスを与えると、zerumbone 処理と同様に、リポ多糖誘導性 COX-2 および iNOS のタンパク質発現が低下した。一方で、熱ショックや zerumbone 処理によるタンパク質凝集体の変動を filter trap assay によって調べたところ、ubiquitin 化を含むタンパク質凝集体の増加が観察された。このタンパク質凝集体の増加は、zerumbone チオール基付加体を特異的に認識する抗体を用いることによっても確認された。そこで、zerumbone とタンパク質のシステイン残基との結合を競合阻害する目的で、チオール基を持つ求核性抗酸化剤である *N*-acetyl-L-cysteine (NAC) により前処理を行うと、予想通り、zerumbone による凝集体の増加が抑制された。同時に本条件下において、zerumbone の COX-2 抑制活性などの抗炎症作用が顕著に低下した。

【考察】zerumbone によるタンパク質ストレスを NAC の前処理によって阻害することにより、抗炎症作用が顕著に低下したことから、zerumbone の抗炎症作用機構にタンパク質ストレスが関与している可能性が示唆された。現在、タンパク質ストレス応答と炎症反応に関与するシグナル伝達分子に注目し、その相互作用について検討を行っている。

【参考文献】1) Ohnishi K, *et al.*, *PLoS One*, **8**, e58641 (2013). 2) Murakami A, *et al.*, *Carcinogenesis*, **23**, 795-802 (2002)

zerumbone, anti-inflammation, proteo-stress

講演番号：3G41p05
講演日時、会場：3 月 28 日 14:44～ G 校舎 41 会場

「藤枝かおり」緑茶抽出物による抗炎症活性の実証
Anti-Inflammatory Effects of 'Fujiedakaori' Green Tea Extract
○中山 紗由莉、服部 誠、好田 正（東農工大）
○Sayuri NAKAYAMA, Makoto HATTORI, Tadashi YOSHIDA (Tokyo University of Agriculture and Technology)

【目的】近年、生活習慣病患者の増加が社会問題となっている。その背景には、近代化に伴う生活様式の変化が大きく関与しており、その発症・進行に脂肪組織周辺での慢性炎症が密接に寄与していることが続々と明らかになっている。そのため、抗炎症作用を持つ薬剤や食品による疾病の予防・治療法に関する研究が盛んに行われている。本研究においては、抗肥満活性や抗生活習慣病活性が期待されている緑茶のもつ抗炎症効果を実証することで、食品の機能性においてこれまでにない新たな知見をもたらすと同時に、生活習慣病の予防法の確立に貢献することを目的としている。今回の報告では、主にマクロファージから産生される炎症性サイトカインである TNF-α に着目し、緑茶抽出物による炎症抑制効果を *in vitro* で解析した。
【方法】緑茶の茶葉を熱水中で 3 分間抽出・ろ過・凍結乾燥に供したものを緑茶抽出物（GTE）とした。BALB/c マウスの脾臓細胞(SPL)またはマウス由来マクロファージ細胞株 J774A.1 を、1 μg/ml の LPS および 100 μg/ml の GTE と共に培養し、24 時間後の上清中の TNF-α 産生量を ELISA 法により測定した。また、GTE 溶液をトリプシン処理または分子量により分画して得た試料を上記と同様に培養した上清中の TNF-α 産生量も測定した。
【結果】GTE の細胞毒性は SPL において 500 μg/ml で認められ、J774A.1 においては 500 μg/ml 以下の濃度では確認されなかった。SPL を用いて 10 品種の緑茶をスクリーニングした結果、TNF-α 産生抑制活性すなわち抗炎症活性を強く有する品種として「藤枝かおり」を選出した。藤枝かおりの GTE を MW 5000 で分画した画分を添加して培養したところ、MW 5000 以上の画分においては TNF-α 産生抑制活性は認められず、MW 5000 以下の画分において未処理の GTE と同程度の TNF-α 抑制活性が認められた。また、GTE をトリプシン処理しても TNF-α 産生抑制活性に変化は見られなかった。以上の結果は、GTE 中の TNF-α 産生抑制活性を呈する物質は MW 5000 より小さく、タンパク質ではない物質であることを示唆している。さらに、藤枝かおりを加工して製造された紅茶抽出物にも緑茶と同程度の TNF-α 抑制活性が確認された。藤枝かおりの GTE は J774A.1 においても有意に TNF-α 産生を抑制した。
【結論】緑茶・藤枝かおりの熱水抽出物は炎症状態のマクロファージによる TNF-α 産生を抑制し、その活性は分子量 5000 以下の画分に含まれていることが示された。

anti-inflammatory activity, TNF-α, green tea

講演番号：3G41p06
講演日時、会場：3 月 28 日 15:05～ G 校舎 41 会場

イソマルトデキストリンの経口投与による IgA 産生増強作用

Effect of oral Isomaltodextrin administration on the IgA production in mice.

○櫻井 岳夫、吉實 知代、谷口 美文、渡辺 光、福田 恵温 ((株)林原　研究開発本部)
○ Takeo SAKURAI, Chiyo YOSHIZANE, Yoshifumi TANIGUCHI, Hikaru WATANABE, Shigeharu FUKUDA (HAYASHIBARA CO.,LTD. R&D Center)

【目的】イソマルトデキストリン（IMD）は澱粉を原料とし、*Paenibacillus* 属細菌が産生する 2 種の酵素を使用して調製される多分岐α-グルカンである [1)]。IMD は水溶性が高く、酵素-HPLC 法で測定した食物繊維含量が 80%を越えることから、水溶性食物繊維としての利用が期待されている。我々は先の本学会で IMD がマウスにおいて肝臓脂肪蓄積抑制作用や食後高脂血症抑制作用を有することを明らかにした [2,3)]。本報では、マウスを用いて腸管免疫系の防御機構で重要な働きをする IgA 抗体の産生に対する影響を検討した。

【方法】BALB/c マウス（雌、6 週齢）に精製飼料（AIN-93G）を与えて 2 週間馴化させた後、糞便 IgA 抗体量により 5 匹ずつ 4 群に群分けした。そして飲料として水（対照群）あるいは IMD 水溶液（1%、2%、5%）を給水瓶で与えて 4 週間飼育した。毎週糞便を採取し、糞便 IgA 抗体量を EIA 法により測定した。4 週間後に麻酔下で腸管を採取し、小腸、結腸の粘膜組織の IgA 量を測定した。また盲腸内容物中の重量、pH、および有機酸を測定した。

【結果】

1. 対照群と比較して、IMD 5%群の糞便 IgA 量は 3, 4 週目で有意な増加が認められた。IMD 2%群の糞便 IgA 量は 4 週目で増加傾向が見られ、IMD 1%群の糞便 IgA 量は対照群と差はなかった。
2. 腸管粘膜中の IgA 量は IMD 2%群と 5%群の結腸粘膜および IMD 5%群の小腸粘膜で、対照群よりも有意な増加が見られた。
3. 盲腸組織および盲腸内容物の重量は、対照群に比較して IMD 5%群で有意な増加が見られた。

【考察】IMD の飲水投与により、用量依存的に糞便 IgA 抗体量が増加した。また、IMD 投与によりマウスの盲腸組織と盲腸内容物の重量が有意に増加したことから、この作用は腸内フローラの変化を介したものと考えられた。なお IgA 抗体の産生は、ビフィズス菌やその他乳酸菌、*Bacteroides* 属細菌などにより増強されることが知られており、これら腸内細菌数の変化についても検討中である。

[1)] Carbohydrate Research, 344, 2151-2156(2009)　[2)] 日本農芸化学会、講演番号 3A16p04 (2013)
[3)] 日本農芸化学会、講演番号 3A16p05 (2013)

Isomaltodextrin, IgA, intestinal immunity

講演番号：3G41p07
講演日時、会場：3 月 28 日 15:16～ G 校舎 41 会場

イソマルトデキストリンの経口投与による IgE 応答および接触性皮膚炎に対する作用

Effects of oral Isomaltodextrin administration on the IgE response and contact hypersensitivity response in mice.

○谷口 美文、櫻井 岳夫、吉實 知代、渡辺 光、福田 恵温 ((株)林原 研究開発本部)
○ Yoshifumi TANIGUCHI, Takeo SAKURAI, Chiyo YOSHIZANE, Hikaru WATANABE, Shigeharu HUKUDA (HAYASHIBARA CO.,LTD. R&D Center)

【目的】澱粉から酵素法により調製された多分岐α-グルカンであるイソマルトデキストリン（IMD）の免疫系に対する作用について､我々は前報においてIgAの産生に対する作用を検討した｡本報では、アレルギー反応に対する作用検討として、IgE 抗体産生と接触性皮膚炎モデルに与える影響についてそれぞれマウスを用いて検討した。
【方法】試験 1. IgE 抗体産生に対する影響検討：BALB/c マウス（雌、6 週齢）を予備飼育後、5 匹ずつ 3 群に群分けし、水,IMD 2%,5%水溶液を給水瓶で与え 5 週間飼育した（飼料は AIN-93G)。飼育 1, 3 週後に卵白アルブミン（OVA）20μg と Alum 4.5mg を腹腔内投与して IgE 抗体産生を誘導した。5 週後に採血して血清中の抗 OVA 抗体（IgE, IgG1, IgG2a)、総 IgE を EIA 法により測定し、比較した。
試験 2. 接触皮膚炎モデルでの影響検討： BALB/c マウス（雌、6 週齢）を予備飼育後、5 匹ずつ 4 群に群分けし、水あるいは IMD 1%, 2%, 5%水溶液を給水瓶で約 4 週間与えた（飼料は AIN-93G)。飼育 2 週後にジニトロフロオロベンゼン（DNFB）を腹部に塗布して感作した。さらにその 5 日後に DNFB を右耳に塗布して接触性皮膚炎反応を惹起した。皮膚炎反応の程度は、毎日耳介厚を測定して比較した。
【結果・考察】試験 1. IMD 2%群の血清中の抗体価は対照群と差はなかった。一方で、IMD 5%群の血清中の抗 OVA IgE 抗体価は対照群に比べ有意に低かった。また、血清中の抗 OVA IgG1 抗体価も IMD 5%群で有意に低かった。この成績により、IMD 5%水溶液の投与による全身性免疫系への作用は、Th2 応答（IgE, IgG1 産生）に対する低減効果が考えられた。
試験 2. 各試験群とも、DNFB 塗布後 48hr にピークとなる強い耳介肥厚が認められた。塗布後 24hr での耳介肥厚は、対照群に比較して IMD 2%, 5%群で有意に低かった。また塗布 48hr での耳介肥厚は、対照群よりも IMD 群で有意に低かった。この成績により、IMD の経口投与により皮膚アレルギー反応が用量依存的に低下すると考えられた。
　これらの成績から、IMD の経口投与により IgE 抗体の産生は抑制され、また接触性皮膚炎症状が緩和されることが期待された。なおこれらの作用は IgA 産生増強と同様に、腸内フローラの変化が関与するものと考えられた。

Isomaltodextrin, IgE, contact hypersensitivity

講演番号：3G41p08
講演日時、会場：3 月 28 日 15:27～ G 校舎 41 会場

温州ミカン果皮配合ヨーグルトのアレルギー症状緩和効果の検討
Effect of yogurt containing *Citrus unshiu* peel on allergic conjunctivitis

○安永 翔[1]、原 裕子[2]、白石 敦[2]、坂根 由梨[2]、鎌尾 知行[2]、竹澤 由起[2]、大橋 裕一[2]、菊池 泰三[3]、窪 千明[3]、門田 歩[4]、菅原 卓也[1]([1]愛媛大農、[2]愛媛大医眼科、[3]四国乳業（株)、[4]伊方サービス（株））
○Sho YASUNAGA[1], Yuko HARA[2], Atsushi SHIRAISHI[2], Yuri SAKANE[2], Tomoyuki KAMAO[2], Yuki TAKEZAWA[2], Yuichi OHASHI[2], Taizo KIKUCHI[3], Chiaki KUBO[3], Ayumu KADOTA[4], Takuya SUGAHARA[1] ([1]Faculty of Agriculture, Ehime University, [2]Department of Opththalmology, Ehime University School of Medicine, [3]Shikoku Milk Industry Co., Ltd., [4]Ikata Service Co., Ltd.)

［目的］
これまでに、温州ミカン果皮に含まれるポリメトキシフラボノイドであるノビレチンがマスト細胞の脱顆粒応答を抑制することでアレルギー症状を緩和することを確認し、その作用機構が Phosphoinositide-3 kinase（PI3K）活性化の下方制御であることを明らかにした。また、牛乳に含まれるβ-ラクトグロブリンに脱顆粒抑制効果があり、その作用機構がノビレチンと異なることを明らかにした。そこで、本研究ではノビレチンを含有する温州ミカン果皮をヨーグルトに配合し、そのアレルギー症状緩和効果を検証することを目的とした。
［方法］
スギ花粉アレルゲン(Cry j1)を鼻腔内投与することで花粉症を誘導した BALB/c マウスに対する温州ミカン果皮とヨーグルト乳清の経口投与による症状緩和効果を評価した。また、スギ花粉アレルギー罹患者 26 名（男性 13 名 女性 13 名）を対象に、温州ミカン果皮を配合したヨーグルトの症状緩和効果を結膜抗原誘発試験により検討した。予備試験により決定した濃度のスギ花粉抗原の点眼によりアレルギー性結膜炎を誘発した 30 分後に自覚症状、他覚所見を評価するとともに、Ocular Surface Thermographer（OST）を用いて、抗原チャレンジ前後の眼球結膜温度の変化を測定した。その後、温州ミカン果皮配合ヨーグルトを 14 日間（1 日 150 mL）摂取したのち、再度、同じ抗原チャレンジ試験を実施することで、ヨーグルト摂取による症状緩和効果を評価した。
［結果］
スギ花粉症モデルマウスに温州ミカン果皮とヨーグルト乳清を経口投与することで症状緩和効果を検証した。その結果、Cry j1 感作後のくしゃみの回数が温州ミカン果皮とヨーグルト乳清の混合投与により減少し、それぞれ単独投与と比較して有意なアレルギー症状軽減効果が確認された。温州ミカン果皮配合ヨーグルトの摂取により、スギ花粉抗原誘導性結膜炎の自覚症状、および他覚所見による症状の臨床スコアが顕著に減少した。14 日間のヨーグルトの摂取の前後において、OST による抗原点眼前後の眼球結膜の温度変化を測定した結果、ヨーグルト摂取後のアレルギー性結膜炎による眼球結膜の温度上昇が有意に低下した。以上のことから、温州ミカン果皮配合ヨーグルトの摂取によるアレルギー症状の緩和効果が確認された。

Functinal food, Japanese cedar pollinosis, Allergic conjunctivitis

講演番号：3G41p09
講演日時、会場：3 月 28 日 15:38～ G 校舎 41 会場

菌体成分によるマスト細胞の Fc ε RI 発現抑制

Suppression of FcεRI expression on mast cells by bacterial component

○笠倉 和巳[1]、原 むつ子[2]、奥村 康[2]、西山 千春[1]([1]東京理大 生物工、[2]順天堂大 医)
○Kazumi Kasakura[1], Mutsuko Hara[2], Ko Okumura[2], Chiharu Nishiyama[1] ([1]Dept. of Biol. Sci. Technol., Tokyo Univ. of Sci., [2]Dept. of Immunol., Juntendo Univ. Sch. of Med.)

[背景/目的] 食物アレルギーなどのⅠ型アレルギー反応の責任細胞であるマスト細胞は高親和性 IgE 受容体（FcεRI）を発現している。FcεRI が IgE とアレルゲンにより架橋されると、脱顆粒、アラキドン酸代謝産物やサイトカインの合成・産生が誘導される。このことから、Ⅰ型アレルギー反応の惹起において FcεRI が重要な受容体であり、この発現を抑制することができればアレルギー炎症を抑制できると考えられる。一方、近年、腸内共生菌やプロバイオティクスの抗アレルギー作用が注目されている。そこで、グラム陽性菌の構成成分であるペプチドグリカン（PGN）についてマスト細胞の FcεRI 発現に対する効果を解析した。 **[方法]** ヒトマスト細胞株 LAD2 及びマウス骨髄由来培養マスト細胞（BMMC）を PGN で処理し、FcεRI の細胞表面発現を FACS、 FcεRI の各サブユニットの mRNA 発現を定量 PCR、ERK のリン酸化をウエスタンブロットにより解析した。**[結果]** PGN で処理することにより FcεRI の細胞表面の発現が抑制した。一方、FcεRI α鎖及びβ鎖の mRNA 発現は PGN 処理直後にわずかに抑制されたが、24 時間後には未処理と同程度に回復した。PGN により ERK のリン酸化が阻害されること、ERK 阻害剤により FcεRI 発現が抑制されることが判明した。シクロヘキシミドにより翻訳阻害、ブレフェルディン A とモネンシンによりタンパク輸送を阻害した際の細胞表面の FcεRI 発現変化を経時的に解析した結果、未処理と比較して PGN 処理することにより、表面発現の減少速度が亢進していた。また、単量体 IgE の結合により細胞表面の FcεRI 発現が上昇することが知られているが、PGN は単量体 IgE による FcεRI 発現上昇も抑制した。以上のことから、PGN は転写及び翻訳後修飾を制御することにより FcεRI 発現を抑制していることが明らかになった。

mast cells, FcεRI, commensal bacteria

講演番号：3G41p10
講演日時、会場：3 月 28 日 15:49～ G 校舎 41 会場

アレルギーを誘導することなく経口免疫寛容を誘導しうる食品抗原の簡便な調製法の検討

Preparation of a food allergen inducing oral tolerance without food allergy

○古田 早紀[1]、服部 誠[1]、後藤 真生[2]、石川（高野） 祐子[2]、好田 正[1] ([1]東農工大農・応生化、[2]食総研)

○Saki FURUTA[1], Makoto HATTORI[1], Masao GOTO[2], Yuko ISHIKAWA-TAKANO[2], Tadashi YOSHIDA[1] ([1]Department of Applied Biological Chemistry, Tokyo University of Agriculture and Technology, [2]National Food Research Institute)

【目的】現在、食品アレルギー患者にアレルゲンを摂取させることで経口免疫寛容を誘導し、治療する経口減感作療法が注目されている。しかしながら、その治療成績はまだ十分ではない。我々はこれまでに予防的に経口免疫寛容を誘導しておくと、食品アレルギー罹患後に誘導するよりも効果的にアレルギーを抑制すること、およびその際に摂取する抗原はある程度分解されている必要があることを示してきた。これは分解されていない（intact）抗原では経口寛容だけでなくアレルギーに繋がる免疫応答も誘導しうるためと考察している。これまでの研究では抗原は酵素で分解していたが、本研究成果を実際に食品アレルギーの予防に活用するにはより安価で簡便な抗原処理技術が必要である。そこで本研究では、T 細胞に免疫寛容を誘導できる刺激性は維持しつつ抗原性は低下した分解物を酸処理によって調製する条件を卵白アルブミン（OVA）について検討した。
【方法】OVA を 0.5 M HCl に懸濁し、60℃または 80℃の温浴中で 1、3、6、8、24 時間撹拌した後、1M NaOH で pH7.0 に調整し、反応を停止させた。得られた抗原分解物の分解の程度は SDS-PAGE により評価した。また、OVA 免疫した BALB/c マウスより得た血清中の OVA 特異的 IgM 抗体に対する競合 ELISA 法によって抗原性を評価した。さらに DO11.10 マウス由来脾臓細胞に分解物を添加し、増殖応答を測定することにより T 細胞刺激能を検討した。
【結果】SDS-PAGE において、80℃加熱条件では処理時間に依存して intact OVA のバンドは薄くなるとともに、低分子量側へシフトした。60℃加熱条件では 80℃加熱条件より分解は進まないが、8, 24 時間処理において低分子量側へのバンドシフトを確認した。競合 ELISA の結果、すべての条件で intact OVA よりも抗原性は低下していた。80℃加熱条件ではいずれの処理時間においても、60℃加熱条件よりも顕著に抗原性が低下しており、24 時間処理ではほぼ抗原性は確認できなくなった。T 細胞刺激能は、60℃および 80℃加熱条件でいずれも処理時間に依存して増強した。
【考察】80℃加熱条件では 60℃加熱条件よりも分解が進んでおり、B 細胞エピトープがより大きく破壊されることで顕著に抗原性が低下したと推測した。一方で、T 細胞刺激能については分解の程度に依存して亢進したが、分解を経ても T 細胞エピトープは残存しており、加えて抗原提示細胞中でのプロセシング効率が上がり MHC 分子に提示され易くなったためと推測した。
【結論】抗原の酸処理は特に高分解条件において、T 細胞刺激能を保持したまま抗原性を減少できることが明らかとなり、食品アレルギー予防食品の創出に有用であることが示唆された。

food allergy, oral tolerance, acid-degraded antigen

講演番号：3G41p11
講演日時、会場：3 月 28 日 16:10～ G 校舎 41 会場

豆乳発酵物の制御性Ｔ細胞誘導機能と食物アレルギー抑制効果
Induction of regulatory T cells and prevention of food allergy by fermented soy milk
○藤田 友紀[1]、川島 忠臣[1]、渡邊 要平[2]、佐藤 亜美[2]、辻 典子[2] ([1]キッコーマン株式会社、[2]産総研)
○Yuki FUJITA[1], Tadaomi KAWASHIMA[1], Yohei WATANABE[2], Ami SATO[2], Noriko Tsuji[2] ([1]Research and Development Division, Kikkoman Corporation, [2]Biomedical Research Institute, National Institute for Advanced Industrial Science and Technology (AIST))

【目的】先進国において食物アレルギーは増加の一途を辿っている。食物アレルギーの発症予防や症状の抑制には、口から摂取した成分に対し免疫は寛容に働くという経口免疫寛容のシステムが重要である。また、経口免疫寛容の成立には、抑制性サイトカインIL-10や、Foxp3陽性制御性T細胞が関与する。このような背景のもと本研究では、骨髄由来樹状細胞のIL-10産生を増幅する乳酸菌（*Lactococcus lactis* K478株）と、Foxp3陽性制御性T細胞を誘導するフラボノイド（ゲニステイン、ゲニスチン）に富む豆乳を組み合わせることで、食物アレルギーの発症や症状を効率的に抑制する可能性について検討を行った。
【方法】K478株を用いて作製した豆乳乳酸発酵物のアレルギー抑制効果を、遅延型過敏反応（delayed-type hypersensitivity, DTH）および食物アレルギーモデルを用いて評価した。いずれも豆乳発酵物は、試験期間を通して経口投与した（対照群は生理食塩水）。「DTH＋経口免疫寛容モデル」ではマウス皮下に抗原を投与して感作したのち、抗原を経口投与し（経口免疫寛容誘導）、さらに足蹠に抗原投与（チャレンジ）した後の足の腫脹を測定した。「食物アレルギーモデル」では腹腔への抗原投与により感作したマウスに抗原を一日おきに経口投与した際の下痢を指標とした。*In vitro*細胞培養試験では、脾臓由来Naïve T細胞をIL-6、TGF-β、antiCD28抗体、antiCD3e抗体存在下で培養し、フローサイトメトリーでFoxp3陽性制御性T細胞の割合を解析した。また骨髄由来樹状細胞とK478株を共培養し、上清中のIL-10量をELISA法で測定した。
【結果】DTHモデルにおいて、豆乳発酵物群は生理食塩水群と比較し、足蹠の腫れがさらに抑制されており、経口免疫寛容の増強効果が示された。
食物アレルギーモデルにおいては、豆乳醗酵物を投与したマウスで腸管IL-10産生細胞の増加傾向と脾臓におけるIL-4産生の有意な抑制が観察された。さらに豆乳醗酵物群では、小腸粘膜固有層でFoxp3陽性制御性T細胞の割合が増加しており、抗炎症機能の安定化とTh２免疫の抑制が示された。
*In vitro*試験において、豆乳発酵物ホエーはFoxp3陽性制御性T細胞の割合を増強した。一方でK478株菌体は、IL-10産生を増強するもののFoxp3陽性制御性T細胞の割合に影響を与えなかった。以上、豆乳発酵物を経口投与することにより、乳酸菌によるIL-10産生増強と、ゲニステインあるいは発酵物中の他の成分によるFoxp3陽性制御性T細胞の増加が誘導された。これらが経口免疫寛容および抗炎症機能の安定化に働いたと考えられ、食物アレルギーの制御にも有効であることが示唆された。

food allergy, lactic acid bacteria, regulatory T cell

講演番号：3G41p12
講演日時、会場：3 月 28 日 16:21～ G 校舎 41 会場

乳酸菌 2 本鎖 RNA による Interferon-β産生誘導と Th1 免疫増強
Interferon-ß induced by double-stranded RNA of lactic acid bacteria promotes differentiation of IFN-γ-producing Th1 cells
○川島 忠臣[1]、渡邊 要平[2]、碇 菜穂[1]、福井 竜太郎[3]、佐藤 亜美[2]、斉藤 隆[4]、筒井 ひろ子[5]、三宅 健介[3]、辻 典子[3] ([1]キッコーマン株式会社、[2]産業技術総合研究所、[3]東京大学医科学研究所、[4]理化学研究所　統合生命医科学研究センター、[5]兵庫医科大学)
○Tadaomi KAWASHIMA[1], Yohei WATANABE[2], Naho IKARI[1], Ryutaro FUKUI[3], Ami SATO[2], Takashi SAITO[4], Hiroko TSUTSUI[5], Kensuke MIYAKE[3], Noriko TSUJI[3] ([1]Kikkoman Corporation, [2]National Institute for Advanced Industrial Science and Technology, [3]The Institute of Medical Science, The University of Tokyo, [4]RIKEN Center for Integrative Medical Sciences, [5]Hyogo College of Medicine)

【目的】これまでに我々は乳酸菌の菌体内 2 本鎖 RNA が樹状細胞の Toll-like Receptor 3（TLR3）により認識され、Interferon-β（IFN-β）産生の増強を介して DSS 誘導潰瘍性大腸炎を抑制することを見出している（Kawashima et al. *Immunity* 2013）。乳酸菌 *Tetragenococcus halophilus* KK221 株（以下、KK221）は高い IFN-β誘導能を有しており、今回 KK221 により誘導される IFN-βが T 細胞分化に与える影響について検討した。

【方法】マウス骨髄由来樹状細胞（BMDC）と DO11.10 マウス／OT-II マウス由来 $CD4^+$ T 細胞もしくは Naïve T 細胞（$CD4^+CD62L^+$）の共培養時に加熱 KK221 菌体を添加し、T 細胞の細胞内サイトカインを測定した。また、抗 IFN-β中和抗体を添加した群と比較することで、BMDC から産生される IFN-βが T 細胞分化に与える影響も評価した。さらに、野生型（WT）マウスと TLR3 遺伝子欠損マウスを用いて KK221 の経口投与が抗原特異的免疫応答に及ぼす効果を解析した。

【結果】BMDC と $CD4^+$ T 細胞もしくは Naïve T 細胞の共培養においては KK221 の添加により IFN-γ産生 T 細胞が増加し、その効果は抗 IFN-β中和抗体を添加することで減弱した。Th1 への分化因子として知られる IL-12 の産生量は菌体の 2 本鎖 RNA を分解しても減少したことから、KK221 摂取による Th1 免疫増強には KK221 菌体の 2 本鎖 RNA 及びそれにより誘導される IFN-βが関与していることが明らかとなった。また、BMDC が乳酸菌を認識した際に産生した IFN-βにより、IFN Regulatory Factor 1（IRF1）や IRF7 の発現が誘導され、IL-12p35 mRNA の発現量が上昇することが確認された。次に生体における KK221 の経口摂取と T 細胞分化の関係を解析したところ、WT マウスと TLR3 遺伝子欠損マウスの比較、WT マウスでは脾臓細胞からの IFN-γ産生が増強するのに対し、TLR3 遺伝子欠損マウスではその効果が消失していた。同様に、リンパ節細胞からの IL-4 産生の抑制も TLR3 遺伝子欠損マウスでは観察されなかった。このことから、生体においても KK221 の経口摂取による Th1 免疫の増強と Th2 免疫の抑制に TLR3 による菌体内 2 本鎖 RNA の認識が関わっていることが示された。

lactic acid bacteria, interferon-ß, double-stranded RNA

講演番号：3G41p13
講演日時、会場：3 月 28 日 16:32～ G 校舎 41 会場

Lactococcus lactis subsp. *lactis* JCM 5805 由来 DNA の pDC 活性化配列の解析
Identification of DNA characterstics responsible for pDC activation derived from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* JCM 5805
○堀江 暁、藤井 敏雄、大塩 木乃実、冨田 康之、藤原 大介（キリン・基盤研）
○Akira HORIE, Toshio FUJII, Konomi OOSHIO, Yasuyuki TOMITA, Daisuke FUJIWARA (Kirin Co., Ltd.)

【背景・目的】演者らはこれまでに *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* JCM 5805（以下、JCM 5805 株）が、ウイルス感染防御機構を司る plasmacytoid dendritic cell（pDC）を直接活性化し、インターフェロン-α（IFN-α）産生を促すことにより、様々な抗ウイルス防御反応を活性化できる乳酸菌であることを報告してきた。pDC が JCM 5805 株により活性化されるためには TLR9 および MyD88 が必須であることから、その活性本体は DNA であると考えられた。そこで、JCM 5805 株のゲノム配列を決定し、pDC 活性化配列の特定を試みた。
【方法・結果】JCM 5805 株のゲノム上の複数の領域から PCR により 300 bp の DNA ライブラリーを作製して、マウス骨髄細胞由来の樹状細胞に対する IFN-α 産生誘導能の評価を行った。単純に CpG モチーフ数に活性が比例するとの予測に反して、両者の間に明確な相関は見られなかった。その一方で、CpG モチーフを全く含まない断片は IFN-α の産生を誘導せず、CpG モチーフは活性に必須であることが示された。そこで、増幅した PCR 断片群の特徴を比較解析したところ、GC 含量が JCM 5805 株ゲノム全体の平均値である 35%以下の断片では CpG モチーフの総数と活性との間に強い相関が認められた。反面、GC 含量が 35%を上回る断片には CpG モチーフを多数含むにもかかわらず、顕著な活性を示さないものが多く見られた。また、代表的な免疫賦活乳酸菌である *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103 と JCM 5805 株のゲノムを比較すると、ゲノム上に存在する全体の CpG モチーフの総数は、JCM 5805 では 1/3 程度に留まるにもかかわらず、GC 含量が 35%以下となる領域中の CpG モチーフの数は ATCC 53103 株のほぼ 10 倍にも達することが見出された。さらに、様々な乳酸菌の公開ゲノム情報を比較したところ、*Pediococcus pentosaceus* や *Leuconostoc mesenteroides* といった乳酸菌にも JCM 5805 株と同様の特徴が認められた。これらに属する様々な菌株を対象として活性を評価した結果、高い確率で高活性株を得ることができた。
【考察】以上の知見は、JCM 5805 株のゲノム DNA がウイルス感染防御を司る pDC 活性化に有効である特性を持ち、優れた天然の DNA アジュバントになりうる可能性を示唆している。また、そのゲノムに特徴的に多く存在する低 GC 領域に局在する CpG モチーフは、JCM 5805 株以外の乳酸菌においても pDC 活性化に重要な役割を担っていることが推測された。本発表では、CpG モチーフを含む DNA 断片が TLR9 リガンドとして作用する際の、重要と思われる構造的な特性についても議論したい。

lactic acid bacteria, innate immunity, DNA adjuvant

講演番号：3G41p14
講演日時、会場：3 月 28 日 16:43～ G 校舎 41 会場

Lactobacillus paracasei K71 の経口投与による血中 IgE レベル抑制と Th 1 偏向誘導
Decreased serum IgE levels and Th1-skewed immunomodulations by orally administrated *Lactobacillus paracasei* K71

○三原 敏敬[1]、五十嵐 晶[2]、渡邉 由梨子[2]、佐藤 佳太[3]、熊谷 武久[1]、城 斗志夫[3]、原 崇[3] ([1]亀田製菓、[2]新潟大院自然科学、[3]新潟大農)
○ Toshihiro MIHARA[1], Akira IGARASHI[2], Yuriko WATANABE[2], Keita SATO[3], Takehisa KUMAGAI[1], Toshio JOH[3], Takashi HARA[3] ([1]Kameda Seika Co., Ltd., [2]Gad. Sch. Sci. & Technol., Niigata Univ., [3]Fac. Agric., Niigata Univ.)

【目的】日本酒の酒粕より分離された乳酸菌 *Lactobacillus paracasei* K71（K71 株）は、マウス経口投与試験により血中 IgE レベルの低減[1)]，さらにヒト試験によりアトピー性皮膚炎症状の緩和[2)]が確認されている。これまでに、抗アレルギー乳酸菌は Th1 偏向誘導作用を示す傾向が報告されてきたが、その作用機序は十分に解明されていない。本研究では、K71 株のマウス経口投与試験による Th1 細胞および Th2 細胞，樹状細胞サブセットの増減について中心に検討した。
【方法】BALB/c マウス（♀，6 週齢）をコンベンショナルな環境で飼育し、腹腔内にオボアルブミン（OVA）と水酸化アルミニウムゲルを飼育 0 日目と 14 日目に投与して血中 IgE レベルを亢進させた。K71 株は滅菌処理後に凍結乾燥粉末（2×10^{11} cfu/g）とし、K71 株投与群にはこれを滅菌水に懸濁して経口投与（1 mg/mouse/day）し、対照群には滅菌水を投与した。飼育 5 週目に血中 IgE レベル亢進を確認後、脾臓，腸管膜リンパ節，パイエル板より細胞を採取し、ELISA 法と FACS 解析によりサイトカイン産生や免疫学的マーカー発現を調べた。また、蛍光（CFSE）標識した K71 株を BALB/c マウスに経口投与し、凍結組織切片解析により腸管免疫組織に取り込まれているか否か調べた。
【結果】滅菌蒸留水を経口投与した対照群と比較し、K71 株投与群では血中の総 IgE 量および OVA 特異的 IgE 量の有意な減少が確認された。同時に、K71 株投与群では血中の総 IgG1 量および OVA 特異的 IgG1 量の有意な減少と、総 IgG2a 量および OVA 特異的 IgG2a 量の有意な増加が確認された。脾臓細胞を採取し、OVA を添加して培養した結果、K71 株投与群では IL-4，IL-5，IL-6，IL-10 等の Th2 サイトカインの産生量が対照群より低下していた。また、K71 株投与群脾臓細胞では IFN-γ，IL-2 等の Th1 サイトカインの産生量も減少傾向が認められた。凍結組織切片解析の結果、経口投与した CFSE 標識 K71 株がパイエル板組織において検出された。FACS 解析の結果、対照群と比較し、K71 株投与群ではパイエル板における $T\text{-}bet^{+}CD3^{+}CD4^{+}$細胞の増加と $GATA\text{-}3^{+}CD3^{+}CD4^{+}$細胞の減少が確認され、Th1 細胞増加と Th2 細胞減少が示唆された。同時に、K71 株投与群のパイエル板において、$CD11c^{+}CD8^{+}$細胞の増加が確認された。経口摂取した K71 株死菌体はパイエル板に取り込まれ、強い IL-12 産生能を有する $CD8^{+}$樹状細胞の増加を介して Th1 細胞を誘導し、抗アレルギー作用に繋がると推察される。

1) T. Kumagai et al. : Food Sci. Technol. Res., 19(1), 127 (2012)
2) M. Moroi et al. : J. Dermatol., 38, 131 (2011)

Lactobacillus paracasei K71, Th1/Th2, CD8 DC cells

講演番号：3G41p15
講演日時、会場：3 月 28 日 16:54～ G 校舎 41 会場

Lactococcus lactis C59 株による潜在型 TGF-β から活性型 TGF-β への変換作用
Effect of *Lactococcus lactis* C59 on conversion of latent TGF-β into active TGF-β
○山田 剛史[1]、西田 実紗[1]、青木－吉田 綾子[2]、鈴木 チセ[2]、清水 誠[1,3]、戸塚 護[1] ([1]東大院農生科・応生化、[2](独)農研機構・畜草研、[3]東京農大・応生・栄養)
○Tsuyoshi YAMADA[1], Misa NISHIDA[1], Ayako AOKI-YOSHIDA[2], Chise SUZUKI[2], Makoto SHIMIZU[1,3], Mamoru TOTSUKA[1] ([1]Dept. Appl. Biol. Chem., The Univ. Tokyo, [2]NILGS, [3]Dept. Nutr. Sci., Tokyo Univ. Agric.)

【目的】
乳酸菌をはじめとするプロバイオティクスの免疫調節作用が様々な菌株について解析されている。その作用機構の詳細は未解明の部分が多く残されているが、菌株ごとにその作用機構が異なることが示唆されている。*Lactococcus lactis* C59(C59)は莢膜多糖(CPS)を有する乳酸球菌であり、これまでに IgE 抗体産生抑制作用を持つことが報告されている。私たちも C59 をマウスに経口投与することで経口免疫寛容誘導が増強されることを報告しており、抑制性サイトカインである TGF-β の活性上昇の寄与が示唆されている。そこで本研究では、C59 の TGF-β 活性増強作用について解析を行った。

【方法】
GM17 液体培地を用いて、37℃で 18 時間静置培養した C59 を集菌した後、DMSO 抽出により莢膜多糖（CPS）画分を回収した。BALB/c マウスから脾臓細胞を調製し、C59 菌体、CPS 画分を添加して 48 時間培養した。培養上清中の総 TGF-β 量（活性型と潜在型の総和）については、上清を酸処理することにより潜在型を活性型に変換した後、活性型 TGF-β として ELISA により測定した。また酸処理を行わない培養上清中の活性型 TGF-β 量も ELISA により測定した。一方、潜在型 TGF-β から活性型 TGF-β への変換に対する C59 菌体及び CPS 画分の直接的な作用を検討することを目的として、脾臓細胞をサンプル無添加で 48 時間培養し、潜在型 TGF-β を含む培養上清を回収した。この培養上清に対して試料を添加してインキュベートしたのち、活性型 TGF-β 量を ELISA によって測定した。

【結果】
マウス脾臓細胞培養系に CPS 画分を添加したところ、総 TGF-β 量に変化は認められなかったが、活性型 TGF-β の増加が観察された。また、マウス脾臓細胞の培養上清のみに CPS 画分を添加した場合にも活性型 TGF-β の増加が観察されたことから、C59 由来の CPS 画分に含まれる物質に、潜在型 TGF-β を活性型 TGF-β に変換する活性があることが明らかとなった。この活性型 TGF-β への変換機能が C59 の免疫応答の抑制的調節作用のメカニズムの一つとして働いていることが示唆された。

lactic acid bacteria, capsular polysaccharide, TGF-β

講演番号：3G41p16
講演日時、会場：3 月 28 日 17:15～ G 校舎 41 会場

L-ヒスチジンが腸管免疫応答に及ぼす効果

Effect of L-histidine on gut immune responses

○羽多野 安曇[1]、曹 元[1]、内田 順也[1]、薩 秀夫[1,2]、清水 誠[1,3]、戸塚 護[1] ([1]東大院農生科・応生化、[2]前橋工科大・工、[3]東京農大・応生・栄養)
○Azumi HATANO[1], Yuan CAO[1], Junya UCHIDA[1], Hideo SATSU[1,2], Makoto SHIMIZU[1,3], Mamoru TOTSUKA[1] ([1]Dept. Applied Biological chemistry, Univ. Tokyo, [2]Maebashi Institute of technology, [3]Dept. Applied Biological chemistry, Tokyo. Univ. Agric)

＜背景・目的＞

腸管は栄養素の消化、吸収を行う場であると同時に、外来異物に対する防御機構として腸管免疫系を発達させている。腸管免疫系では、粘膜固有層の B 細胞から産生される免疫グロブリン A(IgA)が防御の主体となっている。IgA 抗体の産生は免疫細胞やサイトカインによって制御されており、腸管上皮細胞の関与も報告されている。

私たちはこれまでに、食品由来イミダゾールジペプチドであるカルノシン(β-アラニル-L-ヒスチジン)が、マウス小腸上皮細胞株において Toll 様受容体(TLR)リガンド刺激で誘導されるインターロイキン 6(IL-6)の分泌を亢進すること、マウスに経口投与した場合に小腸粘膜および盲腸内容物中の IgA 量が増加することを報告してきた。本研究では、カルノシンの構成アミノ酸である L-ヒスチジンに着目し、マウス小腸上皮細胞株における IL-6 分泌およびマウスに経口投与した時の腸管 IgA 産生に及ぼす影響を検討した。

＜方法＞

MoS13 細胞における IL-6 産生の測定：マウス小腸上皮細胞株である MoS13 細胞を用いて、TLR リガンド刺激とともに L-ヒスチジンを添加し 24 時間後に上清を回収、ELISA 法により IL-6 分泌量を測定した。また、MoS13 細胞から RNA を抽出し、IL-6 mRNA の発現をリアルタイム RT-PCR 法により測定した。

マウス小腸粘膜および盲腸内容物中の IgA の測定：BALB/c マウス(8 週令-12 週令,♀)に 0.5%L-ヒスチジンを含む飲用水あるいは通常の水道水を 2 週間自由摂取させた後、解剖を行い小腸粘膜、盲腸内容物のサンプルを調製し、ELISA 法により IgA 量を測定した。

＜結果・考察＞

MoS13 細胞の TLR リガンド刺激により誘導される IL-6 分泌量は、L-ヒスチジンの添加により濃度依存的に有意に亢進した。また、L-ヒスチジンを経口投与したマウス腸管においては、カルノシンを経口投与した場合と同様に盲腸内容物中の IgA 量は増加したが、小腸粘膜中の IgA 量には変化が認められなかった。以上の結果から、L-ヒスチジンはカルノシンと同様に粘膜免疫を増強する効果があることが示されたが、経口投与した場合の腸管 IgA 産生に与える影響が異なることから、その作用メカニズムは異なることが示唆された。

L-histidine, IgA, intestinal epithelial cell

講演番号：3G41p17
講演日時、会場：3 月 28 日 17:26～ G 校舎 41 会場

ヒト腸管上皮細胞株 HT-29 のインターフェロンλ産生に及ぼすラクトフェリンの影響
Effects of lactoferrin on the production of interferon lambda by human intestinal epithelial cell line HT-29

○新 光一郎、織田 浩嗣、若林 裕之、山内 恒治、阿部 文明（森永乳業食基研）
○Kouichirou Shin, Hirotsugu Oda, Hiroyuki Wakabayashi, Koji Yamauchi, Fumiaki Abe (Food Science & Technology Institute, Morinaga Milk Industry Co., Ltd.)

【目的】ラクトフェリン（LF）は、乳、唾液、気道粘液などの外分泌液や、好中球の二次顆粒に含まれる鉄結合性糖タンパク質であり、抗菌・抗ウイルス活性、免疫調節作用、鉄吸収調節などの多様な生理機能を持つ。一方、インターフェロンλ（IFN-λ）は上皮細胞で産生され、上皮細胞自身が持つ受容体を介して抗ウイルス作用を発揮する。IFN-λは 2003 年に初めて報告され、従来知られていたⅠ型 IFN（IFN-α、IFN-βなど）やⅡ型 IFN（IFN-γ）とは異なり、Ⅲ型 IFN に分類されている。今回、ポリ I:C で刺激した腸管上皮細胞 HT-29 を用いて IFN-λ産生に及ぼす LF の影響を調べた。
【方法】HT-29 細胞は、10%ウシ胎児血清、100 unit/ml ペニシリン、100 µg/ml ストレプトマイシンを添加したマッコイ 5A 培地中で、5%CO_2、37℃で継代培養した。約 80%コンフルエントの細胞にトリプシン EDTA を加えて回収し、48 well プレートに 8×10^4 cells/well となるように播種して 2 日間培養した。次に、培地を除去して無血清培地（抗生物質無添加）で洗浄後、0 または 0.2 mg/ml ウシ LF、0.1 µg/ml ポリ I:C および 1 µl/well リポフェクタミンを含有する無血清培地 300 µl を添加し、24 時間処理した。また、LF 処理の順序を変えて、LF 前処理 1 または 3 時間後にポリ I:C とリポフェクタミン添加、LF をポリ I:C とリポフェクタミンと同時添加、ポリ I:C とリポフェクタミン添加 1 または 3 時間後に LF 後添加などの条件を試みた。さらに、LF 濃度の検討では、種々の LF 濃度で前処理 1 時間後、ポリ I:C とリポフェクタミンを添加して 24 時間処理した。処理後の培地上清中の IFN-λ1 濃度を ELISA キットで測定した。
【結果】HT-29 細胞にポリ I:C とリポフェクタミンを作用させると、培地上清中の IFN-λ濃度は顕著に増加した。さらに、LF 前処理 1 または 3 時間後にポリ I:C とリポフェクタミンを作用させると、LF 前処理なし(ポリ I:C とリポフェクタミンを作用のみ)の場合に比べて有意に IFN-λが増加した。IFN-λ濃度は、LF 前処理 1 時間＞LF 同時添加＞1 時間後 LF 後添加＞LF 前処理 3 時間＞3 時間後 LF 後添加の順で高値を示した。LF 前処理 1 時間後、細胞を洗浄し、ポリ I:C とリポフェクタミンを添加したところ、洗浄なしの場合より若干低いものの IFN-λの亢進がみられた。LF の作用には濃度依存性がみられ、LF 濃度 0.002 mg/ml でも無処理対照と比べると IFN-λが増加し、LF 濃度 0.02 mg/ml で IFN-λは最高レベルに達した。以上の結果から、LF は腸管上皮細胞に作用し、IFN-λ産生を亢進させることが明らかとなった。今後、上皮細胞へのウイルス感染に対する LF の防御作用において、IFN-λの果たす役割の検証が必要と考えられる。

lactoferrin, interferon lambda, HT-29 cells

講演番号：3G41p18
講演日時、会場：3 月 28 日 17:37～ G 校舎 41 会場

牛乳中エクソソームの RNA 解析とヒト細胞（THP-1）への作用

RNA analysis of Bovine Milk-derived Exosome, and its physiological effects on Human cells

○津田 宗哉[1]、和泉 裕久[1]、佐藤 洋平[1]、小坂 展慶[2]、落谷 孝広[2]、岩本 洋[1]、難波 和美[1]、武田 安弘[1]([1]森永乳業（株）栄養科学研究所、[2]国立がん研究センター研究所)
○Muneya TSUDA[1], Hirohisa IZUMI[1], Sato YOHEI[1], Nobuyoshi KOSAKA[2], Takahiro OCHIYA[2], Hiroshi IWAMOTO[1], Kazuyoshi NAMBA[1], Yasuhiro TAKEDA[1] ([1]Morinaga Milk Industry Co., Ltd., [2]National Cancer Center Research Institute)

【目的】　我々はこれまでにヒト母乳、牛乳、ラット乳の乳清中にマイクロ RNA（miRNA）と mRNA が存在することを示してきた。これら乳中 RNA は酸や RNase に耐性があることから、エクソソームのような膜小胞に含まれて存在していると考えられた。一方で体液中の RNA はエクソソーム以外の形態で存在することも知られている。今回、牛乳からエクソソーム画分と超遠心上清画分を調製し、各々に存在する RNA を明らかにするため検討を行った。さらに、牛乳中エクソソームがヒトに作用し得るかを明らかにするため、牛乳由来エクソソームのヒト細胞による取り込み、及びその作用について検討を行った。

【方法】　未殺菌生乳から得た乳清サンプルを、超遠心にかけることでエクソソーム画分と上清画分を調製した。両画分から定法に従って総 RNA を抽出・精製し、miRNA および mRNA マイクロアレイに供した（miRNA は miRbase Rel. 16.0 に基づく）。ヒト細胞による取り込みは、PKH67 で染色したエクソソームを、未分化および PMA でマクロファージ様に分化させた THP-1（ヒト単球性白血病細胞株）に添加し、洗浄後、フローサイトメーターと蛍光顕微鏡により解析した。さらに、分化させた THP-1 細胞にエクソソームを添加後、LPS による刺激を行い、培養上清中のサイトカイン量を測定した。

【結果】　マイクロアレイ解析の結果、miRNA は両画分から同程度検出されたが、いずれかの画分にのみ検出される miRNA も存在した。mRNA 検出数はエクソソームの方が圧倒的に多く、上清に検出された mRNA のほとんどはエクソソームにも検出された。ヒト細胞による取り込み検討の結果、未分化 THP-1 細胞による取り込みは認められなかったが、分化後 THP-1 細胞による取り込みは認められた。また、エクソソームの添加により、分化後 THP-1 細胞の上清中炎症性サイトカインの変動が確認された。以上のことから、牛乳由来エクソソームはヒト細胞に作用し得ると考えられた。

exosome, bovine milk, RNA

講演番号：3G41p19
講演日時、会場：3 月 28 日 17:48～ G 校舎 41 会場

牛乳ラクトフォリンがロタウイルスゲノムの転写および複製に与える影響

The effects of bovine milk lactophorin on rotaviral genomic transcription and replication

○稲垣 瑞穂[1]、大野 翔平[2]、小林 純子[3]、山田 佳太[4]、高橋 毅[5]、中込 とよ子[6]、中込 治[6]、金丸 義敬[2]、鈴木 徹[1] ([1]岐阜大院連農、[2]岐阜大応用生物、[3]北大院医、[4]大阪大谷大薬、[5]株式会社明治、[6]長崎大院医歯薬総合)

○Mizuho INAGAKI[1], Shohei Ohno[2], Junko Kobayashi[3], Keita Yamada[4], Takeshi Takahashi[5], Toyoko Nakagomi[6], Osamu Nakagomi[6], Yoshihiro Kanamaru[2], Tohru Suzuki[1] ([1]United Grad. Sch., Gifu Univ., [2]Dpt. Appl. Life Sci., Gifu Univ., [3]Hokkaido Univ., [4]Ohtani-Osaka Univ., [5]Meiji Co., Ltd., [6]Nagasaki Univ.)

【目的】ヒトロタウイルス（HRV）は、11 分節の二本鎖 RNA をゲノムとしてもつ乳幼児下痢症の主因ウイルスである。我々はこれまでに牛乳乳清糖タンパク質ラクトフォリンの 18kDa フラグメント（LP18）が HRV に対して強力な阻害活性を示すことを明らかにしてきた。しかし、LP18 がどのようなメカニズムで HRV 感染による下痢症状を緩和するかはよくわかっていない。我々は、LP18 を処理した細胞に HRV を感染させると、毒素領域をコードする非構造タンパク質 NSP4 などのウイルスタンパク質の合成が抑制されることを報告してきた（大野ら，2013 年農芸化学会にて発表)。この結果は、LP18 が＋鎖ウイルスゲノムからウイルスタンパク質への翻訳を抑制する可能性を示唆する。しかし、LP18 がウイルスゲノムの転写や複製に与える影響は明らかでない。本研究では、NSP4 遺伝子の＋鎖および－鎖の発現を定量することで、LP18 が①ウイルスゲノムの鋳型（－鎖）から＋鎖 mRNA への転写および②ウイルスゲノム＋鎖から－鎖の複製に与える影響について明らかにすることを目的とした。

【材料と方法】単層培養のアカゲザル腎臓 MA104 細胞にヒトロタウイルス MO 株（G3P[8]）を moi=6 で感染させた群（未処理群）を対照とし、ウイルス接種前に LP18 を 1 時間作用させた群（前処理群）およびウイルスと LP18 を同時に 1 時間添加した群（同時処理群）を作製した。いずれの処理群もウイルス接種 1 時間後に、2% FCS 添加培地に変換して 7 時間感染を継続させた。その後、細胞を回収して total RNA を抽出した。この total RNA より NSP4 特異的プライマーを用いて＋鎖および－鎖の cDNA を作成し、それぞれの cDNA をリアルタイム PCR 法により定量した。

【結果と考察】NSP4 遺伝子は、＋鎖、－鎖いずれのウイルスゲノムにおいても未処理群と比較して前処理群では約 80%、同時処理群は約 90%の発現抑制が見られた。以上の結果より、LP18 は NSP4 タンパクの発現を転写レベル、もしくはそれ以前のステップで抑制する可能性が示唆される。

lactophorin, rotavirus, infection

講演番号：3G41p20
講演日時、会場：3 月 28 日 17:59～ G 校舎 41 会場

形質細胞様樹状細胞における MHC class II 発現制御因子 CIITA の転写調節に対する PU.1 の役割
The role of PU.1 in the transcription of CIITA that is essential for MHC class II in plasmacytoid dendritic cells
○三浦 亮介[1]、笠倉 和巳[1]、中野 信浩[2]、前田 隆浩[3]、八代 拓也[1]、西山 千春[1]([1]東京理大・生物工、[2]順天堂大・医、[3]長崎大・医歯薬)
○Ryosuke Miura[1], Kazumi Kasakura[1], Nobuhiro Nakano[2], Takahiro Maeda[3], Takuya Yashiro[1], Chiharu Nishiyama[1] ([1]Dept. of Biol., Tokyo Univ. of Sci, [2]Sch. of Med., Juntendo Univ., [3]Dept. of Com. Med., Grad. Sch. of Biomed., Univ. of Nagasaki)

[目的]樹状細胞は抗原提示による獲得免疫系の始動、サイトカイン産生による免疫応答の調節など、多様な機能を持ち、様々なサブセットを持つ細胞である。獲得免疫系の始動において、樹状細胞は体内に侵入した抗原を貪食し、細胞膜表面タンパク MHC class II 上に抗原由来ペプチドを提示する。MHC class II の転写では転写共役因子 CIITA が主要な働きをするが、CIITA 遺伝子はヒト、マウス共に少なくとも 3 つのプロモーターを持ち(上流より CIITA-1、3、4)、細胞種ごとに使い分けられている。我々は現在までに、マウス骨髄細胞から GM-CSF で分化誘導したコンベンショナル樹状細胞において、血球系細胞に特徴的な DNA 結合転写因子 PU.1 が CIITA-1 の転写制御を介して MHC class II の発現を間接的に調節することを明らかにしている。また過去の報告から、Notch シグナルによりマスト細胞が CIITA を発現する際や、B 細胞が CIITA を発現する際にも、PU.1 が CIITA-3 プロモーターの転写調節を行うことが知られている。すなわち、PU.1 は少なくとも 2 種の CIITA バリアントのプロモーターを稼働させる能力を持つ転写因子である。樹状細胞サブセットの一種である形質細胞様樹状細胞(pDC)の場合、CIITA-3 が優位に発現することが知られるが、pDC における CIITA-3 転写調節機構は不明である。そこで、pDC における CIITA-3 転写調節機構への PU.1 の寄与を明らかにすることを目的とし、本研究に着手した。

[方法と結果]ヒト pDC 様細胞株 CAL-1 に対し PU.1 siRNA を導入した際、PU.1 と共に CIITA-3 の mRNA 量も低下した。また、CIITA-3 の転写開始点を含む約 600 塩基の 5’-フランキング領域及び段階的に 5’側を欠失した領域をレポータープラスミドに挿入して、CAL-1 を用いてルシフェラーゼアッセイを行った結果、CIITA-3 プロモーター上に複数の転写活性化領域が特定された。293T を用いて、PU.1 共発現下でのルシフェラーゼアッセイを行い、PU.1 結合部位を絞り込むと共に、PU.1 結合配列への変異導入によりプロモーター活性が著しく低下することを確認した。さらに ChIP アッセイを行い、これらの領域に PU.1 の結合が確認された。現在、EMSA にて、ヒト CIITA-3 プロモーターへの PU.1 が結合することが直接的であることを検証すると共に、マウス骨髄由来培養 pDC や脾臓由来 pDC を用いてマウス CIITA-3 発現への PU.1 の寄与を解析している。

PU.1, MHC class II, pDC

講演番号：4A32a01
講演日時、会場：3 月 29 日 09:00～ A 校舎 32 会場

耐熱性放線菌由来の新規 PET 分解酵素の分解特性

Biochemical characterizaion of a novel PET-degrading cutinase-type enzyme from Saccharomonospora viridis AHK190

○河合 富佐子[1]、飯嶋 悠司[1]、織田 昌幸[2]、水嶋 裕樹[3]、宮川 拓也[3]、田之倉 優[3] ([1]京工繊大繊科セ、[2]京府大院生環科、[3]東大院農生科)
○Fusako Kawai[1], Yuji Iijim[1], Masayuki Oda[2], Hiroki Mizushima[3], Takuya Miyakawa[3], Masaru Tanokura[3] ([1]Kyoto Inst. Technol., [2]Kyoto Pref. Univ., [3]Univ. Tokyo)

【目的】ポリエチレンテレフタレート(PET)は最強のポリエステルであり、一般的にポリエステルという場合は PET を示し、パッケージ、容器類から繊維まで幅広い用途に使用されている。しかし、芳香族ポリエステルである PET の分解は脂肪族に比べるとはるかに困難なため分解酵素は極めて限定される。河合らは *Thermobifida alba* AHK119 由来のタンデム酵素を報告しているが、これらの PET 分解は不十分である。そこでより強い分解能が期待される堆肥由来 *Saccharomonospora viridis* AHK190 から新たに分解酵素遺伝子のクローニングを計画した。PET 分解酵素は繊維の高度化加工、廃棄ポリエステル処理、モノマーリサイクル等への応用が期待される。本研究ではより強力な polyesterase を構築するために、PET 分解酵素の生化学特性、特にポリエステル分解特性の解析を行った。
【方法】*S. viridis* DSM43017 のゲノム情報及び相同酵素の情報に基づいて primer を設計し、PCR により *cut190* の ORF をえた。これを pQE-80L の *Bam*H1 及び *Hin*dIII 制限部位に連結し、*E. coli* Rosetta-gami B (DE3)に導入して、IPTG 誘導により recombinant Cut190 を可溶性酵素として発現させた。発現酵素は N 末端に 6xHis を有し、Ni-NTA affinity chromatography により精製した。酵素活性は *p*-nitrophenol butyrate (pNPB)及び poly(butylene succinate-*co*-adipate) (PBSA)分解活性で測定した。
【結果】Cut190 は *p*-nitrophenol acyl esters に対する活性が C4 及び C6 で高く、C2, C8 以上では著しく低下することから lipase family に属する cutinase-type の酵素と判断した。本酵素は Ca^{2+}により活性化され、かつ耐熱性が増加する[1]。特にポリエステルの分解は Ca^{2+}の非存在下では安定せず、Ca^{2+}による活性型酵素への変換が推定された。しかし、Ca 結合領域は存在せず、新規な変換機構による Ca 活性化酵素と考えられた。このような Ca^{2+}による活性型への変換は他の cutinases では報告されていない。pNPB 及び PBSA に対する最適 Ca 濃度の影響は大きく異なり、それぞれ 300mM<及び 5-25mM であった。又、Ca 濃度 0mM, 25mM, 300mM では近赤外領域の円偏光二色性が異なり、3 次構造の変化が推定されたことから、酵素-ポリマー複合体の形成には Ca に誘導されて適正な活性型構造が形成されると考えられた。変異解析の結果、Cut190(S226P/R228S)が耐熱性に最も優れ、脂肪族から芳香族までの幅広いポリエステルの分解能を有した。変異型酵素は 65°C で PET film をもよく分解し、走査電顕による顕著な表面構造の変化と重量減少が認められた。

[1] Kawai F, Oda M, Tamashiro T, Waku T, Tanaka N, Yamamoto M, Mizushima H, Miyakawa T, Tanokura T., Appl. Microbiol. Biotechnol., **2014**, 98: 10053-10064.

PET-degrading cutinase, Thermophilic cutinase, Ca^{2+}-enhanced thermostability and activity

講演番号：4A32a02
講演日時、会場：3 月 29 日 09:11～ A 校舎 32 会場

PET 分解酵素 Cut190 の Ca^{2+}依存的な活性化及び耐熱化の構造基盤
Structural basis for the Ca^{2+}-enhanced activity and thermostability of PET-degrading enzyme Cut190

○宮川 拓也[1]、水嶋 裕樹[1]、大塚 淳[1]、織田 昌幸[2]、河合 富佐子[3]、田之倉 優[1]([1]東大院・農生科、[2]京府大院・生環科、[3]京工繊大・繊科セ)
○ Takuya MIYAKAWA[1], Hiroki MIZUSHIMA[1], Jun OHTSUKA[1], Masayuki ODA[2], Fusako KAWAI[3], Masaru TANOKURA[1] ([1]Grad. Sch. Agr. Life Sci., Univ. Tokyo, [2]Grad. Sch. Life Environ. Sci., Kyoto Pref. Univ., [3]Kyoto Inst. Technol.)

【目的】ポリエチレンテレフタレート（PET）は、ペットボトル等の容器から繊維に至るまで幅広く利用されているポリエステルである。PET はその物理化学的特性から極めて生分解され難いが、その PET を分解する酵素として、我々は *Saccharomonospora viridis* AHK190 からクチナーゼ様タンパク質 Cut190 を同定し、その活性と熱安定性が高濃度のカルシウムイオン（Ca^{2+}）存在下で上昇することを見出した。本研究では Cut190 の活性化と耐熱化をもたらす Ca^{2+}の作用機序を明らかにすることを目的とし、Cut190 の Ca^{2+}結合型と非結合型の結晶構造を解析した。
【方法】Cut190 の耐熱化変異体（S226P 変異体, $Cut190^{S226P}$）を精製・結晶化し、放射光施設 Photon Factory にて X 線回折実験を行った。Ca^{2+}非存在下で取得した結晶の X 線回折データを収集し、分子置換法により構造決定した。また、100 mM $CaCl_2$ 条件下で得られた結晶については、波長 0.90, 1.90 Å で異常分散データを収集し、構造決定と Ca^{2+}結合位置の解析を行った。
【結果】$Cut190^{S226P}$ の Ca^{2+}結合型と非結合型の結晶構造を分解能 1.75, 1.45 Å でそれぞれ決定した。$Cut190^{S226P}$ はエステラーゼやリパーゼに見られる典型的な α/β-hydrolase fold を形成し、触媒三残基（Ser176, Asp222, His254）もまた空間的によく保存されていた。Ca^{2+}非結合型において、Phe106 の側鎖フェニル基が Ser176 及び His254 の近傍に位置することにより、活性部位の空間が狭められていた。さらに、Phe106 の主鎖アミノ基は活性に必須な oxyanion hole として機能すると考えられたが、その配向は約 90º 異なって oxyanion hole が崩れていた。これらの構造的特徴は、$Cut190^{S226P}$ が Ca^{2+}非存在下で不活性状態をとり易いことを強く示唆する。一方、Ca^{2+}存在下で取得した結晶の異常分散データに基づいて、Ca^{2+}は 2 つの β ストランド（β1 及び β2）をつなぐループ（β1-β2 ループ）に結合していることが明らかとなった。Ca^{2+}には β1-β2 ループ上の主鎖カルボニル基、Asn133 の側鎖カルボニル基、2 つの水分子が tetragonal bipyramidal array で配位し、複数の相互作用が新たに形成されていた。この相互作用により、結晶構造の温度因子が相対的に高い β1 ストランドと β1-β2 ループが固定されることで、Cut190 の熱安定性が高まる機構が推定された。さらに興味深いことに、Ca^{2+}の結合は β1-β2 ループに加えて隣接する 2 つのループに大きな構造変化を誘起した。これにより、Phe106 の側鎖が活性部位の外側に約 90º 回転するとともに、主鎖アミノ基の配向も変化して oxyanion hole が形成され、Cut190 は活性状態をとっていた。以上の結果は、Ca^{2+}がアロステリック制御因子として Cut190 の活性化に機能することを示している。

polyethylene terephthalate, cutinase, X-ray crystallography

講演番号：4A32a03
講演日時、会場：3 月 29 日 09:22～ A 校舎 32 会場

深海由来 *Novosphingobium* sp. MBES04 株のリグニン代謝関連酵素群の特性解析
Characterization of Lignin-metabolizing enzymes of *Novosphingobium* sp. MBES04 from Deep-sea.

○佐藤 玲央奈[1,2]、大田 ゆかり[2]、西 真郎[2]、小林 樹和[2]、坪内 泰志[2]、秦田 勇二[1,2] ([1]横浜市立大生命ナノ、[2]海洋研究開発機構)
○Reona Sato[1,2], Yukari Ohta[2], Shinro Nishi[2], Kiwa Kobayashi[2], Taishi Tsubouchi[2], Yuji Hatada[1,2] ([1]Yokohama City Univ., [2]JAMSTEC)

【目的】木材を構成する主成分であり、高分子芳香族化合物であるリグニンは種々の有用ケミカルへの利用が期待されている。発表者らの研究グループでは、深海沈木サンプルよりリグニン関連芳香族化合物を代謝するバクテリア群を採取し、その系統解析及び代謝解析を行っている。その概要に関しては昨年度の本大会において発表した。本発表ではそれらの微生物群の中から、強いリグニン代謝能を有した *Novosphingobium* に属する MBES04 株に関して報告する。本菌株は、リグニン 2 量体モデル分子（GGGE）を出発原料としてフェニルプロパン系芳香族モノマー（GHP）を高効率で生成することができる（GHP は、エンジニアプラスチック素材としてのポテンシャルを持つ)。MBES04 株の GGGE 代謝機構を調べる為に本菌株のゲノム解析を行った結果、GGGE の *β*-O-4 結合の還元的開裂に必要な遺伝子群が推定でき、これら GGGE 代謝関連遺伝子群にコードされる諸酵素の生化学的解析を行い、得られた知見に関して報告する。

【実験方法および結果】ゲノム配列情報に基づく相同性検索の結果、MBES04 株における GGGE 代謝遺伝子の候補として short-chain dehydrogenase／reductase (SDR)遺伝子および Glutathione S-transferase(GST)遺伝子を取得した。大腸菌を宿主に各遺伝子を発現させ組換え酵素を取得し、Ni キレートカラムを用いて精製した。GGGE を出発基質として各精製酵素の反応物を LC-MS で同定し、さらに旋光度検出器を用いて光学異性体の認識を調べた。その結果、SDR3 が GGGE-C*α* 位炭素上の S 配置のアルコール性水酸基をカルボニル基へ、また、SDR5 が同 R 配置の水酸基をカルボニル基へ酸化する酵素であることが確認された。また、GST4 にコードされるタンパク質は GGGE-C*α* 位カルボニル誘導体のうち、C*β* 位置の立体配置が S 配置の場合に、また、GST5 は C*β* 位置の立体配置が R 配置の場合に、各々*β*-O-4 結合を還元的に開裂する酵素であった。また、GST6 は、GST4 の反応生成物を GHP へと変換する酵素であり、特に GST3 は GST4 および GST5 の反応生成物の両方を GHP に変換可能な酵素であることが明らかになった。全体として、各酵素が光学異性体を相補的に認識しており、段階的に反応が行われている。また各酵素の酵素反応に対する温度、pH の影響を調べた結果では、傾向として常温、弱アルカリ性条件において高い活性が見られた。

Deep-sea, Lignin, Bacteria

講演番号：4A32a04
講演日時、会場：3 月 29 日 09:33～ A 校舎 32 会場

澱粉またはショ糖を主要原料とした *Trichoderma reesei* セルラーゼの効率的生産系の構築

Development of an efficient production system of *Trichoderma reesei* cellulases using starch or sucrose as main carbon source

○池 正和、田伏 美峰、徳安 健（農研機構・食総研）
○Masakazu IKE, Mine TABUSE, Ken TOKUYASU (NFRI, NARO)

【目的】我々は、地域農業・食品産業由来の繊維質資源の高度利用による産業活性化を目指し、国産繊維質資源を原料とした糖液製造技術開発を行っている。この中で、酵素糖化コストの低減が大きな課題であり、酵素の利用・生産の両面から総合的に技術開発を進めている。酵素生産に関しては、セルラーゼ生産微生物 *Trichoderma reesei* のグルコース抑制解除株を用いた可溶性炭素源連続フィード培養による生産技術について報告している [1), 2)]。供給糖源の組成や供給量を制御することで、高い酵素生産性を維持しつつ、生産酵素の組成制御が可能となるため、様々な変換プロセスに適した糖化酵素の効率的生産に有効性を発揮するものと期待される。現在、本技術をベースに、安価原料からの多種多様な糖化酵素製造技術や酵素長期安定生産ついて重点的に検討を進めている。本研究では、酵素生産原料コスト低減に向け、澱粉系やショ糖の原料を利用した *T. reesei* セルラーゼ生産系の構築を目的とした。

【方法・結果】グルコース存在下でも効率的なセルラーゼ生産が可能な *T. reesei* M2-1 株を用いて、主要炭素源としてのグルコースとセルラーゼ誘導物質としてのセロビオースの混合液（G + C2）を基本条件とし、グルコースを可溶性澱粉（St + C2）またはショ糖（Suc + C2）に変更してバッチ培養を行った際のセルラーゼ生産特性を評価した。St + C2 では、基本条件と比較して、若干のセルラーゼ生産性の低下が認められた一方、可溶性澱粉を予めα-アミラーゼで部分分解することで、良好なセルラーゼ生産性が達成された。Suc + C2 では、ほとんど酵素が生産されなかった上、菌体増殖もほぼ認められなかった。本菌がゲノム上にインベルターゼ遺伝子を有しないという情報と合致した結果となった。そこで、Suc + C2 液にインベルターゼを添加し、Suc を単糖（グルコース＋フラクトース）に分解したところ、基本条件よりは低いものの、セルラーゼ生産が観察された。そこで、インベルターゼで処理をした Suc + C2 液を添加糖液として、連続フィード培養（添加速度：約 14g/L/day）による酵素生産を行ったところ、投入炭素源あたりのセルラーゼ生産効率は、およそ 270 FPU（濾紙崩壊活性）/g-炭素源であり、基本条件（G + C2）での連続フィード培養（280 – 320 FPU/g-炭素源）に匹敵する値であった。本発表では、澱粉系原料を利用した連続フィード培養による酵素生産特性評価に関しても併せて報告する。

1) Ike M, *et al.*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 87, 2059-2066 (2010)
2) Ike M, *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 77**,** 161-166 (2013)

cellulase, enzyme production, *Trichoderma reesei*

講演番号：4A32a05
講演日時、会場：3 月 29 日 09:44～ A 校舎 32 会場

バイオマス工学利用へのトリコデルマリーゼイ由来キシラナーゼ遺伝子の発現検討

Expression of Xylanase genes from Trichoderma ressei in E. coli system for biomass engineering

○岸川 昭太郎、村田 武英、小幡 裕一 (理研バイオリソースセンター)
○Shotaro KISHIKAWA, Takehide MURATA, Yuichi OBATA (RIKEN BioResource Center)

世界的な環境・エネルギー問題の解決策としてバイオマスの有効利用は喫緊の課題であり、食料と競合しない木質系バイオマス利用の取り組みが進められている。理研バイオリソースセンター(BRC)では、ライフサイエンス研究の発展と社会的課題解決に資する遺伝子材料の開発と整備を進めており、その一環として木質系バイオマスの糖化に必要なセルラーゼ関連遺伝子の収集と提供を行っている。さらに研究者に有効に活用してもらうため、それらセルラーゼ関連遺伝子を異種発現させ、至適pHや至適温度などの酵素の特性を明らかにし、付加情報として公開を進めている。

これまで、*Trichoderma reesei*と超好熱古細菌パイロコッカス属由来の25種類の糖化酵素遺伝子を収集し、それら遺伝子を大腸菌での菌体内発現用および菌体外分泌用発現ベクターに組込み提供を行っている。菌体内発現用プラスミドは、これまでの酵素のN末端にT7タグ、C末端にHisタグが付加された融合タンパク質を発現するタイプから、発現タンパク質の可溶化度の上昇が示されたN末端にHATタグとそのタグを切り離すためのTEVプロテアーゼ認識配列を持つ融合タンパク質を発現するものに変更し、*T. reesei*由来のキシラナーゼ遺伝子3種（xyn1, xyn2, xyn3）について検討を行った。SDS-PAGEにおいて発現させた組換えタンパク質のHAT-XYN2は可溶画分に認められた。キシランを基質とした酵素活性測定において、HAT-XYN2とHAT-XYN3の可溶画分に酵素活性を認めることができ、それぞれ115.8 U/mgと4.6 U/mgを示した。今回報告するキシラナーゼ遺伝子の発現プラスミドを含む糖化酵素遺伝子およびそれら発現プラスミドは、理研バイオリソースセンター 遺伝子材料開発室より提供している。

理研バイオリソースセンター（BRC)：http://ja.brc.riken.jp/
理研BRC 遺伝子材料開発室：http://dna.brc.riken.jp/ja/

biomass, xylanase, Trichoderma

講演番号：4A32a06
講演日時、会場：3 月 29 日 10:05～ A 校舎 32 会場

Rhodovulum sulfidophilum T7 RNA ポリメラーゼ発現株を用いた細胞外 RNA 生産系
T7 RNA polymerase-based extracellular RNA production system using *Rhodovulum sulfidophilum*

○長尾 信義[1]、米川 千夏[1]、梅影 創[1]、菊池 洋[2,3]（[1]豊橋技大工、[2]早稲田大先進理工、[3]豊橋技大 RAC）
○Nobuyoshi NAGAO[1], Chinatsu YONEKAWA[1], So UMEKAGE[1], Yo KIKUCHI[2,3] ([1]Toyohashi Univ. Tech., [2]Waseda Univ., [3]RAC, Toyohashi Univ. Tech.)

リボザイムやアプタマー、siRNA などの機能性 RNA は、核酸医薬として応用されようとしている。ラボスケールの研究から実用に至るまで、多量の RNA を合成することが必要となる。しかしながら、試験管内転写や有機合成といった現在用いられている RNA 生産手法は、コストの面で問題を抱えている。それゆえに、任意の機能性 RNA を安価に生産するための技術開発が求められている。
我々はこれまでに、海洋性光合成細菌 *Rhodovulum sulfidophilum* を用いた機能性 RNA の細胞外生産技術の開発を行ってきた。この細菌は増殖と同時に自身の核酸を細胞外へ放出するという特徴を持つ。この性質を利用し、目的の機能性 RNA を細胞外に生産させることで、細胞の破砕を必要としない簡便な RNA 生産が可能となる。これまでに、本細菌を用いて、ストレプトアビジンに結合する RNA アプタマーと short hairpin RNA (shRNA)の細胞外生産に成功している（1, 2）。しかしながら、最大生産量は培養液 1 L あたり約 200 ng であり、実用のために十分であるとはいえなかった。そこで我々は、より活性が高い RNA ポリメラーゼを利用することで、RNA 生産量の増大を試みた。
バクテリオファージ由来の T7 RNA ポリメラーゼは、試験管内転写による RNA 合成や、微生物を用いたタンパク質の大量発現などに広く用いられている。まず、T7 RNA ポリメラーゼを *R. sulfidophilum* DSM1374 株に発現させることができるか否かを検討した。細胞内で T7 RNA ポリメラーゼ遺伝子を転写するためのプロモーターとして、内因性の *puc* プロモーターを採用した。このプロモーターには光応答性があるため、培養条件によって活性を制御できる。*puc* プロモーター配列、T7 RNA ポリメラーゼ遺伝子配列、およびゲンタマイシン耐性遺伝子配列を相同組換えによって本細菌の *recA* 遺伝子部位に挿入した。この変異体についてウェスタンブロットにて解析した結果、T7 RNA ポリメラーゼが発現していることが示された。続いて、T7 RNA ポリメラーゼの発現が本細菌の生育に与える影響を検証するため、培養条件を検討した。その結果、好気暗条件および約 2500 lx の嫌気明条件では野生株とほぼ同等の生育を確認した。一方で、約 10000 lx の嫌気明条件では生育が阻害されていることが示唆された。本大会では、この変異体を用いた細胞外 RNA 生産系について報告する。

1) H. Suzuki, S. Umekage, T. Tanaka and Y. Kikuchi: *J. Biosci. Bioeng.*, **112**, 458-461, (2011).
2) N. Nagao, H. Suzuki, R. Numano, S. Umekage and Y. Kikuchi: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, in press

extracellular nucleic acid, *Rhodovulum sulfidophilum*, RNA production

講演番号：4A32a07
講演日時、会場：3 月 29 日 10:16～ A 校舎 32 会場

担子菌酵母における異種タンパク質分解のリン酸による制御

Phosphoric acid controls proteolysis of a heterologous protein in a basidiomycetous yeast

○吉崎 稔[1,2]、正木 和夫[1,2] ([1]広島大学、[2]独立行政法人酒類総合研究所)
○Minoru YOSHIZAKI[1,2], Kazuo MASAKI[1,2] ([1]Hiroshima Univ., [2]National Research Institute of Brewing)

Cryptococcus sp. S-2（以下 S-2 株）は、酒類総合研究所にて単離された担子菌酵母である。S-2 株はキシロースで誘導可能なキシラナーゼプロモーターを使用し、新規の異種タンパク発現システムとして期待される。これまでに、遺伝子組み換えによりキシラナーゼプロモーターの下流に S-2 株のセルラーゼ遺伝子を導入し、セルラーゼ高発現株を作成した。さらに、S-2 株のセルラーゼに *Trichoderma reeesei* CBH I 由来の CBD（Cellulose Binding Domain）を融合したセルラーゼ（セルラーゼ - （CBD)）を作成し、結晶性セルロース分解能を向上させることに成功した。しかし、組み換え酵母はセルラーゼ - （CBD）発現時に CBD の一部が切断された状態で分泌する現象が確認された。そこで、CBD の一部が切断されない条件の探索を目的とした。

まず、セルラーゼ - （CBD）遺伝子を組み込んだ S-2 株の培養における培地中（6%　キシロース、1%　酵母エキス）の pH、緩衝液の種類、緩衝液濃度の検討を行った。その結果、100 mM リン酸ナトリウム緩衝液（pH6.0）を培地に加えることで CBD の切断が起こらないことが分かった。一方で、CBD の切断は起こらなかったが分泌生産量が半分に減少した。これらの現象から、100 mM リン酸ナトリウム緩衝液（pH6.0）はキシラナーゼプロモーターによる発現を抑制すると考えられた。また、100 mM リン酸ナトリウム緩衝液（pH6.0）は CBD の一部を切断するプロテアーゼの発現を抑制することが考えられた。

次に、キシラナーゼプロモーターを用いた他の酵素生産株（アミラーゼ、セルラーゼ、ポリガラクチュロナーゼ）において、培地中の 100 mM リン酸ナトリウム緩衝液（pH6.0）による発現抑制の有無を調べた。その結果、セルラーゼ - （CBD）と同様にこれら全ての酵素生産株の分泌生産量が低下した。一方で、生産された酵素（アミラーゼ、セルラーゼ、ポリガラクチュロナーゼ）の切断は観察されなかった。

キシラナーゼプロモーター以外のプロモーターでリン酸による発現抑制の有無を、マルトースで誘導される S-2 株（親株）のアミラーゼプロモーターを用いて調べた。その結果、アミラーゼプロモーターにおいては 100 mM リン酸ナトリウム緩衝液（pH6.0）による分泌生産量の低下は見られなかった。

したがって、培地中に存在する 100 mM リン酸はキシラナーゼプロモーターに対して発現抑制すると共に、CBD を切断するプロテアーゼの発現も抑制すると考えられる。

recombinant protein, proteolysis, basidiomycetous yeast

講演番号：4A32a08
講演日時、会場：3 月 29 日 10:27～ A 校舎 32 会場

Coprinopsis cinerea に存在する新規 CaMK(CoPK02)の解析
Characterization of a novel CaM kinase (CoPK02) in *Coprinopsis cinerea*
○山下 雅史、片山 将一、千賀 由佳子、杉山 康憲、末吉 紀行、亀下 勇（香川大農）
○Masashi YAMASHITA, Syouichi KATAYAMA, Yukako SENGA, Yasunori SUGIYAMA, Noriyuki SUEYOSHI, Isamu KAMESHITA (Kagawa Univ.)

プロテインキナーゼ(PK)によるタンパク質リン酸化反応は、様々な生物においてその生命現象を制御する重要な機構である。担子菌は成長の過程において、菌糸から子実体へとダイナミックな形態変化を行うことが知られている。我々は、PK を幅広く検出するマルチ PK 抗体を開発し、それを用いることにより担子菌の生活環において様々な PK が発現変動することを見出している。また、Ca^{2+}刺激の細胞内受容タンパク質として知られる Calmodulin (CaM)の阻害剤を培地に添加することにより菌糸成長が阻害されることを示し、Ca^{2+}/CaM 依存性プロテインキナーゼ(CaMK)が菌糸成長において重要な役割を持つ可能性を示唆した。以前我々は、担子菌のモデル生物である *Coprinopsis cinerea* を用いた発現クローニングにより、CaMK と思われる PK を含む新規酵素を数種類見出した。その中で CoPK12 と名付けた PK は、動物の多機能性 CaMK とは酵素学的性質が異なるユニークな CaMK であることを報告した。さらに *C. cinerea* には CoPK12 以外にもう 1 種類別の CaMK が存在することを見出し、“CoPK02”と命名した。そこで本研究では、*C. cinerea* から新たに見つかった CoPK02 について、その酵素学的性質を調べることにした。

CoPK02 は、580 アミノ酸からなる分子量 64 kDa のタンパク質であり、その触媒ドメインには、PK に特徴的な 12 ヶ所のサブドメインが高度に保存されていた。また、そのアミノ酸配列について他の PK のアミノ酸配列と比較解析を行ったところ、CaMKII と高い相同性が見られた。CoPK02 を大腸菌で発現し、その精製酵素を用いて酵素化学的性質を調べてみた。CoPK02 は、Ser/Thr キナーゼを広く検出する M8C 抗体と反応し、CaM-overlay 法でも検出されることから *C. cinerea* の新規 CaMK であることが示された。また、CoPK02 の様々な C 末端欠損変異体を作製し、CaM-overlay 法を用いて調べることにより、CaM 結合部位が 338-360 の領域に存在することを明らかにした。次に、RT-PCR 法を用いて *C. cinerea* 各成長ステージにおける CoPK02 の発現変化を調べたところ、成長ステージによる変動は見られなかった。また CoPK02 は、Ca^{2+}/CaM 依存的にキナーゼ活性を示し、Histone や MBP などの塩基性タンパク質を好んでリン酸化した。また、*C. cinerea* の菌糸と成熟子実体に存在する内在性基質タンパク質を調べるために、粗抽出液を MicroRotofor によって等電点分離したサンプルを CoPK02 によってリン酸化させたところ、細胞内タンパク質に関しても塩基性タンパク質画分に多数の基質タンパク質が見出された。以上の結果より、CoPK02 は *C. cinerea* に存在する新規 CaMK であることが明らかになった。

Cam kinase, *Coprinopsis cinerea*, protein kinase

講演番号：4A32a09
講演日時、会場：3 月 29 日 10:38～ A 校舎 32 会場

好熱性ファージφOH2 由来溶菌酵素 holin によるガン細胞のアポトーシス誘導

Apoptosis induction of cancer cell by holin from the thermophilic phage φOH2

○黒木 未知瑠、原田 額郎、マルトノ ヒンドラ、片倉 喜範、土居 克実 (九大院生資環)
○Michiru KUROKI, Gakurou HARADA, Hindra MARTONO, Yoshinori KATAKURA, Katsumi DOI (Kyushu Univ)

【目的】近年、ガンの遺伝子治療について様々な研究が行われているが、依然として安全かつ効果的にガン細胞を死滅させる能力を有する新たな遺伝子または遺伝子産物が必要とされている。当研究室では、その候補として好熱性ファージφOH2[1)] 由来の溶菌酵素 Holin (Hol) を選択した。Hol は宿主細菌の細胞膜に重合し、穿孔することで溶菌を誘導する。他方、動物細胞において Bax/Bak はミトコンドリア外膜を穿孔し、ミトコンドリア外膜透過性 (MOMP) を亢進することでアポトーシスを誘導する。我々は、この一見異なる MOMP 亢進と溶菌との間に、細胞膜穿孔による細胞致死という類似点を見出し、ガン細胞内で Hol を発現させることで、MOMP 亢進によるアポトーシスが誘導できるか検討し、Hol を用いた新規ガン遺伝子治療への応用を試みている。
【方法】まず、φOH2 ゲノムを鋳型に hol 遺伝子を PCR 増幅し、ドキシサイクリン(dox)による発現誘導が可能な pRetroX-TetOne-Puro ベクターにクローニングした。この際、Hol のミトコンドリア局在による細胞死の効果を検討するために、ミトコンドリア移行シグナル (MTS) を付加した mts::hol カセットも同様にクローニングした。次に、レトロウイルスを用いて組換えプラスミドをヒト肺腺ガン細胞 (A549 細胞)にインフェクションした。得られた形質導入細胞内での hol 誘導は、qRT-PCR により確認し、Hol タンパク質の発現は Western blotting により確認した。また、dox による Hol 発現誘導後の細胞生存率は血球計算盤を用いたセルカウントで求めた。また、細胞の生死判定は PI 染色後、IN Cell Analyzer 1000 を用い行った。アポトーシス誘導は Caspase-3,7 抗体を用いた Western blotting により検討した。
【結果・考察】形質導入 A549 細胞では、dox 濃度依存的に hol の転写量は増大し、また、Hol タンパク質生産も確認された。また、Hol 発現 96 時間後では、A549 細胞の生存率は 65%程度減少し、MTS を付加した場合、80%以上減少した。mts::hol を形質導入した A549 細胞において発現誘導後、死細胞を PI 染色したところ、クロマチン凝集が確認できた。さらに、MTS-Hol の発現により、Caspase-3,7、の活性化が誘導されていることが確認された。以上より、Hol は A549 細胞に細胞致死をもたらし、特に、ミトコンドリアに局在させることで、Bax/Bak と同様にアポトーシスを誘導していると考えられた。

1) Doi et al., Genome Announc., 1(4), e00634-13 (2013).

holin, apoptosis, cancer gene therapy

講演番号：4A32a10
講演日時、会場：3 月 29 日 10:49～ A 校舎 32 会場

酵素固定化電極による継続的還元反応

Continuous reduction reaction with enzyme modified electrode.

○櫻井 伸樹[1]、田中 恵理[2]、東条 直樹[2]、吉田 健太郎[2]、小野 哲也[2]、柏木 良友[2]([1]JNC 株式会社水俣研究所、[2]奥羽大学薬学部)
○Nobuki SAKURAI[1], Eri TANAKA[2], Naoki TOUJOU[2], Kentarou YOSHIDA[2], Tetsuya ONO[2], Yoshitomo KASHIWAGI[2] ([1]JNC corporation Minamata Research Center, [2]School of medicine, Ohu Univ.)

【背景・目的】

環境負荷を低減する手段の一つとして生体触媒である酵素の産業利用が検討されている。なかでも酸化還元酵素は、医薬や農薬などの中間体として重要な化合物である光学活性アルコールの不斉還元反応による合成に利用できる可能性を有している。酵素により触媒される酸化還元反応には基質との間で直接電子やプロトンの授受を行う補酵素と呼ばれる化学物質が目的反応に見合った量だけ必要となる。補酵素としてニコチンアミドアデニンジヌクレオチド（NADH）、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸（NADPH）、フラビンアデニンジヌクレオチド（FAD）などが知られているが、これらは一般的に高価である。そのため工業スケールでの製造において酸化還元酵素を利用する際には補酵素の使用量に関する課題を解決しなければならない。その一つとして近年では、目的の酸化還元反応と補酵素の再生反応を共役させることによって補酵素をリサイクルする手法が開発されている。しかしながらこの手法を用いる際には補酵素再生反応に関与する酵素と基質を目的の反応系に加える必要があるため、それらのコストと補酵素再生反応で生じる生成物の除去という点で問題があった。ところで酵素を固定した電極が酵素燃料電池やバイオセンサーに用いられている。これらの電極反応では酵素と電極との間を電子が直接、あるいは電子移動メディエーターを介して間接的に移動している。そこで電極に、電子移動メディエーター、補酵素、補酵素再生に必要な酵素、目的反応に必要な酵素を固定し、電圧を印加することで補酵素の再生と酸化還元反応が同時に進行するのではないかと考え、合成反応に利用することが可能な酵素固定化電極を開発した。

【方法・結果】

高分子化合物で被覆されたグラファイトフェルトに電子移動メディエーターとしてピロロキノリンキノン、補酵素再生のための酵素としてジアホラーゼ、補酵素として NADH、酸化還元酵素としてアルコールデヒドロゲナーゼを固定し酵素固定化電極を作製した。この酵素固定化電極と対極、参照電極を溶液に浸して電圧を印加したところギ酸の還元反応が溶液中のギ酸が全て消費されるまで進行し、ほぼ 100%の変換率でメタノールが生成した。また、その電流効率は 99.9%以上であった。この結果から酵素固定化電極では還元反応と同時に補酵素が再生されることが示された。さらに、反応に投入された電子のほぼ全てがギ酸の還元反応に使用されたことが示された。我々は上記反応の他に本酵素固定化電極を用いてアミノ酸ラセミ体からの L 体の特異的還元による 2-アミノアルコールの生成、二酸化炭素からのメタノール生成に成功している。

mediator modified electrode, continuous reaction, pyrroloquinoline quinone

講演番号：4A34a01
講演日時、会場：3 月 29 日 09:00～ A 校舎 34 会場

有機質肥料活用型養液栽培に適した微量金属元素供給資材の開発

Development of supplement of minor metal nutrients suitable for organic hydroponics

○篠原 信[1]、太田 香菜子[2]、藤原 和樹[1]、安藤 晃規[3,4]、宮本 憲二[5]、加藤 康夫[6]、浅川 晋[7]、小川 順[3,4,8]、高野 雅夫[2] ([1]農研機構、[2]名大院・環境、[3]京大院農・応用生命、[4]京大・生理化学、[5]慶大・理工、[6]富山県立大工・生工研セ、[7]名大院・生命農、[8]京大農・応用生命)

○Makoto SHINOHARA[1], Kanako Ota[2], Kazuki Fujiwara[1], Akinori Ando[3,4], Kenji Miyamoto[5], Yasuo Kato[6], susumu Asakawa[7], Jun Ogawa[3,4,8], Masao Takano[2] ([1]NARO, [2]Grad. Sch. Environ. Stu., Nagoya Univ., [3]Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [4]Res. Unit Physiol. Chem., Kyoto Univ., [5]Dept. Biosci. Inform., Keio Univ, [6]Biotech. Res. Cent., Toyama Pref. Univ., [7]Grad. Sch. Bioagric. Sci., Nagoya Univ, [8]Agric.,Kyoto Univ.)

[背景・目的]養液栽培では不可能とされていた、有機質肥料の利用を実現した新技術が有機質肥料活用型養液栽培である。肥料成分のうち、NPK の主要三元素は鰹煮汁などの有機質の肥料や草木灰などで供給できるが、それらだけでは Ca, Mg, Fe といった金属元素が不足するため、別の天然資材で金属元素を供給する必要がある。しかし天然の Ca 塩、 Mg 塩は炭酸化合物や酸化物として存在するものが多く、水溶液の pH を上昇させる原因となる。pH の上昇（pH6 以上）は Fe の不溶化を招くため、作物に鉄欠乏が発生する恐れが高くなる。したがって、十分な量の Ca, Mg を供給しながら pH の上昇を抑え、作物の Fe 吸収を妨げない技術の開発が必要であった。

そこで本研究では、Ca, Mg, Fe をバランスよく含む牡蠣殻粉末を発酵学的手法などで溶解し、有機質肥料活用型養液栽培に微量金属元素を供給する資材の開発を目的として実験を行った。

[方法・結果] 牡蠣殻石灰粉末を有機酸で溶解することを試みた。有機酸としてクエン酸、乳酸、酢酸、木酢液を使用したところ、乳酸を除く有機酸で牡蠣殻が溶解した。溶解した有機酸石灰水溶液をチンゲンサイ苗に施用したところ、酢酸石灰、木酢石灰は著しくチンゲンサイの生育を悪化させたが、クエン酸石灰は比較的生育に及ぼす悪影響が小さかった。クエン酸は麹菌による発酵法で安価に製造されており、コスト面でも有望であると考えられた。しかしクエン酸石灰は溶解処理の翌日には沈殿を形成し、長期保存には適さないことが分かった。

次に、廃糖蜜を発酵させて有機酸を生成し、牡蠣殻石灰を溶解する手法を試みた。種々の検討の結果、牡蠣殻石灰 1kg に対し廃糖蜜 100g、水 1L を加えたところ、約 1 週間で有機酸発酵が進み、上清の pH は 5 前後に低下した。上清の Ca, Mg, Fe の濃度を調べたところ、それぞれ 5,000ppm, 800ppm, 10ppm 前後で溶解していることが分かった。この上清（発酵石灰液）を有機質肥料活用型養液栽培に微量金属元素供給剤として使用したところ、良好にトマトを栽培することができた。

Organic hydroponics, oyster shell lime, minor nutrients

講演番号：4A34a02
講演日時、会場：3 月 29 日 09:11～ A 校舎 34 会場

有機質肥料活用型養液栽培に有用な微生物群集における病原性細菌の解析

Analysis of pathogenic bacteria in the microbial consortia useful for organic hydroponic culture

宇佐美 晶子[1]、藤原 和樹[2]、○溝渕 久恭[1]、安藤 晃規[1,3,4]、サイジャイ サクンタラ[1]、志村 悠暉[4]、篠原 信[2]、宮本 憲二[5]、加藤 康夫[6]、浅川 晋[7]、小川 順[1,3,4] ([1]京大院農・応用生命、[2]農研機構、[3]京大・生理化学、[4]京大農・応用生命、[5]慶大・理工、[6]富山県立大工・生工研セ、[7]名大院・生命農)

Shoko USAMI[1], Kazuki FUJIWARA[2], ○Hisanori MIZOBUCHI[1], Akinori ANDO[1,3,4], Sakuntara SAIJAI[1], Yuki SHIMURA[4], Makoto SHINOHARA[2], Kenji MIYAMOTO[5], Yasuo KATO[6], Susumu ASAKAWA[7], Jun OGAWA[1,3,4] ([1]Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]NARO, [3]Res. Unit Physiol. Chem., Kyoto Univ., [4]Agric.,Kyoto Univ., [5]Dept. Biosci. Inform., Keio Univ., [6]Biotech. Res. Cent., Toyama Pref. Univ., [7]Grad. Sch. Bioagric. Sci., Nagoya Univ.)

【背景】近年、微生物群集を用いることで、有機物を直接利用することが可能となった新たな養液栽培技術が確立された。本栽培法は、微生物の馴養培養を行い、有機化合物の分解、硝化を行う微生物群集を構築する耕水工程と、養液中の微生物群集を維持しつつ、植物を定植する栽培工程で構成される。本栽培法では、施肥効率のよい栽培が可能であり、根部根部病害に対して抑止効果を示す。微生物群集は土壌微生物を、硝化能に注目して集積培養して得たもの(硝化微生物群)であり、安全性の観点から、病原性微生物の動態を把握する必要がある。本研究では、本栽培におけるヒト病原菌の動態を調査した。

【方法・結果】土壌（微生物源）と耕水工程中の硝化微生物群における *Escherichia. coli* 0157・0111・027、*Staphylococcus aureus*, *Campylobacter* sp., *Salmonella* sp. and *Bacillus cereus* の有無を、各々の菌に特異的な選択培地を用いて検定した。その結果、土壌、硝化微生物群共に、一般的な土壌中に見られる *S. aureus* と *B. cereus* が検出できたが、その他の菌は検出できなかった。次に、養液中の病原菌の動態を検討するために、耕水工程初期に *E. coli* 0157 JCM18467 または *S. enterica* ATCC53648 を養液に接種し、その消長を観察した。結果、*E. coli* または *S. enterica* は徐々に減少していき、*E. coli* は接種 9 日後、*S. enterica* は接種 12 日後に検出限界以下に減少した。また、トマト、チンゲンサイ、サラダナについて本栽培を行い、その養液に *E. coli* を接種し、その生残性を調べた。その結果、栽培開始と同時に接種した場合、4 日後にはほぼ検出限界以下となり、5 日後には完全に検出限界以下となった。また、栽培開始 6 日後に接種した場合、2 日後にはほぼ検出限界以下となり、6 日後には全て検出限界以下となった。

Organic hydroponic, Nitrification, pathogenic bacteria

講演番号：4A34a03
講演日時、会場：3 月 29 日 09:22～ A 校舎 34 会場

有機質肥料活用型養液栽培における硝化菌および硝化関連遺伝子の動態解析

Transitional analysis of nitrifying bacteria and genes in the organic hydroponics

○篠原 亘[1]、吉田 昭介[1]、川上 了史[1]、安藤 晃規[2,3]、小川 順[2,3]、加藤 康夫[4]、浅川 晋[5]、篠原 信[6]、宮本 憲二[1] ([1]慶大理工、[2]京大院農・応用生命、[3]京大・生理化学、[4]富山県立大工・生工研セ、[5]名大院・生命農、[6]農研機構)

○Wataru SHINOHARA[1], Shosuke YOSHIDA[1], Norifumi KAWAKAMI[1], Akinori ANDO[2,3], Jun OGAWA[2,3], Yasuo KATO[4], Susumu ASAKAWA[5], Makoto SHINOHARA[6], Kenji MIYAMOTO[1] ([1]Dept. Biosci. Inform., Keio Univ, [2]Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ, [3]Res. Unit Physiol. Chem. Kyoto Univ, [4]Biotech. Res. Cent., Toyama Pref Univ, [5]Grad. Sch Bioagric Sci., Nagoya Univ, [6]NARO)

[背景・目的] 有機質肥料活用型養液栽培（有機養液栽培）は、有機物を肥料として使用できる水耕栽培の新手法である。本栽培法では、植物を栽培する前に有機物の無機化を行う「耕水工程」が必要である。この工程では、水槽中に土壌などの微生物源とカツオ煮汁などの窒素比率の高い有機物を添加し、爆気を行う。すると、水槽中で有機物はアンモニア、亜硝酸を経て硝酸にまで変換され、植物の窒素栄養源となる。こうした一連の酸化反応を触媒する菌群は硝化菌と呼ばれ、植物の栽培においては欠かすことのできない菌種であると言える。これら硝化菌は耕水工程のはじめに添加した微生物源に由来するため、この微生物源を変えることで、より効率的に硝化を行える可能性がある。そこで、本研究ではこの微生物源の候補として、有機養液栽培中で繰り返し有機物の無機化を行わせた菌群、「種菌」に着目した。培養スケールや窒素源などを変えた種菌を解析対象とし、その菌種組成や耕水工程における動態を明らかにすることを目的とした。

[方法・結果] 異なる条件下で作製された 5 つの種菌を解析対象とした。まず、メタゲノム解析により、それぞれの菌種組成および硝化菌の存在比を明らかにした。その結果、培養スケールや窒素源などの条件の違いにより *Nitrosospira*、*Nitrobacter* などの硝化菌の存在比が大きく異なることを確認した。占有率の高いものでは、*Nitrosospira* は 10%近く、*Nitrobacter* は 50%近く存在しており、こうした種菌では有機物の無機化が速やかに行われることが期待された。しかし、実際にこれらの種菌を用いて同一の条件下で耕水を実施したところ、硝化が行われる速度は必ずしも硝化菌の存在比に依存していなかった。一方で、硝化速度の速い種菌と遅い種菌とでは、養液中の pH 変化が大きく異なっており、硝化の遅い種菌では pH が 5.0 前後まで低下するのに対し、速い種菌では 7.5 前後で保たれていた。そのため、pH を一定以上に保つことで硝化が速やかに行われる可能性が示唆された。そこで、pH を調整して耕水を実施したところ、無調整の場合と比較して硝化が速やかに行われることを確認した。また、その際の養液中の硝化酵素遺伝子および硝化菌の存在量の変化をリアルタイム PCR により定量したところ、pH 調整を行わない場合と比較して、存在量が上昇していることが確認できた。

Organic hydroponics, Nitrifying bacteria, Rhizosphere microbiome

講演番号：4A34a04
講演日時、会場：3 月 29 日 09:33～ A 校舎 34 会場

有機質肥料活用型養液栽培の改良を目的とした硝化菌の有機成分耐性の研究

Study of tolerance of nitrifying bacteria to organic compounds for improvement of organic hydroponics

○藤原 和樹[1]、高田 惟名[2]、安藤 晃規[3,4]、宮本 憲二[5]、加藤 康夫[6]、浅川 晋[7]、小川 順[3,4,8]、高野 雅夫[2]、篠原 信[1]([1]農研機構、[2]名大院・環境、[3]京大院農・応用生命、[4]京大・生理化学、[5]慶大・理工、[6]富山県立大工・生工研セ、[7]名大院・生命農、[8]京大農・応用生命)
○kazuki FUJIWARA[1], yuina TAKADA[2], akinori ANDO[3,4], kenji MIYAMOTO[5], yasuo KATO[6], susumu ASAKAWA[7], jun OGAWA[3,4,8], masao TAKANO[2], makoto SHINOHARA[1] ([1]NARO, [2]Grad. Sch. Environ. Stu., Nagoya Univ., [3]Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [4]Res. Unit Physiol. Chem., Kyoto Univ., [5]Dept. Biosci. Inform., Keio Univ., [6]Biotech. Res. Cent., Toyama Pref. Univ., [7]Grad. Sch. Bioagric. Sci., Nagoya Univ., [8]Agric.,Kyoto Univ.)

[背景・目的]有機質肥料活用型養液栽培は、養液栽培では不可能とされていた有機質肥料の利用を可能にした新栽培技術である。これまで有機質肥料の利用が難しかった原因は、硝化菌（アンモニア酸化菌、亜硝酸酸化菌）が有機成分の暴露を受けると活動を停止し、植物の健全な生育に必要な硝酸が生成されなくなるためである。硝化菌の活動が有機成分により阻害を受けることが経験的によく知られていたが、ある種の糖は利用できるという報告もあり、どのような成分・メカニズムで阻害が起きるのかは十分検討されていなかった。そこで硝化菌へのダメージを回避した硝酸生成法の開発を目的として、硝化菌に種々の有機成分を供し、硝酸化成に阻害効果のあるもの、ないものを調べ上げ、そのメカニズムの解明を目的として、実験を行った。
[方法・結果]アンモニア酸化菌 *Nitrosomonas europaea* ATCC 19718、亜硝酸酸化菌 *Nitrobacter winogradskyi* NBRC 14297 それぞれに種々有機物を加え、アンモニア酸化あるいは亜硝酸酸化の反応に阻害がみられるものを調べた。その結果、いずれの菌も鰹煮汁、コーンスティープリカーといった有機質肥料で容易に阻害された。また、各種アミノ酸、有機酸で阻害を受けた。糖（グルコース、フルクトース、ラクトース、ガラクトース）で阻害効果のあるものは認められなかった。これらの結果から、*Nitrosomonas*、*Nitrobacter* は各種有機成分で硝化反応を阻害されるが、阻害成分の化学構造に特に共通点は認められないことが分かった。

Organic hydroponic, Nitrifying bacteria, Inhibition

講演番号：4A34a05
講演日時、会場：3 月 29 日 09:44～ A 校舎 34 会場

硝化特性が向上した微生物群集からの亜硝酸酸化菌の単離取得
Isolation of nitrite-oxidizing bacteria from microbial-consortia with high nitrification activity
○宇佐美 晶子[1]、安藤 晃規[1,2,3]、志村 悠暉[3]、犬飼 龍矢[1]、池本 成美[1]、宮本 憲二[4]、加藤 康夫[5]、浅川 晋[6]、藤原 和樹[7]、篠原 信[7]、小川 順[1,2,3]([1]京大院農・応用生命、[2]京大・生理化学、[3]京大農・応用生命、[4]慶大・理工、[5]富山県立大工・生工研セ、[6]名大院・生命農、[7]農研機構)
○Shoko USAMI[1], Akinori Ando[1,2,3], Yuki Shimura[3], Ryuya Inukai[1], Narumi Ikemoto[1], Kenji Miyamoto[4], Yasuo Kato[5], Susumu Asakawa[6], Kazuki Fujiwara[7], Makoto Shinohara[7], Jun Ogawa[1,2,3] ([1]Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]Res. Unit Physiol. Chem. Kyoto Univ., [3]Div. Appl. Life Sci., Sch. Agric., Kyoto Univ., [4]Dept. Biosci. Inform., Keio Univ., [5]Biotech. Res. Cent., Toyama Pref. Univ., [6]Grad. Sch. Bioagric. Sci., Nagoya Univ., [7]NARO)

【目的】有機養液栽培（有機質肥料活用型養液栽培）は、環境負荷を低減する資源循環型の栽培技術として期待を集めている。本技術は、通気下で有機態窒素の硝化に有用な微生物群を馴養する耕水工程と、それに引き続く、植物栽培と有機物の硝化を同時に行う栽培工程で構成される。我々はこれまでに微生物源として硝化能が優れた土壌を選抜し、数回硝化を行わせることで集積した微生物群集（nitrification-promoting designed microbial consortia, nDMC）が有機養液栽培に有用であることを報告した。今後、実用に向け、安全性の向上や多様な有機物分解能の付与獲得、様々な作物への適用など、種々の条件に対応した nDMC のデザインが求められる。本研究では、微生物群集の人工的再構築と各微生物の挙動解析を目指し、nDMC からの硝化微生物の取得を試みた。
【方法】硝化菌群を馴養する耕水工程に亜硝酸ナトリウム（5 g/L）を添加し、亜硝酸酸化菌群の集積培養を行った。集積した微生物群を、2% ゲランガム培地（Na_2HPO_4・$2H_2O$, 3.2 g/L; KH_2PO_4, 0.272 g/L; $FeSO_4$・$7H_2O$, 1 mg/L; $MgSO_4$・7H2O, 10 mg/L; $NaNO_2$, 5 g/L）に播種し、コロニーを形成させた。さらに亜硝酸酸化酵素遺伝子での増幅が確認できたコロニーを対象に、上記と同様の組成の液体培地にて亜硝酸酸化活性を示すコロニーを選抜した。
【結果】上記の手法により亜硝酸酸化活性を示すコロニーを選抜した。このコロニーの解析を行ったところ、*Alicycliphilus sp.*と亜硝酸酸化菌である *Nitrobacter sp.*が共生してコロニーを形成していることが分かった。現在、コロニーからの *Nitrobacter sp.*の単離を試みると同時に、コロニー形成における共生関係の解析を試みている。

nitrite-oxidizing bacteria, nitrification, organic hydroponics

講演番号：4A34a06
講演日時、会場：3 月 29 日 10:05～ A 校舎 34 会場

Construction of a model nitrifying bacteria community for organic hydroponics

○Sakuntala SAIJAI[1], Akinori Ando[1,2,3], Hisanori Mizobuchi[1], Shoko Usami[1], Yuki Shimura[2], Kenji Miyamoto[4], Yasuo Kato[5], Susumu Asakawa[6], Makoto Shinohara[7], Jun Ogawa[1,2,3] ([1]Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]Dep. Appl. Life. Sci., Fac. Agric., Kyoto Univ., [3]Res. Unit Physiol. Chem. Kyoto Univ., [4]Dept. Biosci. Inform., Keio Univ., [5]Biotech. Res. Cent., Toyama Pref. Univ., [6]Gead. Sch. Bioagric., Nagoya Univ., [7]NARO)

[Background] Recently, organic hydroponics becomes one of an interesting technique for hydroponics culture, because it decrease environmental load and provide an efficient cultivation. The organic hydroponics consists of following two processes. The first is nitrification process, in which a microbial ecosystem for degrading organic compounds with high nitrifying activity is established. The second is a crop cultivation process with maintaining the nitrifying microbial community. At present, an agricultural soil is used as a microorganism source for nitrification. However, it takes over one month for completing nitrification and accumulation of nitrite without further oxidation is often observed. Therefore, the aim of this study was to design a microbial community for the effective nitrification. This designed microbial community was also desirable in term of pathogen control.

[Method and result] Seventy strains of heterotrophic bacteria were tested for nitrite-oxidizing activity in the medium contained $NaNO_2$. *Arthrobacter sulfurous* AKU635 (400 mg/L of nitrate accumulation), *Bacillus badius* NBRC15713 (50 mg/L of nitrate accumulation) and *Corynebacterium paurometabolum* AKU605 (no accumulation of nitrate) were selected as the heterotrophic nitrite-oxidizing bacteria with high, low and no nitrite oxidation activity, respectively. Heterotrophic nitrite-oxidizing bacteria AKU635, NBRC15713, or AKU605 were combined with a heterotrophic ammonia-oxidizing bacterium (*Alcaligenese faecalis* AKU103), *Nitrosomonas europaea* NBRC14298 and *Nitrobacter winograskyi* NBRC14297. The nitrification was investigated in the medium contained organic compounds (1% glucose, 0.2% K_2HPO_4, 0.01% $MgSO_4.7H_2O$, 0.1% peptone and 0.01% yeast extract). The mixed cultures including AKU635 or AKU605 couldn't finish nitrification in one month. However, nitrification was completed within 2 weeks by the mixed culture comprised of NBRC15713, AKU103, NBRC14298, and NBRC14297, and about 300 mg/L of nitrate was accumulated. These results suggested that the designed microbial community is useful for organic hydroponics.

nitrification, nitrifying bacteria, organic hydroponics

講演番号：4A34a07
講演日時、会場：3 月 29 日 10:16～ A 校舎 34 会場

水素資化性メタン生成菌の凝集性低下変異株を用いた凝集メカニズムの解析

Analysis of aggregation mechanism in a thermophilic and hydrogenotrophic methanogen by using aggregation-defective mutant

○澄川 佳奈[1]、松谷 峰之介[2]、木本 光明[3]、有働 公一[3]、高坂 智之[2]、山田 守[1,2] ([1]山口大院医、[2]山口大農、[3]山口大研究推進機構)
○Kana SUMIKAWA[1], Minenosuke MATSUTANI[2], Mitsuaki KIMOTO[3], Koichi UDO[3], Tomoyuki KOSAKA[2], Mamoru YAMADA[1,2] ([1]Grad. Sch. Med., Yamaguchi Univ., [2]Fac. Agri., Yamaguchi Univ., [3]Science Research Center, Ymaguchi Univ.)

【目的】UASB 型汚水処理メタン発酵槽では、グラニュールと呼ばれる微生物塊が発酵槽の安定化に寄与していることが示唆されている。このグラニュールを形成するために微生物の凝集する性質が必要とされており、その性質を有する微生物にメタン発酵で重要な役割を果たすメタン菌も含まれる。メタン菌の 1 つである水素資化性メタン生成菌 *Methanothermobacter* sp. CaT2 株は凝集する性質を有することが既に明らかとなっており、その凝集に表層糖の関与が示唆されている。しかし、その凝集に関する分子的な知見はほとんど明らかとなっていない。そこで、CaT2 株の凝集メカニズムを解明するために、凝集性が低下した変異株を用いて、水素資化性メタン生成菌の凝集に関与する分子の知見を得ることにした。

【方法・結果】まず、CaT2 株を継代培養することで凝集性がさらに強化された CHA001 株を取得した。この株を基に変異剤である EMS を用いて凝集性が低下した変異株を取得した。変異株の凝集性の低下は、顕微鏡観察と沈降速度の低下により確認し、数株の凝集性低下変異株を分離した。これらの変異株の表層性質を有機溶媒による親和性解析により実施したところ、CHA001 株と同様に塩基性の性質を示す、親水性の細胞表層を有することが明らかとなった。また、電子顕微鏡による観察により、CHA001 株と CLA160 株の両方とも表層糖を有していたが、凝集性では CHA001 株は大きな凝集を示す一方で、CLA160 株はほとんど凝集していないことが明らかとなった。凝集に関わる遺伝子を明らかにするため、凝集性低下株の 1 つである CLA160 株のゲノム配列を Illumina シーケンサーにより解析したところ、MTCT_1020 遺伝子上に 1 ヶ所の変異が確認された。この遺伝子は約 3,000 アミノ酸からなる機能未知タンパク質をコードし、変異により約 140 アミノ酸へと短くなっていると推測された。このタンパク質は、C 末端と N 末端のそれぞれに疎水性領域が存在し、さらに、ドメインサーチにより、アドヒージョンドメインの存在が示唆された。これらのことより、MTCT_1020 遺伝子は細胞表層接着タンパク質をコードしていることが推察された。以上のことから、凝集性低下変異株である CLA160 株は MTCT_1020 の破壊により、凝集性が低下したと推察した。よって、CHA001 株同士の凝集には、MTCT_1020 の細胞表層タンパク質が 1 つの要因として関与していることが示唆された。

Methanogen, aggregation, thermophillic

講演番号：4A34a08
講演日時、会場：3 月 29 日 10:27～ A 校舎 34 会場

水素資化性メタン生成菌の凝集性が水素生成菌の共生的水素生成に与える影響

Effect of aggregation activity of a hydrogenotrophic methanogen on syntrophic-hydrogen production in a hydrogen-producing bacterium

○高坂 智之[1]、馬屋原 範聡[2]、澄川 加奈[2]、山田 守[1,2]([1]山口大農、[2]山口大院医)
○Tomoyuki KOSAKA[1], Noriaki Mayahara[2], Kana Sumikawa[2], Mamoru Yamada[1,2] ([1]Fac. Agri. Yamaguchi Univ., [2]Grad. Sch. Med. Yamaguchi Univ.)

[目的] メタン発酵での分解反応に関わる微生物群は発酵槽内で凝集し、時には直径1~2 mmもの微生物塊（グラニュール）を形成する。このような凝集体の形成により、内部に存在する微生物の代謝や生存機構が影響を受けると考えられているが、どのような影響があるかは未だ明確にはなっていない。水素資化性メタン生成菌である *Methanothermobacter* sp. CaT2（CaT2株）は自己凝集能をもち、ギ酸や水素を介して水素生成菌である*Pelotomaculum thermopropionicum* SI （SI株）と共生関係を構築する。本研究では、CaT2株とSI株との共生関係において、CaT2株のもつ凝集能が SI 株の代謝に与える影響を解析した。

[結果] まず、CaT2株の凝集性を弱めた変異株を得るために、CaT2株に変異原処理を行い、凝集性の低下したCLA（CaT2 low aggregation）株を数株獲得した。次に、強い凝集性を示すCaT2株と凝集性低下株であるCLA158株やCLA160株とで、SI株との共培養の際に凝集の形成及び代謝速度がどのように異なるかを解析した。基質としては SI 株からの水素放出経路が単純な1-プロパノールを用いた。 共培養時の凝集形成を評価するために、共培養時に形成された凝集のサイズ分布や数を比較した結果、CaT2株との共培養条件に比べCLA158株やCLA160株との共培養条件では、凝集の大きさや数が大きく低下していた。加えて、共培養時の経時的なメタン量及び水素分圧を測定したところ、共培養条件下での水素分圧の低下が凝集性を示す株ほど速い傾向を示し、また、条件によってはメタン生成速度に対してもメタン生成菌のもつ凝集性の影響が観察された。これらの結果より、CaT2株の凝集性はSI株との共培養条件下での凝集形成に大きく寄与しており、その凝集形成は共生関係において中間代謝物である水素の生成もしくは消費速度に影響を与えることが示唆された。

aggregation, syntrophic association, hydrogen transport

講演番号：4A34a09
講演日時、会場：3 月 29 日 10:38～ A 校舎 34 会場

木質分解性メタン発酵系確立のための有用菌群の単離同定

Isolation and identification of useful microorganisms for the development of a wood-degrading methane fermentation system

○白鳥 初美[1]、大川 桃世[1]、榊田 達哉[1]、石井 匡[2]、高野 英晃[1]、上田 賢志[1] ([1]日大生物資科、[2]アゴラ造園株式会社)
○Hatsumi SHIRATORI[1], Momoyo OOKAWA[1], Tatsuya SAKAKIDA[1], Masashi ISHII[2], Hideaki TAKANO[1], Kenji UEDA[1] ([1]Nihon Univ., [2]AGORA Landscape Arcitecture Co, Ltd)

【目的】近年、木質バイオマスを可燃性ガスに転換する資源化技術に期待が寄せられている。その中でもメタン発酵微生物を利用する方法は、環境負荷の低減と設備の縮小化が見込まれることから都市部でのエネルギー生産に繋がる可能性が高い。しかし、木質は主成分のセルロース繊維がリグニンに覆われているため、微生物分解を受けにくく、単独でメタン発酵の基質としている例は少ない。故に、木質を効率よくメタンへと転換する微生物群集の構造およびその制御法に関する知見は乏しく、実用化には多くの課題が残されていた。これらを背景に、木材チップのみを基質とする高温メタン発酵に関する予備実験を行ったところ、木質を微生物分解しメタンガスを発酵生産するプロセスの効率化には、好気的なリグニンの変性と嫌気的なセルロース分解という 2 つの初期律速反応を促進する必要性が強く示唆された。そこで本研究では、これらの反応を担う微生物種を分離同定し、その機能を最大限に利用する条件を見出すことを目的として実験を行った。
【方法】木質リグニンの分解菌探索には、熟成木材堆肥を用いて好気培養を実施した。朽ちた木材チップを表面殺菌し、貧栄養固体培地で数週間培養して木材腐朽性真菌を分離した。また、同堆肥に新鮮な木材チップを添加して一定温度にて馴養した後、フミン酸固体培地を用いて放線菌群を分離した。取得した菌株については、リグニンモデル基質を用いた分解性試験および 16S rRNA 遺伝子配列解析による菌種の推定を行った。一方、セルロース分解に関与する嫌気性細菌群の探索には、独自に構築した間伐廃材を基質とする高温メタン発酵液を用いた。本液はメタゲノム解析により、*Clostridiales* に近縁な未同定の細菌種が優占化していたことから、これらを標的とする特異的な分子生物学的検出法を用いてセルロース分解に関与する菌群の検出を試みた。
【結果】好気条件下でリグニン分解および木質腐朽に関与することが示唆される放線菌群と真菌類を複数分離した。遺伝子配列の解析から、高温性の *Streptomyces* 属および腐生性担子菌の *Sphaerobolus* 属の近傍に位置する菌株は、リグニン分解酵素の生産性を有する新奇株であることが示唆された。また、分離した担子菌株は近縁既知種と比べ高温域での生育およびリグニン分解活性が観察されており、木質腐朽処理への有効活用が期待される。一方、木材を基質とする高温メタン発酵液からは、高温性セルロース分解菌が一群をなす *Clostridium* cluster III の近傍に位置する 16S rRNA 遺伝子配列が複数検出された。その中でも *Clostridium stercorarium* に低い類似度を示した配列は、木質分解に関与する新奇細菌種である可能性が強く示唆されており、さらなる分離同定を進めている。

ligninolytic microbes, methane fermentation, woodchip

講演番号：4A34a10
講演日時、会場：3 月 29 日 10:49～ A 校舎 34 会場

地下高温環境における導電性鉱物を介した電子移動に基づく共生的メタン生成の可能性
Symbiotic methanogenesis based on electron transfer through conductive minerals in high-temperature subsurface environments
○和田 薫[1]、加藤 創一郎[1,2,3]、浅野 行蔵[1]、鎌形 洋一[1,2] ([1]北大院・農、[2]産総研・生物プロセス、[3]東大・先端研)
○Kaoru WADA[1], Souichirou KATOU[1,2,3], Kozo ASANO[1], Youichi KAMAGATA[1,2] ([1]Hokkaido Univ., Grad. Sch. Agric., [2]AIST, BPRI, [3]Univ. Tokyo, RCAST)

【背景と目的】微生物による有機物からのメタン生成は複数の微生物種の共同作業により進行する。特に有機物酸化細菌とメタン生成アーキア間の電子移動に基づく共生反応は系全体の律速反応であり非常に重要である。通常その異種間電子伝達は水素が電子キャリアとして機能するが、水素の拡散効率の低さなどの問題でその反応効率は非常に低い。我々のグループは、マグネタイトなどの導電性鉱物を流れる電流が異種微生物間の電子移動を媒介し共生的メタン生成を効率化可能であることを見出し、電気共生と命名・提唱した。地下高温環境での炭素循環においてもメタン生成は非常に重要であり、また鉄鉱物も豊富に存在している。そのため地下高温環境においても電気共生が重要な役割を担っていると考えられるが、これまでその実証はなされていない。本研究では高温の地下原油貯留層構造水をもとにメタン生成微生物群集を集積培養し、導電性酸化物の存在がメタン生成活性、微生物群集構造に与える影響を調べた。
【結果と考察】山形県新堀油田の原油貯留層構造水を微生物源とし、基質として酢酸を加えた改変人口海水培地を用いて、導電性または絶縁性酸化鉄の存在、非存在下でメタン生成微生物群を集積した。導電性を持つマグネタイト粒子の添加により、酸化鉄非添加時よりも高いメタン生成速度が観察された。また絶縁性のフェリハイドライトの添加によってもメタン生成は促進され、培養後の鉄粒子は黒色に変化した。黒変した鉄粒子は XRD 解析によりマグネタイトを含んでいることが確認された。このことから導電性のマグネタイト粒子の存在により高温環境においても電気共生が機能しうることが示唆された。
16S rRNA 遺伝子配列に基づく微生物群集構造解析の結果、全ての培養系で酢酸利用性の *Methanosaeta* 属が主要なメタン生成菌であった。酸化鉄を添加しない条件で優占したバクテリアは発酵性の *Anaerobaculum* 属細菌のみであり、酢酸からのメタン生成は *Methanosaeta* 属が単独で行っていると考えられた。マグネタイト、フェリハイドライト添加時の群集構造は類似しており、いずれも鉄還元能を持つと考えられる *Flexistipes* 属、*Petrotoga* 属細菌の優占がみられた。一方でフェリハイドライトに加えメタン生成菌の阻害剤である BES を添加した培養系では *Flexistipes* 属や *Petrotoga* 属細菌はほとんど存在せず、*Therminicola* 属、*Desulfocinum* 属細菌が優占していた。この結果は、*Flexistipes* 属、*Petrotoga* 属細菌は単純な鉄還元ではなく、導電性鉄鉱物を介した *Methanosaeta* 属アーキアとの電気共生に依存して増殖していることを示唆する。

Electric syntrophy, Methanogenesis, Conductive minerals

講演番号：4A34a11
講演日時、会場：3 月 29 日 11:10～ A 校舎 34 会場

微生物の付着現象に基づく複合微生物の分離手法の検討

Study of isolation method of microflora based on attachment phenomena of bacterial cells

○松尾 朋昇、大西 章博、藤本 尚志、鈴木 昌治 (東農大院・農)
○ Tomonori MASTUO, Akihiro OHNISHI, Naoshi FUJIMOTO, Masaharu SUZUKI (Tokyo Univ.Agric.)

【背景と目的】環境試料中には時に１ｇあたり１０^{9}個の微生物細胞が含まれ、培養困難な微生物が数多く存在することが認識されている。このため、複合微生物系の菌相解析には分子生物学的技術が用いられている。また、近年では次世代シーケンサーによる解析技術の発展により、理論的には試料中の個体数が１細胞レベルの少数派の菌相の理解も可能になりつつある。しかしながら、分子生物学的技術では生きた細胞を獲得することは不可能であることから、複合微生物系における少数派の微生物を生きたまま分離および培養する何らかの手段が必要である。

本研究では、微生物細胞の物理化学的特徴に基づいて分画することで、少数派の微生物を獲得するための技術開発を試みる。今回は、ガラス表面に対する微生物の吸着現象について検討した結果を報告する。

【実験材料と方法】５種類の環境試料から菌体懸濁液を作成した。ソーダガラス製もしくはリジンコートを施したハーフホワイトガラス製ガラス板を滅菌後、菌体懸濁液に５分間浸漬した。その後、ガラス板を５０mlのリン酸緩衝液で順次洗浄してガラス板から細胞を剥離させた。この緩衝液１mlを肉エキス培地またはMRS培地１０mlに個別に接種し、３７℃で４８時間培養した。なお、洗浄後のガラス板と、緩衝液で段階的に希釈した菌体懸濁液も同様に培養した。培地の濁度上昇から微生物の増殖を判定し、増殖した微生物細胞を回収してＰＣＲ－ＤＧＧＥ法で菌相を解析した。

【結果および考察】全ての試料でガラス板の洗浄１回目の緩衝液からは細胞の増殖が確認できた。しかし、増殖が確認できた緩衝液は最大で洗浄４回目までであり、洗浄５回目の緩衝液では全ての試料で微生物の増殖は確認できなかった。これに対し、洗浄後のガラス板では微生物の増殖が確認できた。これらのことから、ガラス板には一定の微生物細胞が定着していることが示された。また、ガラス板を洗浄した緩衝液で増殖した微生物相はガラス板培養物の菌相に比べて単調であり、洗浄回数に従って菌相が変化することから、微生物細胞の一部は緩衝液による洗浄過程で剥離したことが示唆された。今後はガラス板に吸着した細胞を特異的に剥離する手法を検討する。

microbial attachment, microflora, isolation method

講演番号：4A34a12
講演日時、会場：3 月 29 日 11:21～ A 校舎 34 会場

腸管内プトレッシンは腸内細菌の異なる環境適応を介して高生産される

Different environmental adaptation of intestinal bacteria are responsible for high production of putrescine.

○北田 雄祐[1]、村松 幸治[1]、栗原 新[2]、松本 光晴[1]([1]協同乳業・技術開発、[2]石川県大・生資環)
○ Yusuke Kitada[1], Koji Muramatsu[1], Shin Kurihara[2], Mitsuharu Matsumoto[1] ([1]Research Laboratories, Kyodo Milk Industry Co., Ltd., [2]Ishikawa Pref. Univ.)

〈背景・目的〉近年、ポリアミン（PA）は、アンチエイジング物質として注目されてきている。腸内の PA は腸内細菌によって産生されており、我々はプロバイオティクスや PA 前駆物質アルギニン（Arg）の投与で腸内 PA 濃度が増加し、マウスの寿命が伸長することを報告してきた。しかし、腸内 PA 産生に関わる菌種やメカニズムは解明されていない。我々は腸内 PA 産生が複数菌種の菌種間相互作用によって行われていると考え、腸内常在菌中の 2 菌種を Arg 含有培地で共培養した場合に PA が高生産される組み合わせを探索した。この結果、*Escherichia coli* と *Enterococcus faecalis* を酸性条件下で共培養することで、単独培養時と比べて最大約 8 倍（約 8 mM）のプトレッシン（Put）が産生されることを見出した。本研究では、この *E. coli* と *En. faecalis* による PA 産生機序の解明を目的とした。

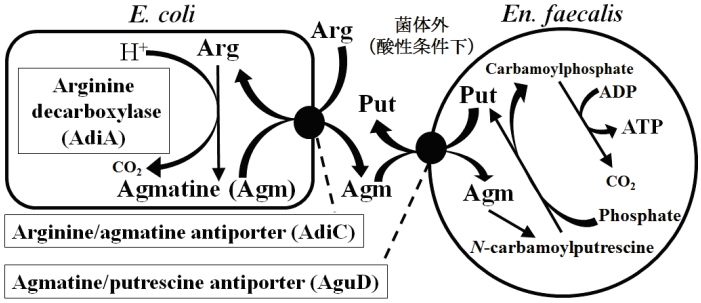


Fig. 1 *E. coli*と*En. faecalis*の共培養における**Put**高生産メカニズム

〈方法〉2 菌種の共培養における Put 産生に関わると予想される各菌のトランスポーターと代謝酵素の遺伝子（*E. coli* の *adiC*（Arginine/agmatine antiporter 遺伝子）、*adiA*（Arginine decarboxylase 遺伝子）、及び *En. faecalis* の *aguD*（Agmatine/putrescine antiporter 遺伝子））（Fig. 1）それぞれについて遺伝子破壊株と遺伝子相補株を作製し、各菌株を組み合わせて共培養を行い、培養上清の Put を定量した。

〈結果〉*E. coli*（Δ*adiC* あるいはΔ*adiA*）と *En. faecalis*（野生型）との共培養では Put 産生が起こらなかったが、*E. coli* 遺伝子相補株（$adiC^+$あるいは $adiA^+$）と *En. faecalis*（野生型）を用いて共培養を行うと、*E. coli*（野生型）と *En. faecalis*（野生型）との共培養時と同レベルにまで Put 産生が回復した。*En. faecalis*（Δ*aguD*）と *E. coli*（野生型）との共培養では、*En. faecalis*（野生型）と *E. coli*（野生型）との共培養時の約 15%に Put 産生が抑制され、*En. faecalis* 相補株（$aguD^+$）と *E. coli*（野生型）との共培養では、*En. faecalis*（野生型）と *E. coli*（野生型）との共培養時の約 40%まで Put 産生が回復した。*E. coli* の *adiC*、*adiA* を含む代謝経路は Arg の脱炭酸反応を利用した耐酸性機構であり、*En. faecalis* の *aguD* を含む代謝経路はアグマチンの分解に伴う ATP 産生経路であることが報告されている（Fig. 1）。これらの先行研究と本研究の結果から、*E. coli* と *En. faecalis* の共培養時には 2 菌種の異なる環境適応（酸耐性とエネルギー産生）が複合し、Put が高生産されることが明らかとなった。

polyamine, complex microbial culture, anti-aging

講演番号：4A34a13
講演日時、会場：3 月 29 日 11:32～ A 校舎 34 会場

高脂肪食摂取がラット盲腸内容物の胆汁酸分泌および菌叢変化に与える影響
Effect of high-fat diets on the bile acid secretion and the microbiota composition in rat cecum

○渡辺 真通[1]、萩尾 真人[2]、藤田 祐己[1]、李 慈英[1]、馬場 菜那子[1]、小椋 義俊[3,4]、林 哲也[3,4]、清水 英寿[1]、石塚, 敏[1]、吹谷 智[1]、横田 篤[1] ([1]北大院農、[2]東洋大生命科学、[3]宮崎大医、[4]宮崎大フロンティア)
○Masamichi WATANABE[1], Masahito HAGIO[2], Yuki FUJITA[1], Ja-Young LEE[1], Nanako BABA[1], Yoshitoshi OGURA[3,4], Tetsuya HAYASHI[3,4], Hidehisa SHIMIZU[1], Satoshi ISHIZUKA[1], Satoru FUKIYA[1], Atsushi YOKOTA[1] ([1]Hokkaido Univ., [2]Toyo Univ., [3]Miyazaki Univ., [4]Miyazaki Univ. Frontier)

【背景および目的】西欧食の特徴である高脂肪が腸内細菌叢に与える影響の解明は、肥満や糖尿病等のメタボリックシンドロームの発症との関連から注目を集めているが、菌叢変化の要因には不明な点が多い。当研究室ではこれまでの検討で、胆汁酸を含む食餌をラットに与えると、腸管内の胆汁酸濃度が上昇し、腸内細菌叢の構成が変化することを明らかにしている（Islam *et al*, 2011)。胆汁酸は脂質吸収に必須であるため、高脂肪食の摂取により胆汁酸の分泌量が増大すると共に、一部の胆汁酸は腸内細菌による変換を受けて殺菌活性の高い二次胆汁酸となる。従って、増大した胆汁酸の殺菌活性が選択圧となり、菌叢変化の要因になっている可能性が高く、当研究室ではこれを「胆汁酸仮説」として提唱している。そこで、本研究では 2 種類の脂質（大豆油、ラード）を用い、高脂肪食の摂取が胆汁酸分泌および菌叢変化に与える影響を評価した。
【方法】3 週齢の雄 WKAH ラットを、デキストリン食による 2 週間の予備飼育後 3 群に分け、デキストリン食（Control)、デキストリン-高大豆油食（HS)、デキストリン-高ラード食（HL）の長期投与試験（8 週間）を行った。胆汁酸分泌と菌叢変化を経時的に調べるため、0、2、4 および 8 週間飼育後に屠殺し、各群 4～6 匹（計 44 匹）について盲腸内容物を採取して、LC/MS による胆汁酸分析および次世代シーケンサーによるメタ 16S 菌叢解析を行った。配列データの operational taxonomic unit（OTU）解析および OTU の門・属レベルでの帰属の解析は QIIME を用いて行った。
【結果および考察】HS 群では摂取 8 週目、HL 群では摂取 4 週目以降で盲腸内総胆汁酸濃度の顕著な増加が見られた。ヒトの代表的な二次胆汁酸であるデオキシコール酸（DCA）は、HS 群では摂取 8 週目、HL 群では摂取 4 週目以降で増加傾向を示した。この時の菌叢では、HS、HL 群ともに Firmicutes/Bacteroidetes（F/B）比の経時的な増加が見られ、HL 群では HS 群に比べてより顕著に F/B 比が増大した。さらに、Control 群と比べて HL 群では摂取 4 週目以降に *Blautia* 属, *Dorea* 属および *Ruminococcus* 属に帰属される OTU の増加が観察され、HS 群でも摂取 8 週目に *Blautia* 属の OTU が増加傾向を示した。また、HL 群において、これら 3 属の OTU の相対存在量は総胆汁酸量と有意な相関（$p<0.05$）を示した。これらの結果より、高脂肪食摂取による胆汁酸分泌量の増大に伴って、腸内菌叢が変化することが示された。*Blautia* 属は胆汁酸を含む食餌摂取において増加することが我々の研究で明らかになっており、胆汁酸耐性を有する可能性が示唆される。今後、盲腸内容物から本細菌を単離し、胆汁酸耐性試験を行うことで、胆汁酸仮説の検証をさらに進める予定である。

high-fat diets, bile acid, gut microbiota

講演番号：4A34a14
講演日時、会場：3 月 29 日 11:43～ A 校舎 34 会場

カメムシと細菌による協力的な農薬分解
Synergistic insecticide-detoxification in an insect-microbe endosymbiosis
○佐藤 由也[1]、小池 英明[2]、竹下 和貴[2]、柳澤 真紀[1]、NAVARRO Ronald[1]、伊藤 英臣[2]、堀 知行[1]、菊池 義智[2] ([1]産総研 環境管理、[2]産総研 生物プロセス)
○ Yuya SATO[1], Hideaki KOIKE[2], Kazutaka TAKESHITA[2], Maki YANAGISAWA[1], Ronald NAVARRO[1], Hideomi ITOH[2], Tomoyuki HORI[1], Yoshitomo KIKUCHI[2] ([1]AIST EMTech, [2]AIST BPRI)

【背景・目的】　異なる２種が「共生」することで、ときに生物は全く新しい機能を獲得する。その一例として、体内に有用な微生物を保持する「内部共生」が多くの動植物において報告されている。最近我々は、農業害虫のカメムシ類が土壌中のフェニトロチオン（有機リン系殺虫剤の一種で通称MEP）分解細菌“*Burkholderia* sp.”を体内に共生させ、農薬抵抗性を獲得するという驚くべき現象を発見した。しかしこれまでのところ、本分解細菌によるカメムシの農薬抵抗性化メカニズムはおろか、体内における農薬分解経路についても明らかにされていない。そこで本研究では、カメムシ類の共生細菌であり農薬分解能を有する *Burkholderia* sp. SFA1 株に着目し、オミクス解析（genomics、transcriptomics）および遺伝子破壊実験を行い、本菌の農薬分解経路およびカメムシの農薬抵抗性化メカニズムを解明することを目指し研究を行った。
【方法・結果】　はじめに SFA1 株の *in vitro* 条件における農薬分解経路の解明に取り組んだ。まずゲノム解析を行い、本菌ゲノム中に既知の農薬分解遺伝子が保存されることが確認された。また、農薬分解条件においてトランスクリプトーム（RNA-seq）解析および遺伝子破壊実験を行うことで、本菌が既報の二つの農薬分解経路を組み合わせた複雑な分解経路を持つことを解明した。さらに *in vitro* 実験において、本菌は農薬を資化できるにもかかわらず、農薬の第一分解物 3-methyl-4-nitrophenol（3M4N）が培地に蓄積することで生育が阻害されることを発見した。農薬およびその第一分解物の毒性試験を行ったところ、本菌に対して農薬は無毒であるにもかかわらず、分解物の 3M4N が有毒であることが示された。カメムシに対しては農薬が有毒であり分解物の 3M4N は低毒性であることが知られており、共生細菌とカメムシでは毒性物質が逆となっている。このことから、共生時（*in vivo* 条件）には、カメムシに有毒な農薬を共生細菌が分解し、共生細菌に有毒な分解産物（3M4N）をカメムシが代謝するという、「協力的な農薬解毒機構」が行われている可能性が考えられた。この仮説を検証するため、SFA1 共生状態のカメムシに農薬を投与し、*in vivo* 条件の共生細菌についてトランスクリプトーム解析を行ったところ、カメムシ体内では農薬分解経路の第一酵素のみが発現し、3M4N を代謝する第二酵素以降は発現しないという、上述の仮説を支持する結果が得られた。農薬を巡る利害の相違によりユニークな「協力的農薬解毒機構」が形成され、これらが共生関係の維持に大きく寄与している可能性が高い。

endosymbiosis, insecticide, stink bug

講演番号：4A34a15
講演日時、会場：3 月 29 日 11:54～ A 校舎 34 会場

エゾノギシギシを摂食する Gastrophysa 属ハムシ腸内フローラの地域的差異
Regional variation of gut microflora in Gastrophysa leaf beetles feeding on Rumex obtusifolius
○大坪 和香子[1]、宮城 敦子[2]、小島 紀幸[3]、川合 真紀[2]、内宮 博文[4]、宮内 啓介[1,5]、遠藤 銀朗[1,5]
([1] 東北学院大学工学総合研究所、[2] 埼玉大学大学院理工学研究科、[3] 東北学院中学高等学校、[4] 埼玉大学環境科学研究センター、[5] 東北学院大学工学部)
○Wakako Ikeda-Ohtsubo[1], Atsuko Miyagi[2], Noriyuki Ojima[3], Maki Kawai-Yamada[2], Uchimiya Hirofumi[4], Keisuke Miyauchi[1,5], Ginro Endo[1,5] ([1]Research Institute for Engineering and Technology, Tohoku Gakuin University, [2]Graduate School of Science and Engineering, Saitama University, [3]Tohoku Gakuin Junior and Senior High School, [4]Institute for Environmental Science and Technology (IEST), Saitama University, [5]Faculty of Engineering, Tohoku Gakuin University)

日本在来昆虫であるコガタルリハムシ（*Gastrophysa atrocyanea*）は、明治時代に日本に侵入した外来雑草エゾノギシギシ（*Rumex obtusifolius*）を旺盛かつ選択的に摂食するため、生物学的防除に利用可能な益虫として知られている。発表者らのこれまでの研究では、エゾノギシギシに多く含まれる毒性の高い水溶性シュウ酸が、抗生物質処理したコガタルリハムシの体内において高濃度に蓄積していたことから、共生微生物がシュウ酸分解能に関与している可能性が知られた。本研究では、エゾノギシギシを摂食するコガタルリハムシとヨーロッパの在来種のハムシ *Gastrophysa viridula* の共通した生活環に寄与する微生物を明らかにするために、それぞれの腸内フローラおよび分泌体液の群集構造解析を行った。T-RFLP およびクローン解析の結果、宮城県内で採集したコガタルリハムシとドイツ・ベルリンで採集した *G. viridula* の腸内フローラでは、腸内細菌科（Enterobacteriaceae）が優勢化しており、極めて似た細菌種により構成されていることが明らかになった。また、防御物質を含む体液中では、*Lactococcus* 属乳酸菌が優勢化していた。一方、腸内フローラにおける各細菌種の存在比については採集地間の差異が見られたが、同じ採集地においても試料間に一定の差があり、特にエゾノギシギシを旺盛に摂食する 3 齢幼虫の初期と、摂食を止める蛹化直前の試料では大きな差異があった。これらの結果から、*Gastrophysa* 属ハムシの腸内フローラとエゾノギシギシの摂食行動に高い相関性があることを示唆された。

insect-microbe symbiosis, gut microbiota, oxalate

講演番号：4A34p01
講演日時、会場：3 月 29 日 14:00～ A 校舎 34 会場

混合バイオフィルム中でのプラスミドの挙動
Behavior of plasmids in multi-species biofilms

○李 昇ウク[1]、水口（鈴木） 千穂[1]、清川 達則[2]、野村 暢彦[2]、岡田 憲典[1]、野尻 秀昭[1] ([1]東大生物工学セ、[2]筑波大院生命環境)
○seunguk LEE[1], Chiho SUZUKI-MINAKUCHI[1], Tatsunori KIYOKAWA[2], Nobuhiko NOMURA[2], Kazunori OKADA[1], Hideaki NOJIRI[1] ([1]The Univ. of Tokyo, [2]Univ. of Tsukuba)

【背景と目的】実際の環境中では，均一化された集団は存在せず，たとえ同じゲノムを持つ菌でも土壌中，河川・湖沼中と異なる環境に生きているものは全く異なる生理状態を示す．例えば河川水中では，水面近くで棲息するものと嫌気的な川底に付着してバイオフィルムを形成して棲息するものには，大きな生理的違いが生じていることは疑いようがない．しかもそこにいるのは単一の菌ではなく，多様な菌が混ざり合いひしめき合いながらも微小な空間で棲み分けを果たしていると考えられる．発表者らは、昨年度までは「単独培養で同一のプラスミドを保持する 3 宿主を比較する」という着眼点で研究を進めてきたが，上述のように実環境中には多数の土着の菌が存在している．また，プラスミドが宿主のバイオフィルム形成に与える影響についての既存の報告の多くは単独の宿主を使用している．以上を考慮すれば，複数の宿主が存在する場合のプラスミド保持株の挙動を解析することは，実環境中，特にバイオフィルム形成条件で生育する宿主の振る舞いに対してプラスミド保持がどの様な意味を持つかを解明する重要な鍵になる．そこで，カルバゾール分解プラスミド pCAR1 と 3 種の *Pseudomonas* 属細菌 (*P. putida* KT2440 株、*P. aeruginosa* PAO1 株、*P. fluorescens* Pf0-1 株) を用いて, pCAR1 保持株・非保持株を混合して培養することでバイオフィルムを形成させ，プラスミド保持株と非保持株の挙動を解析し，バイオフィルム内での棲み分けや生き残りについてプラスミドが果たす役割を解明することを目的とした．

【結果】まず，各株にそれぞれ緑色蛍光タンパク質 (GFP) と赤色蛍光タンパク質 (mCherry) を挿入した株を作製し，15 通りの組み合わせについて，蛍光タンパク質を入れ換えたものも含めて合計 30 通りの組み合わせを観察した．その結果，PAO1 株を他の株と混合培養すると pCAR1 保持・非保持に関わらずバイオフィルム中で PAO1 株が優占化すること，同種間で pCAR1 保持・非保持株を混合培養すると一方の優占化は見られず，各株それぞれがバイオフィルムを形成し，混ざらない状態で存在することが明らかとなった．過去の研究では，上記 3 株について浮遊状態で pCAR1 保持株と非保持株の競合培養を行った際に、総じて pCAR1 保持株の比率が減少することが明らかとなっている (Takahashi *et al*., 2014). そこで, フローサイトメトリーや共焦点レーザー顕微鏡を用いて, バイオフィルム状態と浮遊状態における上記 3 株の pCAR1 保持株・非保持株の割合を定量した．その結果，浮遊状態では pCAR1 保持株が淘汰されたのに対し，バイオフィルム状態では pCAR1 保持株と非保持株がほぼ同じ比率を示しそれぞれ独立に存在し生き残ることが示された．

biofilm, plasmid

講演番号：4A34p02
講演日時、会場：3 月 29 日 14:11～ A 校舎 34 会場

三菌株混合培養系における代謝変化と遺伝子発現制御
Alteration of gene expression contributes to system stability in a model microbial ecosystem
○鈴木 研志[1]、犬塚 友麻[1]、ファティマ アズワニ[2]、田代 陽介[1]、二又 裕之[1]([1]静岡大院工、[2]Putra Malaysia univ.)
○Kennshi SUZUKI[1], Yuma Inuzuka[1], Azwani Fatma[2], Yosuke Tashiro[1], Hiroyuki Futamata[1] ([1]Shizuoka Univ., [2]Putra Malaysia univ.)

微生物生態系は様々な微生物が相互作用することで一つのシステムとしてその機能を維持している。この維持機構の解明は、微生物生態系のより深い理解に寄与し、微生物利用技術の更なる発展が期待される。一方で、微生物生態系は複雑さ故に解析が困難であることから、システムの維持機構は未だ概念の域を超えていない。これまで本研究室では、フェノールを唯一の炭素源として *Pseudomonas* sp. C8 株、*Ralstonia* sp. P-10 株および *Comamonas testosteroni* R2 株を用いた混合連続培養系をモデル微生物生態系として構築し解析をしてきた。本モデルにおける供試菌株の動態解析を行ったところ、再現性のある優占種変遷が確認された。また、フェノールおよびカテコールに対する動力学パラメータの変遷も確認されたことから、環境変化に対応したフェノール代謝における役割分担が示唆された。従って、環境変化に対応した代謝の変化がシステムの維持において重要な役割を果たしていることが推察された。そこで、本研究ではモデル系における代謝の変化機構解明を目的とし、ゲノム解析に基づく各菌株のフェノール代謝経路の解析および微生物間相互作用が代謝全体に及ぼす影響を解析した。

まずゲノム解析を実施した結果、三菌株共に multicomponent 型の phenol hydroxylase 遺伝子群を有し、P-10 株および R2 株は catechol 2,3-dioxygenase (C230)遺伝子とその下流遺伝子群を有することから、メタ開裂経路を有すると推察された。また、P-10 株は catechol 1,2-dioxygenase (C120)遺伝子を有することから、オルト開裂経路も兼備していることが示唆された。一方 C8 株は biphenyl 2,3-dioxygenase (bphC)遺伝子とその下流遺伝子群および C120 遺伝子が確認されたため、メタおよびオルト開裂経路を兼備していると推察された。三菌株の phenol hydroxylase 遺伝子の制御遺伝子は上流に位置し、NtrC family であった。R2 株では C230 遺伝子の下流に LysR family の制御因子が確認された。次に、P-10 株および R2 株の増殖を著しく抑制する C8 株培養上清が両菌株の代謝に及ぼす影響を調べるため、メタボローム解析を実施した。その結果、増殖抑制を受けている間はもちろん、増殖抑制が解除された後でさえ代謝は大きく異なっていることが示された。

以上の結果から、環境変化に対応した遺伝子発現によって、システム全体の代謝が制御されていることが伺えた。また、微生物間相互作用が代謝変化を引き起こす鍵であることが示唆された。

microbial ecosystem, metabolic process, bacterial interaction

講演番号：4A34p03
講演日時、会場：3 月 29 日 14:22～ A 校舎 34 会場

共培養が与える *Methylobacterium* sp. 121 株への影響

The effect of co-culture in *Methylobacterium* sp.121

○若林 佑[1]、清水 哲[2]、中村 顕[2]、伊藤 政博[1]([1]東洋大学大学院・生命科学研究科、[2]筑波大学・生命環境科系)
○Yuu Wakabayasi[1], Tetsu Shimizu[2], Akira Nakamura[2], Ito Masahiro[1] ([1]Graduate School of Life Sciences, Toyo Univ., [2]Faculty of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba)

【背景・目的】

土壌などの自然環境中では、多種多様な生物が様々な形で共存している。従来の微生物学では、微生物を単離してから実験に使う研究が一般的であった。しかし、現在でも土壌中に含まれている微生物全体の1~5%程度しか単離培養ができないと考えられている。近年、異種の細菌同士を共培養することで細菌同士が相互作用し、単一の細菌を培養したと場合は観察されないような現象が報告されている。そのような共培養を行った例として、共培養によって難培養性細菌が生育した報告例や、単独培養時には観察されない代謝産物の生産が観察されたといった報告が挙げられる。このように、環境中の細菌は相互に影響し合っていることが考えられている。しかし、これまで報告された細菌間の相互作用は生育や代謝産物に着目したものが主流であった。本研究では *Methylobacterium* sp. 121 株(以後 121 株と表記、運動性あり)の共培養時における運動性に着目した。この 121 株は *Kaistia* sp. 32K 株(以後 32K 株と表記、運動性なし)と同一環境から分離された細菌である。これらの 2 菌株を共培養すると 121 株の運動速度の向上が顕微鏡下で観察された。これまで共培養による細菌の運動性の向上は注目されていなかった。このことから、細菌の運動においても細菌間の相互作用による影響を受けていることが示唆された。また、共培養による121 株の運動性の変化は、培養槽間をフィルターで仕切った特殊なフラスコを使った共培養実験から 32K 株と共培養した際に最も顕著に観察された。この結果から、121 株の運動性向上がフィルター透過性の物質によって引き起こされる現象であることが予想された。これらの結果より、本研究では 32K 株の代謝産物が 121 株の運動性の向上に影響を与えると考え、その因子の特定を試みた。

【方法】

両菌株の共培養を行った際の培養上清の大量取得を行うために、3 リットル・ジャーファーメンターによる共培養を行った。この際、培地の濁度と pH、それに 121 株の遊泳速度を継時的に測定した。

【結果・考察】

ジャーファーメンターによる共培養の結果、試験管での共培養と同様の結果が得られた。さらに、培地の pH が後期対数増殖期より低下し始め、pH 4 付近で 121 株の運動性が喪失し、最終的に培地の pH が 3 程度まで低下する現象が観察された。これは共培養による影響で、両菌株がお互いの代謝産物を資化しあうことで最終的に酸性の代謝産物を産生している可能性が示唆された。現在、培地の pH 低下に関与する代謝産物の特定を試みている。

Co-culture, *Methylobacterium* sp., *Kaistia* sp.

講演番号：4A34p04
講演日時、会場：3 月 29 日 14:33～ A 校舎 34 会場

ミヤコグサ根粒菌 *Mesorhizobium loti* による共生時特異的なジベレリンの生合成
Gibberellin biosynthesis by *Mesorhizobium loti* under symbiosis
○立上 陽平[1,2]、南部 真実[1]、森坂 裕信[1,3]、黒田 浩一[1]、植田 充美[1,3] ([1]京大院農・応用生命、[2]日本学術振興会特別研究員(DC1)、[3]京都バイオ計測センター)
○ Yohei TATSUKAMI[1,2], Mami NAMBU[1], Hironobu MORISAKA[1,3], Kouichi KURODA[1], Mitsuyoshi UEDA[1,3] ([1]Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]JSPS, [3]KIST-BIC)

【背景・目的】共生窒素固定細菌である根粒菌 *Mesorhizobium loti* は、宿主であるミヤコグサ *Lotus japonicus* と共生し窒素固定することが知られている。しかし、その相互作用には未解明な部分が多い。我々はこれまでに *M. loti* の共生時・非共生状態の比較プロテオーム解析を行うことで、その変化を分子レベルで同定解析してきた[1-2]。その結果から、共生時特異的に発現するオペロンに着目してきたので、本発表ではそのオペロンの機能と推測される生理的意義について検討した。
【方法・結果】着目したオペロンに含まれる 9 遺伝子の配列情報により、その機能が植物ホルモンであるジベレリンの生合成であると予測できた。また、ゲノム編集により、そのオペロンの発現を非共生状態でも誘導可能にし、培養上清を LC-MS で測定することにより、生合成される興味深いジベレリンを同定した。さらに、オペロンに含まれる各遺伝子の機能を遺伝子組み換え発現系を用いて決定し、この特徴的なジベレリンの合成経路を明らかにした。これらの結果と根粒菌の共生時特異的なジベレリンの生合成について、根粒菌とミヤコグサの相互作用の生理的意義の観点からまとめて発表する[3]。

[1] Y Tatsukami *et al*., *BMC Microbiol.*, 13, 180-188 (2013) [2] M Nambu *et al*., submitted. [3] Y Tatsukami *et al.,* submitted.

Plant-Microbe Interaction, Gibberellin, *Mesorhizobium loti*

講演番号：4A34p05
講演日時、会場：3 月 29 日 14:44～ A 校舎 34 会場

外生菌根菌の生育に対するフラボノイド類の効果 - 2
The growth effects of flavonoids for several ectomycorrhizal fungi - 2
○加瀬谷 泰介、足立 亜衣（(公財) 東洋食品研究所)
○Taisuke KASETANI, Ai ADACHI (Toyo Institute of Food Technology)

[背景および目的] 外生菌根菌に対する生育促進物質を探索したところ、宿主植物由来の Taxifolin 配糖体を見出した。類似構造を有するフラボノイド類を 3 菌種に投与したところ、全種に対して有効であったのは Fisetin、Myricetin、Quercetin-3-*O*-glucoside であった。中でも、Fisetin の効果は高かった。そこで、Fisetin によって効果が示された菌糸を用いて遺伝子発現解析を行い、生育促進物質の作用機構について検討した。

[方法] 10 μM Fisetin の 20% (v/v) dimethyl sulfoxide 溶液 20 μL を MMN 寒天平板培地表面に塗布し、*B. reticulatus* (t-57 株) の菌糸体 disk (φ5 mm) を接種後、1 ヶ月培養し、菌糸生育促進効果を確認した。効果の得られた菌糸より全 RNA を抽出し、次世代シーケンサー (illumina Hiseq 2000) を用いた発現比較から、処理・対照区間で発現量に 1.2 倍以上の差がある配列を選抜した。その選抜遺伝子を対象にアノテーション解析を行い、Fisetin の作用機構を推定した。

[結果] 発現量が処理・対照区間で 1.2 倍以上ある遺伝子は 1231 であった。それらを用いたアノテーション解析の結果、処理・対照区のいずれにおいても多岐にわたる遺伝子の発現変動が見られた。

特に処理区においては、NADH dehydrogenase、Cytochrome c reductase、Cytochrome c oxidase、F-type ATPase といった、ミトコンドリアの電子伝達系に関わる遺伝子の高発現を確認している。

電子伝達系は、呼吸の最終段階として、生物の様々な活動に必要なエネルギー源である ATP を合成することが知られている。そのため、この結果は、Fisetin 投与によって菌根菌菌糸の ATP 合成量が増加する可能性を示唆した。

ectomycorrhizal fungi, flavonoid, gene expression analysis

講演番号：4A34p06
講演日時、会場：3 月 29 日 15:05～ A 校舎 34 会場

Autoinducer-2 inactivation by outer membrane porin in periodontopathogenic bacterium *Eikenella corrodens*

○Fariha Jasin MANSUR[1], Natsumi MORISHIGE[1], Yuichiro NOIRI[2], Hiroyuki AZAKAMI[1]
([1]Yamaguchi Univ., [2]Osaka Univ.)

Quorum sensing (QS) is a cell-to-cell signaling process that enables bacteria to collectively control gene expression. QS signaling molecule autoinducer-2 (AI-2) is a product of LuxS enzyme, which is widely conserved throughout the bacterial kingdom. *Eikenella corrodens*, facultative Gram-negative anaerobic rod, is most often found in subgingival plaque samples of patients with advanced periodontitis. Previously, we reported that *E. corrodens* produces AI-2 in the mid log phase, and AI-2 activity decreases dramatically during the stationary phase. We also reported that *E. corrodens* produces AI-2 inactivating enzyme during the stationary phase. The objective of this study was to purify and characterize the AI-2 inactivating enzyme of *E. corrodens*.

AI-2-inactivating enzyme was purified from the stationary-phase culture supernatant using DEAE ion-exchange chromatography and Q-sepharose chromatography. SDS-PAGE result suggested that AI-2 inactivating enzyme was purified completely and its molecular weight was about 40 kDa. Amino acid sequencing and BLAST analysis results suggested that purified protein was porin. Δ*porA* mutant *E. corrodens* has no AI-2 inactivation activity. Thus, these results suggested that porin protein might be involved in AI-2 inactivation of *E. corrodens*.

To investigate why the outer membrane porin was detected from culture supernatant, the porin expression in the culture supernatant was analyzed. The expression of porin was increased at the stationary phase. It was suggested that the porin might be secreted into culture supernatant at the stationary phase. To determine how the porin was secreted, we analyzed the porin expression in the membrane vesicle. In wild strain, the porin in the vesicle was increased at the stationary phase. These results suggested that the porin secreted by membrane vesicle might inactivate AI-2 at the stationary phase.

Eikenella corrodens, autoinducer, porin

講演番号：4A34p07
講演日時、会場：3 月 29 日 15:16～ A 校舎 34 会場

大腸菌における脂肪酸供給不全とコロニー形成能の関係
Correlation between fatty acid limitation and colony formation in *Escherichia coli*
○納庄 一樹、三井 智玄、小川 哲弘、日高 真誠、正木 春彦（東大院農）
○Kazuki Nosho, Tomohiro Mii, Tetsuhiro Ogawa, Makoto Hidaka, Haruhiko Masaki (UTokyo)

微生物を固体培地上でコロニーとして分離し、遺伝的に均一な集団として増殖させる純粋培養法は、微生物学の第一歩であり、微生物実験においても細胞の生死はコロニー形成能で定義されてきた。しかし近年、環境中のほとんどの細菌は生きていてもコロニーを形成できない状態で存在することが認識されるようになった。明らかにコロニー形成とは、生きていることと同一ではなく、その特殊な状態であると考えるべきで、改めてコロニー形成とは何かを生物学的に明らかにする必要がある。本研究では、コロニー形成能が特定の遺伝子に依存していると考え、コロニー形成能を欠く大腸菌変異株を取得することで、コロニー形成に重要な遺伝子機能を明らかにすることを目的としている。

液体培地限界希釈法によれば、自然の試料からコロニー法より多くの細菌が分離できる。この経験をもとに、液体培地では増殖するが寒天培地でコロニーを作らない変異株をスクリーニングし、*fabB* 変異株を分離した。FabB は脂肪酸合成サイクルの縮合酵素であり、変異株の生育には脂肪酸の供給が必要である。そこで脂肪酸としてオレイン酸存在下で、野生株をもとに *fabB* 欠失株を構築した。

スクリーニングに用いた L-培地には微量の脂肪酸が含まれることが推定された。そこでカザミノ酸を加えた M9 最少培地に微量のオレイン酸を添加することで、液体培養と固体培養に及ぼす脂肪酸供給の影響を詳細に比較した。結果、オレイン酸微量添加時には、*fabB* 欠失株の液体培地での生育速度はオレイン酸添加量に非依存的であるのに対し、固体培地での生育速度はオレイン酸添加量に依存し、大きく遅れることがわかった。また、液体では増殖できるのに対し、固体では全く増殖できない濃度範囲があることも示された。この様に*ΔfabB* 株は環境細菌の状態に性質が似るが、自然の細菌は *fabB* 変異体ではない。以上の条件下の大腸菌野生株では、生育速度のオレイン酸依存性が固液双方で見られなかった。

しかし大腸菌野生株でも、長期間低温飢餓に曝すと、生理活性は保ちながらもコロニー形成能が大きく下がることが知られており、この状態は環境細菌のモデルと考えられている。そこで低温飢餓に晒した大腸菌野生株の生育に対するオレイン酸の影響を比較すると、オレイン酸の添加のみでコロニー形成能を 10 倍以上に増強することが可能であることがわかった。更に、脂肪酸生合成供給を制限するため、*fabB* 遺伝子のみの発現レベルを調節した株で固体・液体培養での生育差を調べている。

本研究により、栄養飢餓状態にある自然界の細菌の固体培地上での生育能が液体培地と比較して非常に低いことの主要因が、脂肪酸供給である可能性が示唆された。

fabB, colony forming activity, fatty acid

講演番号：4A34p08
講演日時、会場：3 月 29 日 15:27～ A 校舎 34 会場

VBNC 化を緩和する遺伝子の解析

Analysises of the genes restraining Escherichia coli from falling into the VBNC state

○西尾 優宏、高丸 玲子、小川 哲弘、日高 真誠、正木 春彦（東大院農生科・応生工）
○Masahiro Nishio, Reiko Takamaru, Tetsuhiro Ogawa, Makoto Hidaka, Haruhiko Masaki (Dept. of Biotech., The Univ. of Tokyo)

【目的】微生物学においてバクテリアの生死は、主にコロニー形成能の有無で定義されてきた。しかし近年、環境中の大多数の微生物は「生きているが培養困難な状態」にあることが明らかとなってきた。ここでいう培養が困難であるとは、コロニー形成頻度が低いという意味であり、大腸菌のように培養法が確立しているバクテリアにおいても、低温・飢餓に曝すと、様々な方法で測定した生菌数よりも、コロニー形成数が大きく減少していく現象が知られている。この VBNC(Viable But Non-Culturable)状態の細胞は、コロニーを作りにくい環境中のバクテリアのモデルであると考えられている。我々は、大腸菌における VBNC 状態への移行は、コロニー形成に必要な何らかの遺伝子機能が減衰するために起こると仮定し、そのような遺伝子の発現を強化することで VBNC 化が緩和されてコロニー形成能が高く保たれると予想した。そこで、大腸菌の全 ORF を持つ多コピープラスミドから成る ASKA ライブラリーを用いて VBNC 化の緩和に寄与する遺伝子をスクリーニングし、コロニー形成とは何かということを明らかにしていきたいと考えている。
【方法】ASKAライブラリーで形質転換した大腸菌集団を8グループに分割し、グループ毎に、菌の混合液に対して低温飢餓によるVBNC処理を繰り返し施した後、寒天培地上にコロニーを形成させた。生じたコロニーの持つプラスミド上の遺伝子をPCRにより比較し、時間とともに高い割合を占めるようになった遺伝子を、VBNC化緩和遺伝子の候補とし、更に候補株どうしでVBNC化処理に抗して生き残る競争を行い、コロニー形成能を高く保つ遺伝子を特定した。
【結果】昨年 5 グループから候補遺伝子を得ることができ、特に *sdaB* と *ariR* の効果が高いことを示した[1)]。今回残りのグループからも候補を取得し、合計 10 種類の候補遺伝子発現株を用いて、VBNC を緩和する効果を評価した。これらの遺伝子をプラスミドで導入、発現させた大腸菌株同士での競争実験及び、個々にベクタープラスミドを持つ対照株との比較をする実験を行い、VBNC 化緩和効果の高さを相対的に検討した結果を報告する。

1)髙丸玲子ら、日本農芸化学会 2014 年度大会講演要旨集 3A09a14

VBNC, colony forming ability

講演番号：4A34p09
講演日時、会場：3 月 29 日 15:38～ A 校舎 34 会場

大腸菌の VBNC 化を緩和する 2 つの遺伝子の共働効果

Additive effect of two genes that restrain *Escherichia coli* from falling into the VBNC state

○福嶋 凡子、高丸 玲子、西尾 優宏、小川 哲弘、日高 真誠、正木 春彦（東京大農）
○Hiroko FUKUSHIMA, Reiko TAKAMARU, Masahiro NISHIO, Tetsuhiro OGAWA, Makoto HIDAKA, Haruhiko MASAKI (UTokyo)

【背景】微生物学においては、寒天培地上にコロニーを形成させる純粋分離法によって微生物を単離することが研究の基本となっている。しかし、自然界の大多数のバクテリアは「生きているが培養できない状態」にあることが分かってきた。我々は、このような培養困難なバクテリアを研究対象とするため、バクテリアにおけるコロニー形成の遺伝生化学的メカニズムの解明を目指している。

通常の方法で培養が容易な大腸菌も、低温・飢餓条件では、生菌数に対してコロニー形成頻度が次第に低下していく現象、いわゆる VBNC（Viable But Non-Culturable）化が知られている。そして、この VBNC 状態の大腸菌は環境中の難培養性バクテリアのモデルと考えられている。これまでに我々は、「コロニー形成に必要な遺伝子の機能が低温・飢餓により低下する」ことにより VBNC 化が起こるという仮定のもと、ASKA ライブラリー（大腸菌の全 ORF をひとつずつクローニングした多コピープラスミドのライブラリー）を用いて特定の遺伝子を大腸菌内で高発現させることで、VBNC 状態への移行を緩和する効果のある遺伝子をスクリーニングし、いくつかの候補遺伝子を見つけることができた。

【目的・方法】コロニー形成という表現型には複数の遺伝子が関わっていると予想されるため、複数の候補遺伝子の発現を同時に強化することで、より強い VBNC 化抑制効果がみられることを期待した。そこで、スクリーニングで取得された遺伝子のうち、特に強い効果がみられた *sdaB*、*ariR* について、ASKA ライブラリーのプラスミドベクター上で両遺伝子をオペロン化することで、大腸菌内で二つの遺伝子を高発現させた。そして、スクリーニングの方法を応用して、その VBNC 化抑制効果を、二つの単独発現強化株と比較した。

【結果】オペロン型プラスミドからの個々の遺伝子の発現量は、単独発現と比較すると両遺伝子とも少ないことが分かった。しかしながら、この共発現強化株を VBNC 化処理すると、コロニー形成数は単独発現強化株と同等かそれ以上に高く推移することが分かった。さらに効果をより厳密に評価するため、共発現強化株と二つの単独発現強化株および対照として遺伝子をクローニングしていないベクターをもつ株を、等量混合して競争的に VBNC 化させ、生じたコロニー中の株の割合を調べたところ、共発現強化株の割合が経日的に高まっていくことが示された。これは *sdaB* と *ariR* が、相加的にコロニー形成能の維持に寄与していることを示唆する。

VBNC, colony forming ability

講演番号：4A34p10
講演日時、会場：3 月 29 日 15:49～ A 校舎 34 会場

酵母への接着に関与する *Lactobacillus plantarum* ML11-11 細胞表層タンパク質の解析
Analysis on cell surface proteins of *Lactobacillus plantarum* ML11-11 responsible for adhesion to yeasts
○平山 悟、古川 壮一、荻原 淳、安井 雅人、森永 康（日大院・生資科）
○Satoru HIRAYAMA, Soichi FURUKAWA, Jun OGIHARA, Masato YASUI, Yasushi MORINAGA (Nihon Univ.)

【目的】
鹿児島県の伝統発酵食品である福山酢より分離した乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* ML11-11 は、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* と共存すると顕著な複合バイオフィルム形成や共凝集性を示す。これらの現象は細胞間接着に基づくものであり、乳酸菌 ML11-11 細胞表層のレクチン様タンパク質と酵母細胞表層のマンナンを介して起こっていることをこれまでに明らかにしてきた。本研究では、乳酸菌 *L. plantarum* ML11-11 の野生株、及び酵母との共凝集能が欠失している非凝集性自然変異株について、細胞表層タンパク質を解析し、酵母との接着に関与する乳酸菌のレクチン様タンパク質を明らかにすることを目的として実験を行った。
【方法・結果】
4M LiCl や SDS 等を用いて *L. plantarum* ML11-11 の野生株、及び非凝集性変異株の細胞表層タンパク質の抽出を試みた。抽出サンプルは BCA 法によりタンパク質量の測定を行った。また、SDS-PAGE によりタンパク質を分離し、注目したバンドについてはバンドを切り出した後、液体クロマトグラフィー質量分析(LC-MS/MS)によりペプチド配列を同定した。
4 M LiCl 及び SDS 抽出画分のタンパク質量を測定したところ、非凝集性変異株の細胞表層タンパク質量は、野生株に比較して少ないことが明らかになった。SDS-PAGE の泳動像を比較した結果、野生株と非凝集性変異株との間で、差異のあるバンドが複数見られた。それらのバンドについて LC-MS/MS によりペプチド配列を同定すると、野生株の表層タンパク質サンプルに見られる主要なバンドの中には、Elongation factor や GAPDH(Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)のような数種の細胞内タンパク質が見出された。この様なタンパク質は moonlighting protein と呼ばれ、他の乳酸菌において酵母との相互作用に寄与していることが既に報告されている。ML11-11 の場合も、これら moonlighting protein が何らかの機構で細胞表層に translocate され、酵母との接着に関与している可能性が考えられる。なお、非凝集性変異株は、細胞表層にタンパク質を translocate する機構に変異が生じた、或いは細胞壁や細胞膜等の構造が変異したため、タンパク質を表層に保持できなくなった可能性が考えられた。現在、ML11-11 の酵母への接着力の強さから推定して、moonlighting protein 以外の因子が酵母との接着に関与している可能性も考えて、引き続き表層タンパク質の解析を行っており、その結果についても併せて報告する予定である。

Lactobacillus plantarum, cell surface protein, *Saccharomyces cerevisiae*

講演番号：4A34p11
講演日時、会場：3 月 29 日 16:10～ A 校舎 34 会場

酵母と酵母接着性乳酸菌の共生関係

Analysis of symbiotic relationships between yeast and yeast-adhesive lactic acid bacteria

○牧 大剛、古川 壮一、森永 康（日大院・生資科）
○Hirotake MAKI, Soichi FURUKAWA, Yasushi MORINAGA (Nihon Univ.)

【目的】

当研究室では、福山酢分離乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* ML11-11（以下 ML）、鯖鮨分離乳酸菌 *L. plantarum* HM23（以下 HM）、*L. plantarum* HP9（以下 HP）が酵母菌 *Saccharomyces cerevisiae* BY4741（以下 BY）に対し強い接着性を示し、その結果として顕著な複合バイオフィルム（以下複合 BF）を形成することを明らかにしてきた。乳酸菌は一般にアミノ酸やビタミンを要求することが知られている。また、酵母菌と共培養させることで乳酸菌が生育に必要な栄養素を受け取り、その生育が促進することも知られている。本研究では、これら酵母接着性乳酸菌の栄養要求性を明らかにし、要求栄養素の欠落した合成培地における生育や BF 形成が酵母との共培養によりどう変化するかを解析した。

【方法】

各栄養素を 1 つずつ除いた田村・角田培地(アミノ酸 18 種，核酸塩基 4 種，塩 8 種類，ビタミン 9 種類で構成される合成培地：農化，26 巻，464-470，1952、以下 TT 培地）での乳酸菌の生育を指標に栄養要求性を解析した。次に、これらの栄養素を 1 つずつ除いた TT 培地を用いて、酵母との共培養による ML の生育変化を評価した。両菌が直接触れ合うことがないように、膜(Millicell cell culture inserts、Millipore 社製）を隔てて ML と BY を共培養して ML の生育を解析した。また膜を使用せずに ML が要求するアミノ酸を除いた同培地を用い、共培養して BF 形成量を評価した。

【結果・考察】

HM、HP は Arg、Glu、Ile、Leu、Met、Val の 6 種、ML は、これらに Cys も加えた 7 種類のアミノ酸を要求し、3 菌種ともパントテン酸カルシウム、ニコチン酸、ビオチン、3 種類のビタミンを要求した。Arg、 Cys、ビオチンのいずれかを欠落させた TT 培地での ML の生育は BY との共培養で顕著に促進され、酵母がこれら栄養素を ML に供給していることが明らかとなった。また、7 種類の要求アミノ酸のいずれかを欠落させた TT 培地を用いて BF 形成を検討したところ、Cys 欠落培地では共培養によって複合 BF 形成量が増加した。以上の結果より、共培養系においては、酵母から酵母接着性乳酸菌である ML に Cys が供給され、Cys の供給によって複合 BF 形成も促進されることが明らかになった。

L.plantarum, S.cerevisiae, biofilm

講演番号：4A34p12
講演日時、会場：3 月 29 日 16:21～ A 校舎 34 会場

Leuconostoc citreum と *Saccharomyces cerevisiae* の共培養におけるバイオフィルム形成機構
Mechanism of biofilm formation in mixed culture of *Leuconostoc citreum* and *Saccharomyces cerevisiae*.

○山岸 明日香、平山 悟、古川 ソウイチ、荻原 博和、森永 康（日大院・生資科）
○Asuka YAMAGISHI, Satoru HIRAYAMA, Soichi FURUKAWA, Hirokazu OGIHARA, Yasushi MORINAGA (Nihon Univ.)

【目的】

伝統発酵食品福山酢から分離した乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* ML11-11(以下 ML)は出芽酵母菌 *Saccharomyces cerevisiae* と共凝集性を示し、共培養時に両菌細胞からなるバイオフィルム(以下複合 BF)を顕著に形成することが明らかになっている。演者らは昨年度本大会で、伝統発酵食品の馴れ鮨より新たに分離した乳酸菌 *Leuconostoc citreum* が酵母菌との共培養時に顕著なバイオフィルム形成を示すことを報告したが、その機構は未解明であった。そこで本報告では、*Leu. citreum* の酵母菌との BF 形成条件や、共凝集性について ML と比較解析した結果を報告する。

【方法】

〈BF 形成試験〉 *Leu. citreum* D4、D7、または G8 及び酵母菌（*S. cerevisiae* BY4741）の前培養菌液を YPD 培地に接種後、96 well プレートに 100 µl ずつ分注。30℃で 24 h 培養、洗浄後 0.1% クリスタルバイオレットで 15 min 染色。その 70%EtOH 抽出液の A_{590} を測定し BF 形成量とした。また、培養時の pH 低下防止のため、6 well プレート中で膜を介した $CaCO_3$(10 g/l)添加条件下で BF 形成を評価した。〈凝集試験〉単独前培養した乳酸菌と酵母菌の菌体を様々な pH に調整した YPD 培地に懸濁しミニシャーレ中で混合、振盪（100 rpm、10 sec～）し目視にて凝集を観察した。

【結果】

Leu. citreum を出芽酵母菌と YPD 培地で共培養すると、*L. plantarum* ML11-11 を共培養した場合と同程度の BF 形成量を示した。そこで、$CaCO_3$ 添加により pH を 5 付近に保って酵母菌と共培養すると、*L. plantarum* ML11-11 では $CaCO_3$ 無添加条件下と同程度に BF 形成するのに対し、*Leu. citreum* の場合 BF 形成量が顕著に減少した。この結果より、*Leu. citreum* と酵母菌との BF 形成には pH5 以下の低 pH 条件が必要と考えられた。一方、YPD(pH6.4)中で凝集性を評価した結果、*L. plantarum* ML11-11 は短時間で凝集塊を形成するのに対し、*Leu. citreum* は凝集塊を形成しなかった。次に、低 pH 調整 YPD 培地中で同様の実験を行ったところ、pH4 付近で *Leu. citreum* が単独凝集することが明らかとなった。また、*Leu. citreum* が YPD(pH6.4)中で形成する共凝集塊を位相差顕微鏡観察すると、ML のように乳酸菌と酵母菌の細胞同士が接着して一体化した形状は認められず、それぞれの自己凝集体が共存している様子が確認された。以上により、*Leu. citreum* と酵母が共培養で形成する BF は、細胞間の強い接着によって形成される *L. plantarum* ML11-11 と酵母の複合 BF とは異なる機序で形成されていることが考えられた。

yeast, lactic acid bacteria, biofilm

講演番号：4A34p13
講演日時、会場：3 月 29 日 16:32～ A 校舎 34 会場

耐塩性酵母と乳酸菌のバイオフィルム形成に関する研究

Study on the biofilm formation of lactic acid bacteria and halotolerant yeasts

○佐藤 有紗、古川 壮一、森永 康（日大院・生資科）
○Arisa SATOU, Soichi FRUKAWA, Yasushi MORINAGA (Nihon Univ.)

【目的】

伝統的な発酵には、酵母と乳酸菌が共に関わっている例が多く知られている。当研究室のこれまでの研究で、鹿児島県の伝統発酵食品である福山壺酢の製造工程から分離された乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* ML11-11(以下 ML)と出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を共培養すると顕著に複合バイオフィルム(以下 BF)が形成されることが見出されている。醤油や味噌についても、発酵工程に乳酸菌と酵母が共に関わっていることが良く知られているが、これらの微生物のもろみ中での生態や相互作用の研究例は少ない。醤油や味噌のもろみは、高塩濃度・低ｐH の環境でかつ半固体状態である。そのような環境では、微生物と固体原料の間や微生物間にさまざまな相互作用があるものと推察される。なお、これまでの研究より、出芽酵母は、清酒酵母も含めてほぼ全ての株で ML と複合培養時に顕著な複合 BF を形成することが明らかになっているものの、耐塩性酵母については未検討であった。そこで本研究では、醤油・味噌から分離された耐塩性酵母と乳酸菌 ML との相互作用について、複合 BF 形成に焦点を当てて検討することとした。

【方法及び結果】

乳酸菌（*Lactobacillus plantarum* ML11-11）と独立行政法人 製品評価技術基盤機構から入手した耐塩性酵母の保存株（*Zygosaccharomyces* 属、*Pichia* 属、*Debaryomyces* 属、*Candida* 属、*Torulopsis* 属など醤油・味噌等の食品に由来する 18 株）の 30℃・72 h 培養の前培養菌液を、単独ないし組み合わせて NaCl 無添加の YPD 培地に接種し、それらをマイクロタイタープレート（96 well）に 100 µl ずつ分注した。30℃・72 h 培養後、形成された BF を洗浄後 0.1% クリスタルバイオレットで 15 min 染色を行い、70%エタノール抽出液の吸光度を 590 nm にて測定し、その値を BF 形成量として評価した。

BF 形成試験の結果、ML との複合培養時に、供試した耐塩性酵母 18 株中 *Zygosaccharomyces rouxii* の 3 菌株など合わせて 7 菌株が、対照として用いた実験室酵母 *Saccharomyces cerevisiae* BY と同等かそれ以上の BF 形成を示した。それらの中でも *Zygosaccharomyces rouxii* NBRC 1877 は、最も BF 形成量が顕著で、BY の約 1.5 倍以上もの BF 形成量であった。今後は複合 BF 形成機構の解明を目指し、接着能の有無や、その機構について検討したい。

L.plantarum, halotolerant yeast, biofilm

講演番号：4A34p14
講演日時、会場：3 月 29 日 16:43～ A 校舎 34 会場

Acetobacter pasteurianus, *Lactobacillus plantarum* および *Saccharomyces cerevisiae* の 3 菌種複合培養による酢酸発酵
Acetic acid fermentation in combination of *Acetobacter pasteurianus* , *Lactobacillus plantarum* and *Saccharomyces cerevisiae*
○東垂水 彩乃、増田 裕明、古川 壮一、森永 康（日大院・生資科）
○Ayano HIGASHITARUMIZU, Hiroaki MASUDA, Soichi HURUKAWA, Yasushi MORINAGA (Nihon Univ.)

【目的】
鹿児島県で古くから製造されている福山酢では、複数の微生物の作用により糖化、アルコール発酵、酢酸発酵が一部併行しながら進行する。当研究室では、酢酸菌と乳酸菌を共培養すると、培養液の表面に、顕著な酢酸菌のバイオフィルム（ペリクル）が形成されることを見出してきた。本研究では、福山酢発酵機構の解明を目的として、実験酵母 *Saccharomyces cerevisiae* BY4741、福山酢分離乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* ML11-11 及び酢酸菌 *Acetobacter pasteurianus* A11-10 を、グルコースを炭素源とした培地を福山酢のモデル系として、単独または共培養し、発酵生産物や菌叢変遷について検討を行った。
【方法】
①培養容器の検討：簡易で安定した発酵系を構築することを目的に、6 穴タイタープレートを用いての発酵条件を検討した。
②3 菌種菌数同時計測法の検討：酵母、乳酸菌、酢酸菌の菌数測定を一種類の平板培地で同時に行うことが可能な培地の組成について検討した。
③上記の検討結果をもとに、酵母、乳酸菌、酢酸菌の単独培養及び複合培養を行い、生成物質と生菌数の変化を経時的に解析した。
【結果】
①培養容器としては、取り扱いの容易さから 6 穴タイタープレートを選定し、5 ml YPD（グルコース 5%調整）を用いることで安定した発酵成績を得ることができた。なお、プレートのふたは培地の蒸発を防止する効果があるため、通常通り使用することとしたが、酸素供給は十分確保可能と判断された。
②生菌数測定培地について検討した結果、YPD に Congo Red (40 mg/l)と CBB (20 mg/l)を添加した培地を使用することで、酢酸菌が白色、乳酸菌がピンク、酵母菌が紫色に染まること、ならびに、コロニーの大きさが酢酸菌≦乳酸菌＜酵母の順番になることを確認し、これを基準にして、3 菌種の区別が可能となった。
③酢酸菌、乳酸菌、酵母を 6 穴プレートに入れた 5 ml YPD（グルコース 5%調整）培地にて単独あるいは複合培養する系を福山酢モデルとして発酵実験を行った。その結果、酢酸菌単独系では酢酸は生成されず、酢酸の生成には酢酸菌と酵母の存在が不可欠であること、さらに、酢酸菌と酵母に乳酸菌を加えた 3 菌種共培養系において最も高い酢酸生成を示すことが明らかとなった。3 菌種共培養系での乳酸菌の役割は、乳酸を産生して酢酸菌の生育や菌膜（ペリクル）形成を促進する点にあると考えられた。

Acetobacter pasteurianus, Vinegar, Biofilm

講演番号：4A34p15
講演日時、会場：3 月 29 日 16:54～ A 校舎 34 会場

伝統的パン種の発酵機構に関する研究

Fermentation mechanism of traditional sourdough

○山本 暁久[1]、平山 悟[1]、藤本 章人[2]、伊藤 円香[2]、伊藤 惠介[2]、藤田 善樹[2]、井藤 隆之[2]、森永 康[1]、古川 壮一[1] ([1]日大院・生資科、[2]MC フードスペシャリティーズ)
○Akihisa YAMAMOTO[1], Satoru HIRAYAMA[1], Akihito FUJIMOTO[2], Madoka ITO[2], Keisuke ITO[2], Yoshiki FUJITA[2], Takayuki ITO[2], Yasushi MORINAGA[1], Soichi FURUKAWA[1] ([1]Nihon Univ., [2]MC Food Specialties)

【目的】サワー種の製造過程では、初期にグラム陰性菌など様々な菌が共生しているが、最終的には乳酸菌や酵母菌が優占化する。サワー種の発酵には長時間（通常 5 日間以上）の培養を必要とし、さらに毎日新しい小麦、水を添加しながら発酵を継続的に行うのが一般的な方法である。酵母菌・乳酸菌の優占化に至るまでの菌叢変遷は複雑で未解明な部分が多い。そこで本研究では、サワー種発酵工程での役割が十分に解明されていないグラム陰性菌に焦点を当て、その菌叢変遷と存在意義について検討することとした。

【方法及び結果】仕込みは、ライ麦粉 150 g、滅菌水 180 g、モルト 3 g を混合し、24 h ・30℃培養した。1～5 日目には前日作製したサワー種、小麦粉、滅菌水を 150 g ずつ加え、さらに 24 h・30℃培養した。その過程で、毎日サワー種の生菌数測定を行った。生菌数測定はサワー種を希釈後、CVT 培地(Crystal Violet Triphenyl-Tetrazolium-Chloride)、MRS 培地(de Man Rogosa Sharpe)、YM 培地(Yeast Extract Malt Extract)に塗抹し、 48 h・30℃培養した。仕込み時にはグラム陰性菌が 10^4 存在しており、1 日培養後にグラム陰性菌数及び乳酸菌数が $10^{7\sim8}$ に増加した。その後乳酸菌は一定の生菌数を保ったものの、グラム陰性菌は減少し消滅した。さらに培養 2~4 日目には酵母菌が出現し、その後 10^5 まで増加した。

分離した菌の同定を行った結果、グラム陰性菌は *Pantoea vagans*、*Enterobacter cowanii*、乳酸菌は *Lactobacillus plantarum*、*Pediococcus pentosaceus*、*Leuconostoc lactis*、*Weissella confusa*、酵母菌は *Wickerhamomyces anomalus* らが主要であることが明らかになり、今後の検討にそれらの菌株を用いた。また一般的なサワー種で検出される *Lactobacillus sanfranciscencis* も併せて用いた。

また、pH によるグラム陰性菌の生菌数変化について検討した。穀物由来の液体培地の pH を乳酸にて調整し、48 h までグラム陰性菌を培養した。その結果、pH4.3 では生育が抑制され、pH4.0 以下では 24 h 後の生菌数が急激に低下した。また、pH3.5 では、接種直後から生菌数の低下が認められ、24 h 後には完全に死滅した。このことから、グラム陰性菌がサワー種中で消滅したのは pH の低下が原因と考えられた。

さらに、穀物由来の液体培地中でグラム陰性菌と乳酸菌を共培養時した際の菌数変化について検討した結果、乳酸菌の菌数がグラム陰性菌との共培養で高まることが明らかとなった。このことから、グラム陰性菌がサワー種発酵の初期にみられる乳酸菌数の増加に貢献していることが示唆された。

Sourdough, Lactic acid bacteria, Gram negative bacteria

講演番号：4B21a01
講演日時、会場：3 月 29 日 09:00～ B 校舎 21 会場

金属腐食に及ぼす環境微生物の影響評価(1)鉄粒を用いた腐食性細菌の探索

Environmental microbially-influenced metal corrosion (1)Screening for iron corrosive microorganisms from sediment sample by iron granules

○長岡 亨、平野 伸一、松本 伯夫 (電中研)
○Toru NAGAOKA, Shin-ichi HIRANO, Norio MATSUMOTO (CRIEPI)

【背景および目的】原子力発電によって発生する放射性廃棄物の地層処分では、放射性物質の浸出抑制のため、廃棄体は炭素鋼等の金属製の処分容器に封入し、その周りにベントナイトを主成分とした緩衝材を施した上で、深部地下に埋設する計画となっている。一方、地下微生物生態の進展により、地下数 km 以深における微生物の存在が明らかになったことから、処分システム性能に及ぼす微生物影響が安全評価上の不確実性要因の一つと考えられ、廃棄体を覆う処分容器の腐食やベントナイトの変質などに微生物が影響を及ぼすと考えられている。処分容器の腐食挙動評価に関して、これまで硫酸還元菌のみが評価検討対象とされてきたが、近年、処分環境と同様な環境と想定される嫌気性環境下においてメタン生成菌、酢酸生成菌、硝酸還元菌などの関与が指摘されている。そのため、それら鉄腐食性細菌が処分容器の腐食挙動に及ぼす影響について評価する必要がある。そこで、嫌気的環境である湖沼堆積物等サンプルを採取し、鉄腐食性菌の探索を行った。
【方法および結果】淡水系および汽水系の湖沼などの底泥堆積物を植菌源として、金属鉄（市販試薬）を含む硫酸還元菌やメタン生成菌用培地等を用いて、鉄腐食性細菌の集積培養（30℃、静置培養）を試みた。培養期間中は、バイアル瓶のヘッドスペースガス(CH_4, H_2, CO_2 等)、溶存イオン濃度（SO_4^{2-}、NO_3^-等)、酸可溶鉄濃度、ATP などを経時的に測定した。メタン生成活性などが確認されたバイアルについて 2 週間毎に継代培養を行い、集積培養試料について菌叢解析を実施した。その結果、メタン生成や硫酸還元能を有する鉄腐食性細菌が環境中に普遍的に存在することが明らかになった。そのため、処分容器の腐食挙動評価には硫酸還元菌以外のメタン生成菌などの微生物の影響を加味する必要があると考えられた。

microbiologically influenced corrosion, screening, iron granules

講演番号：4B21a02
講演日時、会場：3 月 29 日 09:11～ B 校舎 21 会場

金属腐食に及ぼす環境微生物の影響評価(2) 電気化学的手法を用いた腐食微生物の選択的集積とその解析

Electrochemical cultivation for enrichment of iron corrosive bacteria from freshwater environment

○平野 伸一、長岡 亨、松本 伯夫（電中研）
○Shin-ichi HIRANO, Toru NAGAOKA, Norio MATSUMOTO (CRIEPI)

【背景および目的】 設備劣化を引き起こす金属腐食は主に化学・材料科学の側面から研究されてきたが、化学的な腐食を受けづらい環境（中性・常温・常圧、嫌気）で生じる急速な腐食や局所腐食などでは微生物腐食（Microbiologically influenced corrosion: MIC）として微生物反応の寄与が報告されている。微生物腐食による経済的損失は世界累計で年間 30-50 億ドルとも試算されており、適切な腐食抑制・対策の確立が急務である。対策立案のためには腐食現象を金属材料-微生物-環境の 3 者間の相互作用として捉え、適正に評価する必要があるが、腐食を誘引する微生物種やその腐食メカニズムなどの報告は限定的であり、基盤となる知見が不足している。そこで、本研究では地下に埋設された金属材料（設備）を想定し、特に腐食微生物の知見の少ない淡水環境から嫌気条件下で腐食能を示す微生物を電気化学的手法により集積し、それらが腐食へ及ぼす影響を評価することを目的とした。
【方法及び結果】 嫌気条件下、金属鉄の腐食現象は鉄表面に生じた電位差によって進行するアノード側での鉄の酸化溶解反応とカソード側でのプロトンの還元反応に担われている。微生物腐食では鉄由来の電子、もしくはカソード反応で生じた水素を電子供与体として使用する微生物の存在によりカソード反応が促進され、腐食が促進されると考えられている。そこで、金属鉄表面でのカソード反応に依存した生育を行う腐食微生物を環境試料から選択的に集積するために、嫌気条件下(N_2:CO_2=80:20)、硫酸塩を含む淡水系無機塩培地に湖沼底泥を微生物源として接種し、37℃で 3 週間、作用極（鉄）・対極、参照電極を設置した三極式培養システムにおいて作用極に電位を印加しながら（-650 mV vs Ag/AgCl）半バッチ式の集積培養を行った。集積培養後、CO_2 を炭素源とし、作用極上でのカソード反応に依存して生育した微生物群の鉄腐食活性を繊維状鉄（スチールウール 0.025mm）を単一電子供与体としたバイアル瓶培養試験にて評価した。鉄と硫酸塩存在下において菌の増殖に伴った酢酸の生成、硫酸イオンの減少が確認され、硫化鉄を主成分とする黒色沈殿が鉄表面に形成された。培養終了後、腐食による繊維状鉄の重量変化を測定した結果、1 週間で重量が最大 30%程度減少していた。一方、無菌区では自然酸化に伴う水素発生が見られたが酢酸生成、硫酸還元は見られず、また硫酸塩非存在下で腐食反応は進行しなかったことから、この淡水環境での顕著な腐食は酢酸菌と硫酸還元菌の共存によるものと推定された。微生物腐食の影響を適正に評価するためには、単一の反応だけでなく複合的な作用を考慮する必要があると言える。現在、電気化学的解析等からこれら腐食微生物の作用機序について解析を進めている。

MIC, sulfate reduction, electrochemical cultivation

講演番号：4B21a03
講演日時、会場：3 月 29 日 09:22～ B 校舎 21 会場

金属腐食に及ぼす環境微生物の影響評価（３）集積培養菌群による炭素鋼試験片の腐食試験
Environmental microbialli-influenced metal corrosion (3) Investigation of carbon steel corrosion using microbial consorthium enriched by iron granules
○松本 伯夫、平野 伸一、長岡 亨 (電中研)
○Norio Matsumoto, Shin-ichi Hirano, Toru Nagaoka (CRIEPI)

【背景および目的】放射性廃棄物の処分システム性能に及ぼす微生物影響として、炭素鋼等の金属製処分容器の腐食などが挙げられる。我々のグループでは、従来、硫酸還元菌のみが評価検討対象とされてきた処分容器の腐食挙動評価に関して、処分環境と同様な環境と想定される嫌気性環境下において近年報告されている、メタン生成菌、酢酸生成菌、硝酸還元菌などの関与に着目し、検討を始めている。前講演では、湖沼などの底泥堆積物を植菌源として、金属鉄を含む液体培地等を用いて、鉄腐食性細菌の集積培養を試み、メタン生成や硫酸還元能を有する鉄腐食性細菌が環境中に普遍的に存在することを明らかにした。本報告では、それら集積培養菌群等を用いて実施した炭素鋼試験片の腐食試験結果について報告する。
【方法および結果】環境試料および環境から分離した鉄腐食性菌の集積培養菌群 4 試料を用いて、炭素鋼試験片（8x8x0.5mm）の腐食試験を実施した。試験期間中は、バイアル瓶のヘッドスペースガス(CH_4, H_2, CO_2 等)、溶存イオン濃度（SO_4^{2-}、有機酸等)、酸可溶鉄濃度、ATP などを経時的に測定した。その結果、全ての試験系で炭素鋼試験片の腐食減量が認められた。溶存イオンやガス分析の結果から、この腐食現象には、従来から検討されてきた硫酸還元菌以外に、メタン生成菌や酢酸生成菌が関与していることが明らかになった。また、走査型電子顕微鏡等による観察の結果、細菌群による孔食とみられる腐食箇所が認められた。

microbially influenced corrosion, enrichment culture, carbon steel

講演番号：4B21a04
講演日時、会場：3 月 29 日 09:33～ B 校舎 21 会場

プラスミド RP4 保持に伴う負荷に関与する転写単位の発見
Transcription unit involved in the fitness cost of plasmid RP4.
○杉山 大介[1]、水口（鈴木） 千穂[1]、高橋 裕里香[2]、岡田 憲典[1]、野尻 秀昭[1]([1]東大生セ、[2]富山県大生工科・生工研セ)
○ Daisuke SUGIYAMA[1], Chiho SUZUKI-MINAKUCHI[1], Yurika TAKAHASHI[2], Kazunori OKADA[1], Hideaki NOJIRI[1] ([1]The Univ. of Tokyo, [2]Toyama Prefectural Univ.)

【目的】プラスミドは宿主間を水平伝播し、宿主に難分解性物質分解能や多剤耐性能等の新規形質を与える一方で、宿主の生育にとって負荷となる場合もある。これは非選択条件下においてプラスミド保持株が他の細菌に淘汰されやすいことを示唆しているが、実際には淘汰されずに生き残る場合や、さらには他の細菌に対して優占化する現象も観察されている。昨年度までに、当研究グループは多剤耐性プラスミド RP4 (IncP-1、60 kb)を保持させた *Pseudomonas putida* KT2440 株 (以下 KTRP4)を用いてプラスミドを保持していない KT2440 株 (以下 KT)との競合培養を行うことでプラスミド保持株の生き残りやすさ (fitness)を評価し、非選択条件下において優占化した KTRP4 (以下進化株)を単離した。進化株において全塩基配列を KTRP4 と比較したところ、宿主染色体上の PP_5401 及び PP_5402 の遺伝子間領域に変異が存在していた。そこで本研究ではプラスミド保持株が優占化するメカニズムを解明することを目的として、進化株より見出された変異点周辺領域の解析を行った。
【方法・結果】PP_5401 と PP_5402 の遺伝子間領域について RT-PCR を行ったところ、変異点を含むおよそ 1.5 kb の転写が確認された。また、KT 及び KTRP4 について定量 RT-PCR により 2, 4, 6, 8 h 培養時における転写量を測定したところ、2, 4 h で KTRP4 において転写が誘導されていた (Fig. 1)。そこで進化株において 2 h 培養時における転写量を KT 及び KTRP4 と比較した。進化株は RP4 を保持しているにもかかわらず転写誘導が見られず、転写量は KT と同程度まで低下していた。RT-PCR で転写が確認されたおよそ 1.5 kb を過剰発現させるベクターを保持した KT (以下過剰発現株)を作製したところ、過剰発現株は LB 寒天培地上に形成するコロニーのサイズが小さくなっていた (Fig. 2)。LB 寒天培地上に形成するコロニーが小さくなる現象は KTRP4 でも観察されているが進化株では観察されていない (Fig. 2)。これらの結果より、RP4 保持によって PP_5401 及び PP_5402 の遺伝子間領域の転写が誘導されることで宿主の負荷となること、進化株では当該領域に変異が生じることで転写が抑制されたか RNA の安定性が低下して宿主への負荷が軽減されたことが示唆された。

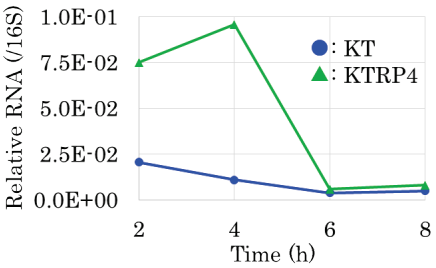


Fig.1 KT及びKTRP4における変異点周辺領域の経時的転写量変化

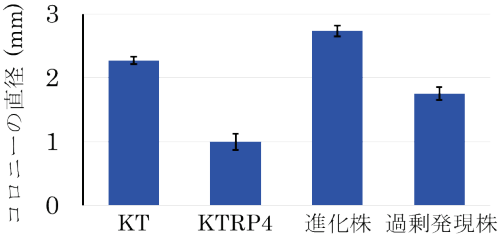


Fig.2 各株におけるコロニーサイズの比較

fitness cost, plasmid, *Pseudomonas*

講演番号：4B21a05
講演日時、会場：3 月 29 日 09:44～ B 校舎 21 会場

LysR 型転写制御因子 MexT がプラスミド負荷を引き起こす分子機構の解析

MexT-driven plasmid fitness cost in Pseudomonas bacterium

○久保 彩、水口（鈴木）千穂、能登 優、岡田 憲典、野尻 秀昭（東大・生物工学セ）
○Aya KUBO, Chiho SUZUKI-MINAKUCHI, Suguru NOTO, Kazunori OKADA, Hideaki NOJIRI (The Univ. of Tokyo)

【背景・目的】プラスミドは宿主に多剤耐性能や難分解性物質分解能等を与えるため、宿主は選択条件下において優位に生育できる。一方、非選択条件下ではプラスミドの保持は宿主の生育に負荷となり、保持株が淘汰され易くなる例が報告されている。当研究グループでは以前より *Pseudomonas putida* KT2440 株にカルバゾール分解プラスミド pCAR1 を保持させた株（KTPC）と非保持株（KT）を競合培養し、集団中における KTPC の生き残りやすさ“fitness”について研究してきた。染色体上の LysR 型転写制御因子 MexT に欠失または変異が生じた株では競合培養後の生残率が上昇するため、fitness が向上することが分かっている。さらに、KTPC の *mexT* 破壊株を用いたトランスクリプトーム解析から、MexT に制御される遺伝子の大部分は pCAR1 保持によって恒常的に発現が上昇する遺伝子(1)であることが示された。pCAR1 保持・非保持に関わらず *mexT* 自身の転写量は変動しないことも明らかとなった。よって、本研究では pCAR1 保持により MexT の転写制御能が変化することでプラスミド保持による生育負荷が生じていると予想し、MexT による制御機構の解明を目的とした。
【方法・結果】MexT により制御されることが知られている多剤排出ポンプをコードする遺伝子 *mexEF-oprN* および機能未知の遺伝子 PP_4858 について、ルシフェラーゼアッセイを用いて転写に必要なプロモーター領域を特定した。その結果、*mexEF-oprN* では少なくとも上流 600 bp 以上でプロモーター活性がみられた。また、PP_4858 では上流 160 bp 以上を用いると活性がみられるが、上流 95 bp 以下では活性がみられないことが明らかとなった（図）。PP_4858 上流 86 bp-110 bp の領域には *P. aeruginosa* PAO1 株で知られている MexT コンセンサス配列と類似する配列が存在する。この類似する配列に含まれる LTTR box および直後に存在する配列中の各々2 塩基ずつを変異させたプロモーター領域を用いたルシフェラーゼアッセイでは活性がみられなくなった。これにより、推定 MexT コンセンサス配列が *P. putida* KT2440 株においても重要であることが予想された。本発表では以上の結果に加え、MexT および PP_4858 上流配列を用いたゲルシフトアッセイの結果についても報告する。

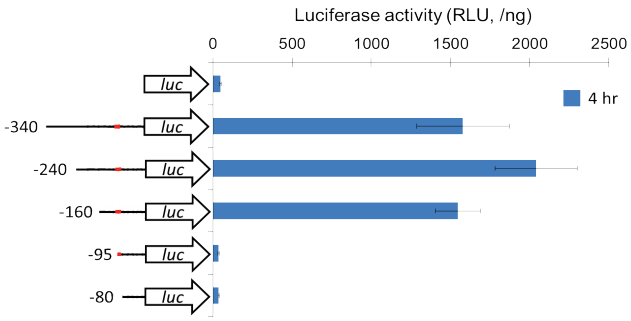


図. PP_4858 上流配列を用いたルシフェラーゼアッセイ
対数増殖期の細胞を用いた。MexT 結合に関与する推定コンセンサス配列を赤色で示した。

1) Takahashi *et al.*, 2014, Environ. Microbiol., doi: 10.1111/1462-2920.12515

Plasmid, fitness cost, MexT

講演番号：4B21a06
講演日時、会場：3 月 29 日 10:05～ B 校舎 21 会場

大腸菌におけるフラビン還元酵素による鉄貯蔵タンパク質からの二価鉄放出反応
Ferrous iron release from iron storage protein by *E. coli* flavin reductase

佐藤 純一[1]、中元 翔太[1]、○石井 達也[1]、武田 晃治[2]、吉村 悦郎[3]、中川 純一[4]、阿部 晃[5]、木俣 真弥[1]、川崎 信治[1]、新村 洋一[1]（[1]東農大応生科・バイオ、[2]東農大・教職、[3]東大院農生科・応生科、[4]東農大生物産業・食香、[5]札幌医大医・眼科）
Junichi SATO[1], Shota NAKAMOTO[1], ○Tatsuya ISHII[1], Kouji TAKEDA[2], Etsuro YOSHIMURA[3], Junichi NAKAGAWA[4], Akira ABE[5], Shinya KIMATA[1], Shinji KAWASAKI[1], Youichi NIIMURA[1] ([1]Dept. of Bioscience, Tokyo Univ. of Agric., [2]Edu. course, Tokyo Univ. of Agric., [3]Dept. of App. Biol. Chem. , The Univ. of Tokyo, [4]Dept. of Food and Cosmetic Sci. , Tokyo Univ. of Agric., [5]Dept. of Ophthal. , Sapporo Med. Univ.)

【背景・目的】フラビンには riboflavin、FMN、FAD が含まれる。Riboflavin は細胞内でタンパク質に結合しない状態で存在するが、FMN と FAD はタンパク質に結合し、酸化還元酵素の補因子として機能する。タンパク質非結合型の FMN、FAD（遊離 FMN、遊離 FAD：遊離フラビン）が関与する酵素反応が知られているが、細胞内遊離フラビンの実態は不明であった。

当研究室では細菌 *Amphibacillus xylanus* 細胞内から遊離 FAD を検出し、酸素代謝に関与する可能性を報告した(Ohnishi et al. 1994)。大腸菌において、還元フラビンが鉄貯蔵タンパク質内の三価鉄還元反応に関与するとの報告がある（Yasmin *et al.* J. Biol. Chem., 2011）。我々は、遊離フラビン非関与の鉄還元酵素として ferredoxin $NADP^+$ reductase (Fpr)を精製し、馬由来鉄貯蔵タンパク質と反応することを報告した [1)]。Fpr はフラビン還元活性を有し、遊離フラビン存在下で鉄還元活性が増加する [1)]。そのため、フラビン還元酵素の鉄貯蔵タンパク質への反応性に興味が持たれた。

本報告では、大腸菌の無細胞抽出液からフラビン還元酵素の精製し、鉄貯蔵タンパク質との反応性を検討した。

【方法・結果】鉄貯蔵タンパク質内に貯蔵される三価鉄は、還元されると二価鉄として放出される（二価鉄放出反応）。大腸菌の無細胞抽出液を用い、遊離フラビン存在下で大腸菌の鉄貯蔵タンパク質（ ferritinA（FtnA）と bacterioferritin（Bfr） ）との反応性を検討した結果、遊離フラビンに依存した FtnA と Bfr からの二価鉄放出反応が検出された。次に、大腸菌無細胞抽出液を Butyl TOYOPEARL650S に供し、150μM のフラビン（riboflavin、FMN、FAD）を用いてフラビン還元活性を有する酵素の分画を試みた。その結果、6 つの画分（画分 A～F）に分画され、全ての画分は遊離フラビン存在下で FtnA と Bfr からの二価鉄放出反応を示した。各画分のフラビン還元活性を指標とした収率を求めた結果、高い収率を示した画分 B、画分 E、画分 F は高い二価鉄放出反応を示した。画分 B はウエスタン解析により Fpr が存在すると示唆されたため、recombinant Fpr (rFpr) を用い、FtnA と Bfr からの二価鉄放出反応を検討した。その結果、rFpr は遊離フラビン非存在下では二価鉄放出反応を示さないが、遊離フラビン存在下において、rFpr は FtnA と Bfr からの二価鉄放出反応を顕著に促進した。現在、画分 E と画分 F の精製を行っている。

1）Takeda, K. et al. (2010) Biometals 23, 727-737

non protein-bound flavin, flavin reductase, iron storage protein

講演番号：4B21a07
講演日時、会場：3 月 29 日 10:16～ B 校舎 21 会場

Amphibacillus xylanus における遊離フラビンが関与する好気代謝と、微生物界における遊離フラビンの分布（第２報）

Aerobic metabolism involved in free flavins in *Amphibacillus xylanus* and their distribution in bacteria (2nd)

木俣 真弥[1]、富塚 駿[1]、○名須川 哲哉[1]、望月 大地[1]、藤田 信之[2]、阿部 晃[3]、中川 純一[4]、佐藤 純一[1]、川崎 信治[1]、新村 洋一[1] ([1]東農大応生科・バイオ、[2]NITE、[3]札幌医大医・眼科、[4]東農大生物生産・食香)

SHINYA KIMATA[1], SYUN TOMIZUKA[1], ○TETSUYA NASUKAWA[1], DAICHI MOCHIZUKI[1], NOBUYUKI HUJITA[2], AKIRA ABE[3], JUNICHI NAKAGAWA[4], JUNICHI SATO[1], SHINJI KAWASAKI[1], YOUICHI NIIMURA[1] ([1]Dept. Bio. Tokyo Univ. Agri., [2]NITE, [3]Dept. Oph. Sapporo Med. Univ, [4]Dept. Food and Cosmetic. Tokyo Univ. Agri)

〈背景・目的〉

フラビン (FAD と FMN) は一般的に酵素タンパク質に結合し補酵素として機能すると知られており、非タンパク質結合性フラビン (遊離フラビン) とその代謝酵素の実体は不明であった。そこで、我々は *Amphibacillus xylanus* 細胞中から遊離 FAD を見いだし、酸素代謝酵素 NADH oxidase (Nox) の遊離 FAD 存在下での活性化を報告した[1)]。遊離 FAD 濃度で活性化される酸素代謝酵素として Nox と NAD(P)H oxidoreductase (NPO)を精製した[2)]。Nox と NPO の細胞内発現解析から、本菌の好気代謝において Nox は、酸素還元および AhpC (Prx)存在下での過酸化物還元と NAD^+の再生に関与し[3)]、NPO は $NADP^+$の再生に関与することが推定された[2)]。本発表では、Nox と NPO の NAD^+と $NADP^+$ 再生への寄与度の解明を目的に、細胞内の NADH oxidase 活性画分と NADPH oxidase 活性画分を各々分画し、細胞内遊離 FAD 濃度 (10 μM) にて活性を比較した。さらに、昨年度の発表に引き続き、*A. xylanus* 以外の微生物の遊離フラビン定量を試みた。

〈方法・結果〉

① NAD(P)H oxidase 活性の分画：粗酵素液を Butyl TOYOPEARL 650S を用いて、遊離 FAD 存在下で NADH oxidase 活性と NADPH oxidase 活性を共に含む主要画分を分離した。この画分を DEAE sepharose fast flow に供し、両活性画分を完全に分離した。NADH oxidase 活性画分は遊離 FAD 存在下で NADH のみを利用した。一方、NADPH oxidase 活性画分は、遊離 FAD 存在下で NADH と NADPH の両方を利用した。NADH oxidase 活性画分の主要酵素は Nox であり、NADPH oxidase 活性画分の主要酵素は NPO であった。よって、*A. xylanus* 細胞内の主な NAD^+再生酵素は Nox であり、$NADP^+$再生酵素は NPO であることが示唆された。

② 微生物の遊離フラビン定量： 昨年度に引き続き *Amphibacillus* 属 1 株、*Pediococcus* 属 1 株、*Lactobacillus* 属 2 株、*Lactococcus* 属 1 株、*Bacillus* 属 1 株、*Shewanella* 属 1 株の主要遊離フラビン濃度を比較した。全供試菌で異なる濃度の遊離フラビンが見いだされた。呼吸鎖と鉄要求性のある菌 (*B. liche*^{T}. と *Shew. onei.* MR-1) に比べ、呼吸鎖を欠如し、鉄要求性の無い菌 (*Pe. pen.*^{T}, *L. plan.*^{T} と *L. del.*^{T}) の遊離フラビン / 総フラビンの割合は大きくなる傾向が観察された。

1) Ohnishi, K. et al. *J.B.C.* (1994), **269**, 31418-31423.　2) 富塚駿ら 2014 年 農芸化学会
3) Mochizuki, D. et al. *Microbiology*. (2014), **160**, 340-352.

free flavin, NADH oxidase (Nox), NAD(P)H oxidoreductase (NPO)

講演番号：4B21a08
講演日時、会場：3 月 29 日 10:27～ B 校舎 21 会場

グルコース添加による *Lactobacillus brevis* の沈降作用について

Sedimentation of *Lactobacillus brevis* by the addition of glucose.

○齋藤 勝一、中村 敏英 ((独)農研機構・食総研)
○Katsuichi Saito, Toshihide Nakamura (NARO-NFRI)

【目的】近年植物に由来する乳酸菌の食品利用が活発に行われている。一方、乳酸菌と植物との相互作用など植物に由来する乳酸菌の機能の詳細は十分明らかになっていない。そこで私たちは植物との関わりの観点からの乳酸菌機能の解明を目指し、これまでに付着・凝集作用を有する乳酸菌と植物成分の探索を行った。その結果、*Lactobacillus brevis* がキシランの添加により凝集し、本作用が菌体の電荷とキシランとの静電的な作用に起因することを見出した[1)]。また、本菌の凝集を引き起こすその他物質の検索を行ったところ、デキストランやペクチンなどの糖類でキシラン同様の凝集作用が確認でき、一部菌株においてはグルコースやスクロースなどの単糖・二糖の添加による菌体の沈降も認められた[2)]。そこで今回は、グルコース添加による沈降作用に着目し検討を行った。

【方法】乳酸菌として(独)製品評価技術基盤機構・生物遺伝資源部門(NBRC) 保有の *L. brevis* 7 株を用いた。各菌株を MRS 培地で 30℃、24 時間静置培養し、得られた菌体を生理食塩水により洗浄後、OD_{600}＝1 となるように生理食塩水に懸濁し以降の実験に供した。グルコースを生理食塩水に 2%となるように溶解し、菌体懸濁液とグルコース溶液を等量混合し 30℃で保温後、経時的に一定量の懸濁液を試験管の中間点から抜き取りその OD_{600} を測定することにより沈降作用の評価を行った。

【結果】キシランとの作用を確認した *L. brevis* NBRC 3345、3960、13109、13110 において、グルコース添加の 2 時間後以降に菌体の沈降が認められた。一方、*L. brevis* NBRC 12005、12006 株ではキシランによる凝集が確認できたもののグルコースによる作用は見られず、*L. brevis* NBRC 107147 においてはキシラン、グルコースともに沈降や凝集は見られなかった。生理食塩水（pH4.8）に換えてリン酸バッファー（pH7.0）を用いたグルコース溶液を作成し、グルコースによる沈降作用が確認できた菌株の 2 時間保温後の作用を比較したところ、リン酸バッファーを用いた場合には沈降作用が確認できなかった。このことから、グルコースによる沈降は pH による影響を受けるものと考えられた。

【文献】1) Saito et al. (2014) *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 78(12), 2120-2127.
2) 齋藤、中村　日本乳酸菌学会 2014 年度大会講演要旨

Lactobacillus brevis, glucose, sedimentation

講演番号：4B21a09
講演日時、会場：3 月 29 日 10:38～ B 校舎 21 会場

鉄呼吸微生物による不溶性鉄酸化物の還元とフミン酸の影響

Reduction of insoluble iron oxide by an iron respiration microbe in the existence of humic acid.

○水沼 環、斉木 博、鈴木 義規 (東京工科大学)
○Tamaki MIZUNUMA, Hiroshi SAIKI, Yoshinori SUZUKI (Tokyo Univ. Technol.)

【はじめに】鉄呼吸微生物とは嫌気条件下で三価鉄を異化的に還元する呼吸形式をもち、環境中の不溶性三価鉄を還元し、生態学的に重要な二価鉄イオンを生成していると考えられる。しかし、不溶性の三価鉄をどのように還元しているかは十分に明らかにされていない。本研究では鉄呼吸微生物を用いて、環境中に多く存在するマグネタイトの還元について調べた。また、細胞外電子シャトルと考えられているフミン酸を用いて、その特性と微生物の増殖に対する影響を検証した。

【実験方法】水田土壌から単離された鉄呼吸微生物(Clostridium 属[TS-1])を、電子供与体として H_2、電子受容体として Fe(Ⅲ)EDTA を用いて嫌気培地で前培養した後、電子受容体に Fe_3O_4 を用いた培地で培養した。菌の増殖量は直接計数法及び Lowry 法を用い、鉄還元量はフェナントロリン吸光度法を用いた。また、フミン酸は 0.02 mg/ml になるように添加した。次にフミン酸が内包していると思われる鉄を、液中 0.01 %相当のフミン酸から 5 mM 相当の EDAT・2Na で抽出して鉄濃度を測定した。また、鉄フリーのフミン酸を用いた培養も行った。

【結果と考察】微生物が呼吸を行う際は増殖と電子受容体の還元が同時に起こり、相関がみられるはずである。TS-1 による Fe(Ⅲ)EDTA の還元は 27 時間の培養で 1.7 mM の Fe(Ⅲ)が還元され最終菌体密度は 1.0×10^8 cells/ml になった。この間、菌の増殖と鉄還元の間には明らかな相関が見られた。一方 Fe_3O_4 存在下の培養では、直接係数法による計測で培養開始から 3 日目までに菌数が 3×10^6 cells/ml から 2×10^8 cells/ml まで増殖し、その後減少した。しかし鉄還元量は 3 日目以降も増加し続け 16 日後には 8.7 mM 還元した。よって増殖と鉄還元量には相関がみられなかったが、その後 Lowry 法を用いた計測では 7×10^7 cells/ml まで増殖し相関が見られた。これは Fe_3O_4 の表面に菌体が付着していき菌体数が減少したように見えたと考えられる。また、フミン酸を添加した場合、菌の増殖が加速され、添加しない場合と比べて菌体数に 20 倍の差が見られた。そこで、フミン酸が内包している鉄濃度を計測した結果、フミン酸濃度 0.01 %で 0.05 mM 相当の鉄が確認できた。よって鉄呼吸微生物は土壌中の鉄だけでなく、フミン酸内の鉄も用いて鉄呼吸を行っている可能性が考えられる。

本実験では鉄呼吸微生物による Fe_3O_4 還元の確認でき、環境中においても不溶性三価鉄を還元し他の生物に二価鉄を供給している可能性が示唆された。また、フミン酸が微生物の増殖を促進させたため、環境中での二価鉄の供給に対する影響も大きいと思われる。

iron respiration microbe, humic acid, magnetite

講演番号：4B21a10
講演日時、会場：3 月 29 日 10:49～ B 校舎 21 会場

ベチバー抽出物の枯草菌のストレス応答機構に与える影響の解析
Analysis of Vetiver extracts affecting stress response of *Bacillus subtilis*
○小澤 良基[1]、今泉 優[1]、吉川 博文[2]、長谷川 登志夫[1]、朝井 計[1] ([1]埼玉大学院理工、[2]東京農大応生科)
○Yoshiki OZAWA[1], Yu IMAIZUMI[1], Hirofumi YOSHIKAWA[2], Toshio HASEGAWA[1], Kei ASAI[1] ([1]Saitama Univ., [2]Tokyo Univ of Agric.)

【目的】植物由来の抽出物は精油として、古くから薬やお香など様々な用途に利用されている。精油には多数のテルペン化合物が含まれており、様々な微生物に対し抗生作用を示すと言われているが、有効成分や作用機序はあまり知られていない。ベチバーという植物の根由来の精油は枯草菌や黄色ブドウ球菌などグラム陽性細菌に対し特異的に抗細菌活性を持つということが報告されている。抗生物質の発見により様々な感染症の治療が可能となってきたが、耐性菌の出現は深刻な問題となっている。従って、新規の抗菌活性をもつ化合物の発見及びその作用機序の理解は非常に重要である。そこで我々はベチバー根抽出物を精製し、細菌の対数増殖・定常期の増殖に影響を与える因子とその作用を調べた。
【方法と結果】ベチバー根抽出物をグラム陽性土壌細菌である枯草菌とグラム陰性腸内細菌である大腸菌の対数増殖常期細胞に対して添加したところ、大腸菌と比較し低濃度で枯草菌の細胞形態の異常と増殖阻害、さらに速やかな濁度の減少を誘発した。また定常期の枯草菌細胞に対して添加しても対数増殖期と同様、濁度の減少が見られた。定常期細胞の速やかな溶菌現象の誘発は、タンパク質や細胞壁などの合成阻害活性を持つ既知の抗生物質では見られない。ベチバー根抽出物を精製し解析したところ、クシモールというセスキテルペン化合物にその活性があることを見出した。
ECF シグマ因子群は細菌の細胞表層に影響する様々なストレス応答に関わるシグマ因子群である。ベチバー根抽出物の添加により、どのような ECF シグマ因子が活性化されるのかを調べることでベチバー根抽出物がどのようなストレスに対応しているのかを予測した。その結果、塩ストレスや細胞壁ストレスなどに応答する ECF シグマ(SigM)が活性化した。また ECF シグマ多重破壊株では、野生型と比較しベチバー根抽出物の感受性が上昇した。このことからクシモールは細胞表層のストレスとなっていることが示唆された。ECF シグマ多重破壊株を用いて耐性がある程度回復したサプレッサー株を取得し、全ゲノムシーケンスによりサプレスの原因変異の同定を試みた。サプレッサー株では DNA 修復に関与する遺伝子(*pnpA, xseB*)の変異が耐性回復に寄与していることが分かった。クシモールが DNA ジャイレースに結合し DNA 合成を直接阻害するという報告があり、サプレス変異はこの作用に関与している可能性がある。*pnpA* や *xseB* の転写は ECF シグマ因子群の制御下にあるという報告はない。従ってクシモールは細胞表層と DNA 合成の 2 点に作用していると考え解析を行っている。

essential oil, terpenoids, Bacillus subtilis

講演番号：4B21a11
講演日時、会場：3 月 29 日 11:10～ B 校舎 21 会場

ビフィズス菌の O_2 感受性に関与する原因酵素に関する研究
Characterization of enzymes involve in the O_2-sensitivity of *Bifidobacterium*
○大形 篤史、加藤 史朗、國分 雪絵、木村 優介、新村 洋一、川崎 信治（東農大バイオ）
○Atsushi Ogata, Shirou Katou, Yukie Kokubu, Yuusuke Kimura, Yoichi Niimura, Shinji Kawasaki (TUA Bio)

【目的】

我々は嫌気性菌の O_2 感受性メカニズムの解明を目的として、代表的な嫌気性菌である *Bifidobacterium* 属細菌を用いて研究を行っている。これまでに、１）*Bifidobacterium* 属内には O_2 感受性株から微好気性株までが幅広く分布すること、２）O_2 感受性株は O_2 存在下で自ら培地中に過酸化水素（H_2O_2）を蓄積し生育が阻害されること、３）H_2O_2 生成の原因酵素として *Bifidobacterium* 属の代表種で O_2 に感受性を示す *B. bifidum* から dihydroorotate dehydrogenase (DHOD)が精製され、本酵素が O_2 感受性の原因酵素として機能しうること、を報告してきた。本学会では、O_2 に高い感受性を示し、ヒト腸内に広く分布する *B. adolescentis* を供試菌として用い、O_2 感受性の原因酵素について解析を行ったので報告する。

【方法・結果】

B. adolescentis が生育可能な O_2 濃度を調査したところ、O_2 濃度２％の大気下における液体振盪培養において顕著な生育阻害が観察された。本感受性はこれまでに我々が生育試験を行った株の中で最も高いものであった。低 O_2 濃度下でストレス付与培養を行った *B. adolescentis* の無細胞抽出液を用いて O_2 代謝酵素活性を探索したところ、NAD(P)H を電子供与体として H_2O_2 を生成する O_2 代謝酵素活性が検出された。そこで、各種カラムを用いて NAD(P)H oxidase 活性を指標に H_2O_2 生成に関与する原因酵素の精製を行い、SDS-PAGE にて単一バンドを示す精製酵素を得た。現在、本酵素の機能性を解析し、他の *Bifidobacterium* 属細菌から精製した O_2 代謝酵素との比較解析を行っている。

Bifidobacterium adolescentis, NADPH oxidase, O_2

講演番号：4B21a12
講演日時、会場：3 月 29 日 11:21～ B 校舎 21 会場

N-アセチルスクロサミンの腸内細菌による資化性

N-acetylsucrosamine-assimilation properties of intestinal bacteria.

○篠崎 佑子[1]、萩原 未来[2]、平野 貴子[2]、袴田 航[1,2]、西尾 俊幸[1,2] ([1]日大院生資科・生物資源利用、[2]日大生資科・生命化)

○YUKO SHINOZAKI[1], MIKU HAGIWARA[2], TAKAKO HIRANO[2], WATARU HAKAMATA[1,2], TOSHIYUKI NISHIO[1,2] ([1]Graduate School of Bioresource Sciences, Nihon Univ., [2]Dept. Chem. and Life Sci., Bioresource Sciences. Nihon Univ.)

【目的】 当研究室では、糖転移型 β-フルクトフラノシダーゼを含む *Aspergillus oryzae* の乾燥菌糸を用いて、*N*-アセチルグルコサミン(GlcNAc)とフルクトースから成る 2 糖である *N*-アセチルスクロサミン(SucNAc)の酵素合成に成功した[1)]。さらに、本菌の菌糸を充填したカラムリアクターを用いることにより SucNAc の連続生産が可能となったため[2)]、現在、本オリゴ糖について用途開発を行っている。これまでの研究より、SucNAc が構造類似体であるスクロースよりも、酸や熱に対して安定であり、また種々のスクロース加水分解酵素では分解されにくいことが分かっている。現在利用されている機能性オリゴ糖と同様に、SucNAc が難資化性・難分解性であることから、本オリゴ糖のプレバイオティクスとしての可能性に着目し、各種腸内細菌による資化性試験を行うことにした。

【方法】*Bifidobacterium*、*Lactobacillus*、*Clostridium*、*Bacteroides*、*Enterococcus*、*Eubacterium* といった各種腸内細菌を 30 mM SucNAc 含有 MRS(-Glc)培地及び、比較として 30 mM スクロース含有 MRS(-Glc)培地に OD_{600} が約 1 となるように接種し、嫌気的に培養した。各時間毎に培養液を分取し菌体濁度を測定した。また、培地中の糖は、TLC により定性・定量分析を行った。さらに、終濃度 5 mM となるようにグルコースを添加した系でも同様の実験を行い、SucNAc の資化性に変化が現れるか確認した。

【結果】 *Bifidobacterium*、*Clostridium*、*Bacteroides*、*Eubacterium* 属の一部の細菌が SucNAc を資化して、増殖することが分かった。特に *Bifidobacterium* 属の細菌の中でも *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* や *Bifidobacterium breve* といった乳児の腸内に多く見られる細菌が SucNAc を資化して増殖する傾向がみられた。これらの菌はグルコースを添加した系において、SucNAc の資化・増殖が促進された。また、グルコースを資化した後に SucNAc の資化が始まるというジオーキシーの現象が観察された。

1) Takako Hirano, Toru Wada, Sumire Iwai, Hitoshi Sato, Makoto Noda, Mai Juami, Masatoshi Nakamura, Yasuko Kumaki, Wataru Hakamata, and Toshiyuki Nishio, *Carbohydr. Res.*, **353**, 27-32 (2012)
2) Hitoshi Sato, Saeko Yokochi, Terumi Kasama, Takako Hirano, Wataru Hakamata, and Toshiyuki Nishio, *J. Appl. Glycosci.*, **59** 153-160 (2012)

N-acetylsucrosamine, intestinal bacteria, carbohydrate assimilation

講演番号：4B21a13
講演日時、会場：3 月 29 日 11:32～ B 校舎 21 会場

Lactobacillus delbrueckii のイヌリン型フルクタン資化機構の解析
Analysis of mechanism of inulin-type fructans utilization by *Lactobacillus delbrueckii*
○辻川 勇治[1,2]、大澤 朗[1] ([1]神戸大農、[2]日本農芸化学)
○Yuji Tsujikawa[1,2], Rou Osawa[1] ([1]Kobe Univ., [2]JSBBA)

＜背景＞
プロバイオティクスを摂取する際に、その増殖を促進するプレバイオティクスを同時に摂取することはプロバイオティクスの効果を増強させる。代表的なプレバイオティクスの一つとして *L. delbrueckii* や *L. paracasei* 等の有用乳酸菌の増殖を促進するイヌリン型フルクタン（IFs）が報告されている。IFs とは末端にグルコースが結合したフルクトースの重合体である。この IFs の資化性や分解能に関して、*L. paracasei* については細胞外で多重合の分子を分解した後に遊離したフルクトースを細胞内に取り入れるということが報告されている一方で、*L. delbrueckii* は IFs を細胞外で分解しておらず、高重合度のものでさえ直接細胞内に取り込むことが本研究室の過去の研究により示唆されている。これまで、高分子体である IFs を直接細胞内に取り込み利用するという報告はない。従って、*L. delbrueckii* の IFs の取り込みメカニズムについての詳細な解析を行うことにした。

＜材料と方法＞
乳酸菌の基礎培地である MRS 培地から糖成分を除去した培地（mMRS 培地）に糖成分として終濃度 2%で IFs を添加した培地及びコントロールとして終濃度 2%でグルコースを添加した培地を作製し、*L. delbrueckii* JCM1002^T を対数期まで培養して RNA 抽出を行い RNA-seq を行った。さらに、そこで発現が高く見られた遺伝子に関して qRT-PCR を行い、遺伝子発現上昇の信頼性を評価した。また、上記と同様に *L. delbrueckii* JCM1002^T を培養後に全菌体タンパクを抽出し二次元電気泳動によって発現に差異が見られたスポットの同定を行った。

＜結果・考察＞
RNA-seq を行った結果、IFs を輸送する ABC トランスポーターとして 3 つの候補が見つかった。qRT-PCR の結果、それらの 3 つの全ての発現がグルコースで培養した時と比べて IFs で培養した時で高く発現することが確認された。二次元電気泳動の結果、候補である 3 つの ABC トランスポーターのうち 2 つの ABC トランスポーターの近傍に位置するタンパク質の発現上昇が観察された。現在は *L. delbrueckii* JCM1002^T において、どの ABC トランスポーターが IFs の輸送に関わっているのか、遺伝子の機能解析を進めているところである。

Lactobacillus delbrueckii, inulin-type fructans, glucose

講演番号：4B21a14
講演日時、会場：3 月 29 日 11:43～ B 校舎 21 会場

高脂肪食における難消化性オリゴ糖 DFAIII の投与による 腸内細菌叢への影響

Influence of DFAIII on intestinal microflora under high-fat diet

○鳶 諒介、石上 純佳、北川 航、曾根 輝雄、鎌形 洋一、浅野 行蔵（北大農）
○Ryosuke GAN, Sumika ISHIGAMI, Wataru KITAGAWA, Teruo SONE, Yoichi KAMAGATA, Kozo ASANO (Hokkaido Univ.)

【背景及び目的】　難消化性オリゴ糖の Difructose anhydride III (DFAIII)はプロバイオティクス素材として知られているビフィズス菌や乳酸菌が資化できないとされており，限られた特定の資化性菌の分解により腸内発酵を促進している．この際に生成された有機酸は腸内 pH を低下させ，宿主の細菌叢を改善させるため，DFAIII にはプレバイオティクスとしての効果を有することが知られている．本研究では DFAIII の投与した際の宿主へもたらされる有益な影響の評価，及び腸内細菌叢の変化の解明を試みた．さらに，従来高脂肪条件下において効果が弱まるとされていたプレバイオティクス素材で、効果の維持が期待できるものとして，既知のプレバイオティクス素材であるフラクトオリゴ糖(FOS)との比較により，本プレバイオティクスの評価を試みた．

【方法】　5 週齢の SD 系雄性ラット 42 匹を，対照群(Control 群)，DFAIII 投与群(DFAIII 群)，FOS 投与群(FOS 群)の標準脂肪食を与えた 3 群と，さらにそれぞれに対し 35%のコーン油を含む高脂肪食を与えた高脂肪食投与群(HF/Control 群，HF/DFAIII 群，HF/FOS 群)の計 6 群に 7 匹ずつ分け，30 日間の試験飼育を行った．解剖後，得られた盲腸内容物や糞便，血清を用いた腸内 pH，有機酸，胆汁酸，コレステロール等の解析を行った．さらに DFAIII 資化性菌の探索並びに，16S rRNA 遺伝子の V3 領域に基づく DGGE 法と V3-V5 領域に基づくパイロシーケンス法により腸内細菌叢の解析を行った．

【結果及び考察】　標準脂肪食下での DFAIII および FOS の投与は，腸内総有機酸量の増加と pH の低下を招き，盛んな腸内発酵が示された．高脂肪食では，FOS 群では腸内発酵の減少がみられた一方，DFAIII 群では依然として盲腸内容物量と有機酸量が多く，腸内 pH の有意な低下が確認された．血清中コレステロール解析では，高脂肪食条件下における HDL-コレステロール値が標準脂肪食と同程度で，高脂肪食摂取による減少を抑えることも示唆された。腸内細菌叢解析では，DFAIII の投与は Control 群や FOS 群とは異なる細菌叢を形成し，さらに高脂肪食と標準脂肪食との間での腸内細菌叢の変化が小さいことも確認された．本結果を受けて，DFAIII の投与は高脂肪食ストレスにも強い耐性を持つ強固な細菌叢を形成させ，これらの細菌の高い発酵能により腸内環境の改善が期待されると考えられた．

DFAIII, microflora, high-fat

講演番号：4B21a15
講演日時、会場：3 月 29 日 11:54～ B 校舎 21 会場

エタノール存在下での真性ホモ火落ち菌 *Lactobacillus homohiochii* の菌体脂肪酸組成変化
Effects of ethanol on cellular fatty acid composition in alcoholophilic lactic acid bacteria *Lactobacillus homohiochii*
○徳井 美里、浅井 拓也、山下 伸雄、明石 貴裕（白鶴酒造・研究）
○Misato TOKUI, Takuya ASAI, Nobuo YAMASHITA, Takahiro AKASHI (HAKUTSURU SAKE BREWING CO.,LTD.)

[目的]
真性ホモ火落ち菌である *Lactobacillus homohiochii* は、培養時にエタノールを加えた方が増殖が良いという好エタノール性を示し、さらにエタノール 20%含有でも生育可能という高いエタノール耐性を有するが、その機構についてはまだ不明な点が多い。
一方、乳酸菌や大腸菌など様々な微生物において、エタノール存在下で培養すると通常時と細胞膜脂肪酸組成が異なることが報告されており、膜組成の変化がエタノールへの応答と関連していることが示唆されている。そこで今回、*Lb.homohiochii* のエタノール応答機構の解明を目的として、同菌の脂肪酸組成が、エタノール濃度に応じてどのように変化するのかについて調べた。
[方法・結果]
SI 培地にそれぞれ 0、5、10、15%になるようエタノールを加えた培地で *Lb. homohiochii* NBRC13120 を培養し、growth phase 別に菌体を回収して菌体内脂肪酸組成を測定した。その結果、対数増殖期前期の菌体において、CysC19:0(ラクトバシル酸)の割合が、培地のエタノール濃度が高くなるにつれて増加する現象が観察された。CysC19:0 は C18:1 からシクロプロパン脂肪酸合成酵素(CFA synthase)によって合成され、細胞膜の流動性を低下させることが知られており、酸耐性などストレス応答との関連が報告されている。本菌においては特に 0%から 5%にかけて急増しておりエタノールとの関連が疑われたため、次に他の乳酸菌についてもこのような変化が見られるのか確認を行った。
同じ *Lactobacillus* 属乳酸菌であるが好エタノール性を持たない *Lb. casei* NBRC15883、*Lb. sakei subsp.sakei* NBRC15893、*Lb.fermentum* NBRC15885、*Lb. fructivorans* NBRC13954、及び同じく真性ホモ火落ち菌で好エタノール性を持つ *Lb. homohiochii* NBRC13121 を、同様に 5%エタノール存在下で培養し、その菌体内脂肪酸組成をエタノール非存在下培養時と比較した。その結果、0%→5%での CysC19:0 の大幅な増加は *Lb. homohiochii* 以外では見られなかった。このことから、CysC19:0 が *Lb.homohiochii* において、エタノールへの応答と関連している可能性が示唆された。

Lactobacillus, fatty acid composition, ethanol

講演番号：4B21p01
講演日時、会場：3 月 29 日 14:00～ B 校舎 21 会場

好アルカリ性細菌 *Bacillus pseudofirmous* OF4 株由来の機能未同定 Small Protein, BpOF4 _01690 の機能解析

Functional analysis of a small protein, BpOF4 _01690 of unknown function from alkaliphilic *Bacillus pseudofirmus* OF4

○高橋 哲亮、伊藤 政弘（東洋大生命）
○TETSUAKI TAKAHASHI, MASAHIRO ITO (Toyo Univ.)

【研究背景・目的】

一般に好アルカリ性細菌は pH 10 付近の高アルカリ性環境下で良好な生育を示し、生育に Na^+ を要求する。通性好アルカリ性細菌 *Bacillus pseudofirmus* OF4 株（以後、OF4 株と記す）は、Mrp 型 Na^+/H^+ アンチポーターや Na^+/栄養素輸送系、Na チャネルなどによる細胞膜を隔てた細胞内外の Na^+サイクルによって、高アルカリ性環境に適応していると考えられている。一方で、OF4 株は酸化的リン酸化による ATP 合成にプロトン駆動力を利用している。そのため、OF4 株は高アルカリ性環境下においても効率よく ATP を合成する機構を兼ね備えていると考えられる。

これまでの好アルカリ性細菌の研究において、好アルカリ性細菌 *Bacillus halodurans* C-125 株（以後、C-125 株と記す）からアルカリ感受性変異株が取得された。この変異株のアルカリ感受性を相補する遺伝子産物として機能未同定な低分子量タンパク質である BH2819（62aa）が報告された。この BH2819 変異株は NADH oxidase 活性の低下が観察されたことから呼吸鎖に影響があると推測された。しかし、C-125 株では目的の遺伝子を破壊する手法が確立していないため、BH2819 の機能解析は未だに行われていない。2011 年に OF4 株の全ゲノム解析が完了した際に、BH2819 の相同タンパク質である BpOF4_01690（59aa）が報告された。BLAST サーチの結果、これらの相同タンパク質は、好アルカリ性 *Bacillus* 属細菌のみに存在することがわかった。本研究では遺伝子工学的手法が確立している OF4 株を用いて BpOF4_01690 の生理的機能解析を行うことを目的とした。

【方法・結果】

野生株から BpOF4_01690 遺伝子を欠損させた Δ01690 株を構築し、野生株と Δ01690 株の生育と各種呼吸鎖複合体の活性を比較した。その結果、炭素源をグルコースとるす複合培地では、Δ01690 株と野生株の生育は相同であったが、培地中の Na^+濃度を極端に低下させることで Δ01690 株の生育の悪化と各種呼吸鎖複合体の活性の低下が観察された。一方、炭素源をリンゴ酸とする複合培地では、Δ01690 株の生育は野生株よりも悪化し、各種呼吸鎖複合体の活性も低下した。そして、その差は培地中の Na^+濃度を低下させることでより顕著にみられた。さらに、ウエスタンプロット解析により BpOF4_01690 は培地中の Na^+濃度の低下に伴い発現量が増加することが観察された。これらのことから、BpOF4_01690 は環境中の Na^+濃度により発現が調節され、呼吸鎖複合体に関与するタンパク質の発現制御や機能調節に関与する低分子量タンパク質であることが推察された。

Alkaliphilic bacteria, Respiratory chain, Small protein

講演番号：4B21p02
講演日時、会場：3 月 29 日 14:11～ B 校舎 21 会場

Streptomyces 属放線菌が産生する菌体外ジアホラーゼの解析
Analysis of extracellular diaphorases produced by *Streptomyces* species
老沼 研一 [1]、進藤 大騎 [2]、高野 英晃 [2]、高谷 直樹 [1]、○上田 賢志 [2] ([1]筑波大生命環境、[2]日大生資科)
Oinuma Ken-Ichi[1], Daiki Shindo[2], Hideaki Takano[2], Naoki Takaya[1], ○Kenji Ueda[2] ([1]Univ. Tsukuba, [2]Nihon Univ.)

【目的】我々は、自然界における放線菌の生理・生態を理解することを目指し、特に未発見の生理現象の探索とその解明に取り組んでいる。前回、*Streptomyces coelicolor* A3(2)をBennett's maltose (BM)培地で培養後の上清中に腐植酸の脱色活性が認められること、また、これを腐植酸の脱色活性を指標に精製した結果、最終的にジヒドロリポアミドデヒドロゲナーゼ(PdhL)のホモログ(SCO2180)が得られたことを報告した。大腸菌で発現・精製した組換えSCO2180は、ジクロロフェノールインドフェノール（DCIP）やニトロブルーテトラゾリウム(NBT)に対し、NADH依存的還元活性（ジアホラーゼ活性）を示したことから、*S. coelicolor*による腐植酸の脱色には本酵素の酸化還元活性が関与しているものと推察した。更に、放線菌の自然分離株の多くがBM培養上清中にジアホラーゼを産生することを明らかとしたが、その機能や存在意義は未解明であった。そこで今回、放線菌の菌体外ジアホラーゼの役割に関する手掛かりを得るべく、特にジアホラーゼ活性に着目した*S. coelicolor*培養液からの酵素精製と機能解析、および発見した酵素の生理機能の検討を行った。

【方法と結果】BM培地で96時間培養後の*S. coelicolor*の培養上清には、0.071 μmol/min/mlのDCIP還元活性、および、0.0025 μmol/min/mlのNBT還元活性が認められた。NBTの還元活性を指標として本培養上清からの酵素精製を行った結果、硫安分画と4ステップのカラムクロマトグラフィーで、2 Lの培地から最終的に0.16 mgのSCO2180が精製された。一方、DCIPを指標として同様な精製を行ったところ、SCO2180のホモログであるSCO4919が、フルクトース二リン酸アルドラーゼ（SCO3649）とおよそ1:1の混合物として粗精製された (合計0.46 mg)。これら酵素の基質特異性を検討した結果、前者はリポアミドに比較的高い還元活性(2.31 μmol/min/mg)を示すのに対し、SCO4919は本基質にほとんど作用しないことが明らかとなった。これらの結果は、本菌が少なくとも2種類のジアホラーゼを菌体外に産生することを実証するとともに、SCO4919が一般的なリポアミドデヒドロゲナーゼとは異なる、未知の機能を有することを示唆している。一方、SCO2180は、遺伝子を破壊すると過酸化水素に対する耐性が顕著に低下することが判明し、本酵素が本菌の酸化ストレス耐性に直接もしくは間接的に関与していることが示された。現在、本酵素の生理的役割や作用機構の解明に向け、*in vivo*と*in vitro*の両面から更なる解析を行っている。

Streptomyces, diaphorase, humus

講演番号：4B21p03
講演日時、会場：3 月 29 日 14:22～ B 校舎 21 会場

Rhodococcus 属細菌の有機溶媒耐性における *groEL2* の影響
Effects of *groEL2* on the alkane tolerance of *Rhodococcus*
○岩淵 範之、瀧原 速仁、砂入 道夫（日大生資科応生科）
○Noriyuki Iwabuchi, Hayato Takihara, Michio Sunairi (Nihon Univ.)

【目的】

R. erythropolis PR4 株は、各種アルカン分解・耐性菌であり、極めて特殊な相互作用を示すことが知られている。すなわち、PR4 株は、培地/アルカン二相培養系において、アルカン相表面に吸着して存在する「吸着型」、あるいはアルカン相内に転移して存在する「転移型」というように、添加するアルカンの炭素数により細胞の局在性を変化させて生育できる能力を有している。これまでに、細胞のアルカン相内での生育には、シャペロニンの一種である GroEL2 の発現上昇が重要であることが明らかとなっている。

本研究では、GroEL2 の過剰発現によるアルカン耐性上昇が *Rhodococcus* 属細菌に一般的なものか否か、および、より毒性の高いアルカン存在下での良好な生育を示す菌株を取得するため、*groEL2* の導入が各種 *Rhodococcus* 属細菌の有機溶媒耐性に与える影響を検討した。

【方法、結果と考察】

各種 *Rhodococcus* 属細菌を炭素数の長さの異なる 4 種類のアルカンを添加した培養系で培養し、培地の濁度の上昇と細胞の局在性を検討した。その結果、供試した条件うち約 85%の株が転移型の生育を示したことから、多くの *Rhodococcus* 属細菌がアルカン相内に転移できる性質を有していることが示唆された。

続いて、*groEL2* を PCR により取得し、発現ベクターにクローニングし、形質転換(TF)した。得られた TF 体を二相培養系に供し、細胞の局在性を検討した。その結果、供試した株のいくつかで、親株が吸着型を示すアルカン相内に転移して生育する様子が確認された。また、生育できるアルカンの炭素鎖数の範囲を検討したところ、親株が生育できなかった短鎖のアルカンでも生育できるようになった。

特に *R. rhodochrous* ATCC12674 株に PR4 株由来の *groEL2* 遺伝子を導入した場合、アルカンの中でも毒性の高いもののひとつである *n*-オクタン添加条件において転移型で生育している様子が確認された。続いて GroEL2 の発現を検討したところ、親株に比べ有意に上昇していた。以上の結果から、*groEL2* 遺伝子は PR4 株だけでなく、他の株にも溶媒耐性の上昇をもたらすことが示唆され、また、本手法が *Rhodococcus* 属細菌の有機溶媒を上昇させる有用な手法であることが考えられた。

organic solvent tolerance, *groEL2*, *Rhodococcus*

講演番号：4B21p04
講演日時、会場：3 月 29 日 14:33～ B 校舎 21 会場

絶対嫌気性菌 *Clostridium* 属細菌の O_2 代謝機構に関する研究
Characterization of O_2 metabolic systems of the genus *Clostridium*
○工藤 貴靖、岡田 拓也、井山 朗典、大矢 浩士、岡田 沙季、新村 洋一、川崎 信治（東農大バイオ）
○Takayasu Kudoh, Takuya Okada, Akinori Iyama, Hiroshi Ohya, Saki Okada, Yoichi Niimura, Shinji Kawasaki (TUA bio)

【目的】
絶対嫌気性菌は O_2 存在下で生育が阻害されるが、生育阻害の分子機構は不明である。我々は、代表的な絶対嫌気性菌でアセトン・ブタノール発酵を行う *Clostridium acetobutylicum* において、O_2 と活性酸素を同時に、かつ高速に消去する酵素系として、NADH rubredoxinoxidoreductase（NROR）、rubredoxin（Rd）、A-type flavoprotein 2、desulfoferrodoxin、rubperoxin（a rubrerythrin homolog）の計５つのタンパク質が共役する複合酵素系を同定し、生育阻害の要因は O_2 毒性防御酵素の脆弱性によるものではないことを推定した。しかし、他の *Clostridium* 属細菌における本複合酵素系の分布と機能性に関しては不明な点が多い。本学会では、*Clostridium* 属内における本酵素系の分布と機能性に関して解析した結果を報告する。
【方法・結果】
C. acetobutylicum で同定された複合酵素系において、NROR 以外のタンパク質は属内に広く分布が確認された。一方、NADH と反応する起点酵素の NROR に高い相同性を示すタンパク質は他菌種に確認されなかった。そこで、他菌種では NROR を代替する酵素が機能すると推定されたため、Rd 還元活性を指標として NROR 代替酵素活性の検出を行った。次に、NROR 代替酵素の同定を目的として、*C. acetobutylicum* の近縁種である *C. beijerinckii* を供試菌として研究を行った。*C. beijerinckii* を嫌気ジャーファメンターを用いて嫌気条件下で培養し、対数増殖期に O_2 ストレスを付与した菌体から無細胞抽出液を調整し、Rd 還元活性を示す酵素の精製を行った。

Clostridium, rubredoxin, oxygen

講演番号：4B21p05
講演日時、会場：3 月 29 日 14:44～ B 校舎 21 会場

Pseudomonas aeruginosa における Psl 非依存的バイオフィルム形成
Psl-independent biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa*
○森 栄揮、石井 正治、新井 博之（東大院農生科・応生工）
○Hisaki MORI, Masaharu ISHII, Hiroyuki ARAI (Univ. of Tokyo)

Pseudomonas aeruginosa（緑膿菌）の PA2663 遺伝子(*ppyR*)は、一酸化窒素(NO)の解毒酵素であるフラボヘモグロビンの遺伝子(*fhp*)とオペロンを形成し、NO によって誘導発現する。ワシントン大学の *P. aeruginosa* PAO1 由来トランスポゾン変異株ライブラリーの PA2663 遺伝子変異株(UW 株)ではバイオフィルムが減少し、バイオフィルム形成に関わる *psl* 遺伝子群や、pyoverdin 生合成に関わる *pvd* 遺伝子群を含む多数の遺伝子の発現量が低下していることが報告されている。また、UW 株にプラスミドで PA2663 遺伝子を高発現することでバイオフィルム量が回復する。これらの結果から、PA2663 遺伝子産物は *psl* や *pvd* 遺伝子の転写活性化因子であり、PA2663 高発現によるバイオフィルム量の増加は、Psl の発現によるものと考えられていた。しかし、我々が作製した PAO1 由来 PA2663 欠損株ではバイオフィルム量は変わらず、*psl* や *pvd* の遺伝子発現を含めたトランスクリプトームに変化は認められなかった。そこで、UW 株のゲノム構造を解析したところ、*psl-pvd* を含む約 400kb の領域が欠失しており、これがバイオフィルムの減少と、多数の遺伝子発現量の低下の原因であることが分かった。

P. aeruginosa のバイオフィルムは、主に 3 種の菌体外多糖(Psl, Pel, alginate)で構成され、PAO1 株では Psl が主成分である。PAO1 株の Psl 生合成に関わる *pslAB* 遺伝子を破壊した株では、顕著なバイオフィルムの減少が見られたが、プラスミドで PA2663 を高発現したところ、UW 株と同様にバイオフィルムの増加が認められた。これらの結果から、PA2663 遺伝子産物は、Psl 非依存的なバイオフィルム形成に関わることが示唆された。*P. aeruginosa* において、NO はバイオフィルム離脱のシグナルである一方で、NO が生成する嫌気脱窒条件では、強固なバイオフィルムを形成することが知られている。NO により誘導発現する PA2663 は、強固なバイオフィルムの形成を促進することで、NO に対するストレス耐性に寄与していると考えられる。

Pseudomonas aeruginosa, biofilm, nitric oxide

講演番号：4B21p06
講演日時、会場：3 月 29 日 15:05～ B 校舎 21 会場

大腸菌の拡散チャネル OmpC は高塩濃度下で透過性が上昇する

High salt concentrations increase permeability through OmpC channel of *Escherichia coli*

○児島 征司[1,2]、Nikaido Hiroshi[2] ([1]東北大院生命、[2]カリフォルニア大学バークレー校)
○Seiji KOJIMA[1,2], Hiroshi Nikaido[2] ([1]Tohoku Univ., [2]University of California, Berkeley)

【背景】

グラム陰性細菌の外膜に存在する拡散チャネル (porin) は、親水性の低分子化合物を非特異的に拡散透過させる働きを持つ。細胞の生育に必要な栄養素から抗生物質等の薬剤まで、様々な物質が porin を通じて外膜を透過するため、porin の透過性は細胞の生存・生育に直接的な影響を及ぼす。大腸菌は透過性の異なる二つの主要 porin OmpF （高透過性）と OmpC (低透過性) を保持するが、両者の結晶構造に大きな差が見られないことから、透過性の違いが何に起因するかは未解明であった。

【方法・結果】

本研究では、OmpC が OmpF に比べてチャネル内壁に荷電アミノ酸残基をより多く保持する点に着目した。電荷の影響が小さくなる高塩濃度条件下で、 β-lactam 系抗生物質（以下 β-lactams ）やラクトースを基質として OmpF と OmpC の透過性を測定した結果、OmpC の透過性が OmpF と同等のレベルまで上昇することがわかった。 また、 OmpC を唯一の主要 porin とする細胞に対し、高塩濃度下で β-lactams の最少生育阻害濃度が低下したことから、OmpC の透過性の上昇が β-lactams に対する細胞の耐性低下として反映されることが確認された。チャネル内壁においてOmpF と OmpC で電荷の異なるアミノ酸残基は 10 残基存在するが、これら全てを入れ替えたところ、透過性及び塩濃度に対する反応性に関して OmpF と OmpC の性質が入れ替わることがわかった。以上により、OmpF と OmpC の透過性の違いはチャネル内壁の荷電アミノ酸残基に起因することがわかった。さらに、水溶液中の水分子ネットワーク構造を乱す性質を持つエタノールや尿素の影響を調べたところ、OmpC の透過性が高塩濃度下と同様に上昇した。このことから、チャネル内部の静電的特性とそれに伴って形成される水分子の配向性やネットワーク構造の強度がチャネルの透過性を決定づける主要因であると考えられた。

【考察】

高塩濃度条件下では OmpC の発現レベルが上昇し、逆に OmpF は抑制されることが知られている。従来はこの発現調節により外膜の透過性が下がると考えられていたが、OmpC の透過性が上昇するため外膜の正味の透過性はほぼ一定に保たれることが本研究でわかった。発現制御の重要性は、高塩濃度条件に適した porin を発現させることにあるのかも知れない。

porin, OmpC, outer membrane

講演番号：4B21p07
講演日時、会場：3 月 29 日 15:16～ B 校舎 21 会場

出芽酵母 *Δzds1* 株の Ca^{2+}感受性を抑圧する多コピーサプレッサーの寿命への影響

Effect of lifespan of the multicopy suppressors that suppress Ca^{2+} sensitivity of *Δzds1* strain in yeast

○上野 史記、小山 哲也、久米 一規、水沼 正樹（広島大院）
○Fuminori UENO, Tetsuya KOYAMA, Kazunori KUME, Masaki MIZUNUMA (Hiroshima Univ.)

寿命・老化研究は、酵母、線虫、ショウジョウバエ、マウスなどのモデル生物を用いて、世界中で活発に行われており、多くの寿命制御因子が同定されてきたが、その分子機構については不明な点も多い。

我々はこれまでに Ca^{2+}シグナルによる細胞周期制御機構を発見し、その全貌解明を目指して解析を行ってきた。これまでの解析から、*ZDS1* (G_2 期における細胞周期制御因子である *SWE1* を転写抑制する遺伝子)を破壊すると、Ca^{2+}感受性、Ca^{2+}依存的極性成長、および G_2 期遅延を示すことがわかった。Ca^{2+}シグナルによる細胞周期および形態制御に関与する新たな分子を探索するため、Δ*zds1* 株の示す Ca^{2+}感受性を抑圧する変異として *scz* (Suppressor of Ca^{2+}-induced abnormal morphology of *zds1*)が多数取得されており、順次解析を行っている。これら *SCZ* として取得された遺伝子の中には寿命関連遺伝子である *SIR3* が含まれていた。また、*SCZ* 遺伝子を変異、あるいは破壊した株では複製的寿命 (母細胞が一生で産生する娘細胞の数で定義)が短縮するなど、Ca^{2+}シグナル系は寿命にも機能的関連があることが予想された。

一方、このアプローチとは別に高発現により *Δzds1* 株の示す Ca^{2+}感受性を抑圧する遺伝子 (多コピーサプレッサー)を 17 種類取得した。そこで、これらの多コピーサプレッサー遺伝子の中にも寿命制御に関連する遺伝子が存在することが予想された。本研究では、新たな寿命制御因子の同定を目的として、これらの多コピーサプレッサー遺伝子に注目して寿命解析を行った。

まず、*Δzds1* 株の経時的寿命 (分裂しない状況下の細胞集団の生存時間)を測定すると、*Δzds1* 株は野生株と比較して短寿命であった。次に、*Δzds1* 株に 17 種類の多コピーサプレッサー遺伝子それぞれを高発現させた株を用いて経時的寿命を測定したところ、*Δzds1* 株で観察された短命を野生株程度に抑圧するものや、逆に、*Δzds1* 株よりもさらに短寿命となる株も存在した。この結果から、多コピーサプレッサーとして取得された遺伝子も寿命制御に正や負に作用する可能性が示唆された。*Δzds1* 株の短命を野生株程度に抑圧した多コピーサプレッサー遺伝子の中には、翻訳伸長因子 eEF3 やリボソームとの結合に関与し、翻訳に影響すると考えられている *STM1* 遺伝子が含まれていた。そこで現在、これら翻訳への影響と寿命延長メカニズムとの関連について解析中である。

Yeast, Lifespan, Calcium

講演番号：4B21p08
講演日時、会場：3 月 29 日 15:27～ B 校舎 21 会場

出芽酵母の *SSG1* 長寿変異株における寿命制御機構の解析
Analysis of the regulation of the lifespan in the long-lived mutant of yeast
○小川 貴史[1]、椿山 諒平[1]、金井 宗良[2]、藤井 力[2]、家藤 治幸[2]、宮川 都吉[1]、平田 大[1]、水沼 正樹[1] ([1]広島大院・先端研・分子生命、[2]酒類総合研究所)
○Takafumi Ogawa[1], Ryohei Tsubakiyama[1], Muneyoshi Kanai[2], Tsutomu Fujii[2], Haruyuki Iefuji[2], Tokichi Miyakawa[1], Dai Hirata[1], Masaki Mizunuma[1] ([1]Hiroshima Univ., [2]National Research Institute of Brewing)

老化・寿命は生命現象の最終的な表現型であり、寿命制御機構には未だ不明な点も多い。しかし近年、酵母をはじめとしたモデル生物の解析により、寿命には遺伝子レベルで高度に保存された制御メカニズムが存在することが明らかとなり、その機構は徐々に解明されつつある。

生体内におけるメチル化はメチル基供与体 *S*-アデノシルメチオニン(SAM)の利用によって行われる。SAM はメチオニン代謝経路において核酸、脂質、タンパク質などの各種メチル化反応に利用されるが、メチル基を供与した後は *S*-アデノシルホモシステイン(SAH)となる。SAH は SAM の反応を拮抗阻害物質として競合的に阻害するため、*S*-アデノシルホモシステイン水解酵素により速やかに分解される。

出芽酵母の *S*-アデノシルホモシステイン水解酵素(Sah1)に変異を持つ *sah1-1* 変異株は、許容温度における増殖遅延と顕著な短命を示した。新規寿命制御因子の取得を目的として、*sah1-1* 変異株の緩慢な増殖を抑圧する変異株のスクリーニングを実施した。増殖が良好となった変異株を取得し、寿命を測定したところ、野生株と比較して顕著に寿命が延長し、長寿変異株の取得に成功した。我々はこの株を *SSG1* (Spontaneous Suppressor of the Growth-delay of the *sah1-1*) 変異株と命名した。

SSG1 変異の原因遺伝子は、機能未知の遺伝子 *ERC1* であった。*SSG1* 変異は優性変異で、興味深いことに、SAM および SAH の高蓄積が観察された。そこで SAM/SAH の濃度調節が寿命制御に関与すると予想して、*SSG1* 変異株の長寿機構の解析を行った。

SSG1 変異による遺伝子発現の変化を調べるため、遺伝子マイクロアレイ法を実施した。その結果、*SSG1* 変異株ではメチオニン代謝およびグルコース代謝関連遺伝子の高発現が観察された。*SSG1* 変異株では SAM/SAH を蓄積するため、メチオニン代謝に関与する遺伝子の高発現は予想通りであった。一方、グルコース代謝関連遺伝子について着目すると、ヘキソキナーゼ *HXK1*、高親和性グルコーストランスポーター*HXT4* など細胞内グルコース欠乏時に発現する遺伝子が多数含まれていた。これにより *SSG1* 変異株は細胞内グルコースの枯渇が予想され、カロリー制限模倣となっていることが予想された。

現在、*SSG1* 変異株の寿命延長における SAM 合成の役割及びカロリー制限との機能的関連の解析を行っている。

yeast, lifespan, *S*-adenosylmethionine

講演番号：4B21p09
講演日時、会場：3 月 29 日 15:38～ B 校舎 21 会場

出芽酵母の寿命制御に関わるメチル基転移酵素の探索
Screening of methyltransferase gene(s) related to lifespan extension in budding yeast
○橋本 沙也加、小川 貴史、久米 一規、水沼 正樹（広島大院・先端研・分子生命）
○SAYAKA HASHIMOTO, TAKAFUMI OGAWA, KAZUNORI KUME, MASAKI MIZUNUMA (Hiroshima Univ.)

老化、寿命の研究において、最もシンプルなモデル生物が出芽酵母である。近年、出芽酵母などのモデル生物を用いた寿命研究により、寿命制御に関与する遺伝子やその分子メカニズムが明らかにされ、高等生物にまで高く保存されることが分かってきた。しかし、寿命制御機構は不明な点も多い。

メチオニン代謝経路の *S*-アデノシルメチオニン(SAM)は、生体内の主要なメチル基供与体であり、タンパク質、脂質、核酸などのメチル化反応を行う。一方、*S*-アデノシルホモシステイン(SAH)は SAM のメチル化反応によって生じる。SAH は、SAM の構造アナログであり、SAH が蓄積されると、SAM のメチル化反応が阻害されるため、速やかに *S*-アデノシルホモシステイン水解酵素(Sah1)により加水分解される必要がある。我々の研究室では、*sah1-1* 変異株を取得し、その表現型を調べた結果、*sah1-1* 変異株は増殖遅延を示し、短寿命となった。そこで長寿遺伝子の取得を目的として、*sah1-1* 変異株の増殖遅延を抑圧する変異株の取得を試みた。その結果、優性変異株 *SSG1*(**S**pontaneous **S**uppressor **G**rowth-delay of the *sah1-1*) が取得され、実際 *SSG1* 変異株は、野生株よりも長寿命となった。さらに *SSG1* 変異株は、SAM を高蓄積した。このことから、細胞増殖や寿命制御にはメチル化反応が重要な役割を果たすことが予想された。しかし、メチル化反応が寿命に与える影響については、ほとんど明らかにされてない。本研究では、*SSG1* が関わる細胞増殖や寿命制御と機能関連するメチル基転移酵素を探索し、その分子機構について解明することを目的とした。

SSG1 と機能関連するメチル基転移酵素を探索するため、*sah1-1 SSG1* 変異株を利用して、この二重変異株とメチル基転移酵素との三重変異株を構築し、その増殖が *sah1-1* 程度にまで緩慢となるものをスクリーニングすることにした。出芽酵母メチル基転移酵素は 75 遺伝子存在している。現在、これら全ての破壊株の構築を実施中である。

既に取得した 42 株のうち 5 株についてそれらの三重変異株の増殖を調べた結果、*sah1-1* 程度に増殖遅延した株が 2 株(膜合成とアルギニンメチル基転移酵素がそれぞれ一つ)見つかった。それらの遺伝子は、*SSG1* 変異による増殖制御や寿命に関与している可能性があると示唆された。そこで、経時的寿命を測定した。その結果、増殖が遅延した 2 株の三重破壊株は、共に短寿命を示した。現在、残りの三重破壊株の構築を行い、取得した三重変異株について順次解析を進めている。

Saccharomyces cerevisiae, lifespan, methyltransferase

講演番号：4B21p10
講演日時、会場：3 月 29 日 15:49～ B 校舎 21 会場

出芽酵母の高浸透圧シグナルによる寿命制御機構の解析
Analysis of the regulation of lifespan in response to high osmotic stress
○米北 久美子、小山 哲也、久米 一規、水沼 正樹（広島大院・先端研・分子生命）
○Kumiko YONEKITA, Tetsuya KOYAMA, Kazunori KUME, Masaki MIZUNUMA (Hiroshima Univ. Grad. Sch. of AdSM)

老化・寿命研究において、様々なモデル生物を用いて寿命制御のメカニズムの研究が行われている。出芽酵母は最もシンプルなモデル生物であり、カロリー制限に代表される寿命制御機構は生物間で高く保存されている。そのため出芽酵母から得た知見がヒトの健康寿命の延長の手がかりになることが期待されている。

これまでに我々は、Ca^{2+}シグナルの生理的機能を明らかにするため、*Δhog1* 株が示す Ca^{2+}感受性を抑圧する変異株を取得し、その抑圧変異を *sgh* (**s**uppressor of Ca^{2+}-induced **g**rowth arrest of ***h**og1)*と命名した。*sgh* は 6 つの遺伝子座に分類され、*sgh3* は *tup1*、*sgh5* は *sko1*、*sgh6* は *cyc8* とそれぞれ同一であった。興味深いことに、*sgh3~6* 変異は *Δhog1* 株の示す浸透圧感受性も抑圧した。この事から、*SGH3~6* が高浸透圧のストレス応答に関与することが示唆された。またこれまでに、高浸透圧存在下では複製的寿命 (新生細胞の分裂回数によって定義される寿命)が延長することが報告されている。そのメカニズムは、高浸透圧による Hog1 活性化がグリセロールの生合成を促進し、それに伴う NAD の増加と Sir2 の活性化が重要であると報告された。またこれは、Sir2 の活性化による寿命延長という点において、カロリー制限の効果と類似すると示唆されている。しかし、経時的寿命 (定常期以降の細胞の生存期間)と高浸透圧シグナルとの関係は不明である。そこで、本研究では *sgh3~6* 変異株を用いて、浸透圧シグナルによる寿命制御の分子機構について解明することを目的とした。

まず、ソルビトールを添加することにより高浸透圧条件下における野生株の経時的寿命を調べた。その結果、高浸透圧条件下において、経時的寿命が 2 倍以上延長することがわかった。またこれまでの解析から、*Δhog1 tup1*、*Δhog1 sko1* および *Δhog1 cyc8* 二重変異株において、通常は高浸透圧シグナルによって誘導される遺伝子が、シグナルがない場合においても恒常的に発現することが明らかとなっている。そこで、浸透圧シグナル特異的な遺伝子が発現している *Δhog1 tup1*、*Δhog1 sko1* および *Δhog1 cyc8* 二重変異株を用いて、高浸透圧を加えない条件における経時的寿命を解析した。その結果、*Δhog1* 株は野生株と比べ短寿命となったが、二重変異株は野生株よりも長寿命となった。次にこれらの二重破壊株で経時的寿命を解析した。その結果、*Δhog1Δsko1* 二重破壊株は変異株同様、寿命延長が観察されたが、*Δhog1 Δtup1* 二重破壊株、*Δhog1 Δcyc8* 二重破壊株では野生株とほぼ同程度となった。これらの結果から、高浸透圧シグナル応答が経時的寿命を延長していることが示唆され、現在その詳細について解析中である。

Yeast, Lifespan, Osmotic stress

講演番号：4B21p11
講演日時、会場：3 月 29 日 16:10～ B 校舎 21 会場

出芽酵母における染色体からのセントロメア DNA の切り出し誘導時に出現する生存細胞の解析
Analysis for surviving cells appeared with induction of excision of centromeric DNA from a chromosome in *Saccharomyces cerevisiae*

○松崎 浩明、宮本 昭弘、柳本 敏彰、秦野 琢之（福山大生命工）
○ Hiroaki MATSUZAKI, Akihiro MIYAMOTO, Toshiaki YANAMOTO, Takushi HATANO (Fukuyama Univ.)

遺伝子組換え生物が野外で拡散すると、環境へ及ぼす影響が危惧される。我々は、条件致死性質や不稔性質の付与によって遺伝子組換え生物の野外での拡散を防ぐことを目指している。それらの性質の付与には、部位特異的組換えを利用して特定の条件下や時期に染色体からセントロメアDNAを切り出し、細胞死を誘導する方法が考えられる。そこで、酵母*S. cerevisiae*をモデル生物としてpSR1プラスミドの部位特異的組換えを利用してセントロメアDNAを切り出すことで細胞死を誘導することを検討している。セントロメアDNAの切り出しは、第IV番染色体のセントロメアDNAの両側に組換え標的部位（RS）を同じ方向に挿入し、ガラクトースによりレコンビナーゼの発現を誘導して行う。一倍体では第IV番染色体1本から切り出すことで、また二倍体では第IV番相同染色体の両方から切り出すことで、生存率が大きく低下し、細胞死を誘導することができる。しかし、プレート上で僅かな数のコロニーが出現するので、生存率をさらに低下させるために生存細胞が出現する原因を解析した。一倍体の生存細胞（51クローン）のセントロメアDNA近傍のPCR解析やRS領域のシークエンス解析から、生存細胞が出現した原因は、主に染色体からRSが1個欠失し、切り出しが起こらなかったためと示唆された。RSの欠失は2個のTCGA配列を介して起こっている可能性が考えられるので、片方の配列をTA 配列に置換した結果、生存率をさらに低下させることができた。この時、RSの欠失はある程度抑制されていた。また、生存細胞の中には、セントロメアDNAが切り出された細胞が低い割合で出現しており、生存原因について検討している。

cell death, centromere, surviving cell

講演番号：4B21p12
講演日時、会場：3 月 29 日 16:21～ B 校舎 21 会場

分裂酵母の細胞溶解を引き起こす外的要因
External factors that induce cell lysis in fission yeast
○櫛間 満咲、西野 耕平、松尾 安浩、川向 誠（島根大院生物資源）
○Misaki KUSHIMA, Kouhei NISHINO, Yasuhiro MATSUO, Makoto KAWAMUKAI (Shimane Univ.)

酵母を培養する際に用いられる YPD 培地は Yeast Extract とポリペプトン、グルコースを加えた培地で、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の培養によく使用される。しかしながら、分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* の培養では生育に阻害的な効果を与えるため、あまり使用されていない。特に、分裂酵母の *ura4* 遺伝子破壊株を YPD 培地で生育させると細胞がはじけるように破裂して、劇的な細胞溶解を引き起こす。当研究室では、この細胞溶解の詳細な仕組みを解析している。YPD 培地中の成分が細胞溶解を促進し、UMP の前駆体である OMP が蓄積することが細胞溶解を引き起こしていると考えている。本研究では培地中に含まれる *Δura4* 株の細胞溶解を促進する成分の同定を目的としている。

YPD 培地に含まれるポリペプトンは牛乳カゼインタンパク質をペプシンで酵素処理することで得られる物質である。アミノ酸や低分子量のペプチドが多く含まれるため、窒素源として培地中に添加される。そこでポリペプトンの代わりにアミノ酸を多く含むカザミノ酸や低分子量のペプチドを豊富に含むハイニュート AM を培地に添加し、細胞溶解の促進度を調べた。しかしながらいずれの培地を用いた培地においても YPD 培地ほどの細胞溶解の促進は見られなかった。

また Yeast Extract とグルコースから成る YE 培地も Yeast Extract を製造しているメーカーによって細胞溶解の程度が異なることを発見した。そこでアミノ酸やペプチド以外の培地中に含まれるイオンや核酸などに着目し、どのような成分が細胞溶解の促進または抑圧に関与しているかを調べた。すると各 Yeast Extract でウラシル含量が異なることがわかった。

そこで、YPD 培地中のウラシル含量を経時的に測定した。すると、培地中のウラシルの枯渇のタイミングと細胞溶解のタイミングがほぼ一致していることがわかった。次に YE 培地では Yeast Extract の種類により細胞溶解の程度が異なることから、合成培地である PM 培地を用いた実験を行なった。*Δura4* 株は PM 培地では生育しない為、液体培地中で酵母を観察すると YPD 培地で培養した場合と比較し短時間かつ顕著な細胞溶解の誘導が見られた。以上の結果から、培地中の成分に含まれているウラシル含量が高い時は細胞溶解が観察されず、枯渇すると細胞溶解が誘導されることがわかった。しかしながら、他のウラシル要求性株(*Δura5* 株)では、このような現象は観察されず、*Δura4* 株に特異的に観察されることから、*Δura4* 株で蓄積する OMP が細胞壁合成を何らかの形で、阻害しているのではないかと考えている。

cell lysis, polypeptone, uracil

講演番号：4B21p13
講演日時、会場：3 月 29 日 16:32～ B 校舎 21 会場

分裂酵母のアミノ酸取り込みにおける適応現象を制御する内因性物質の同定

Identification of an endogenous compound that regulates the adaptive uptake of amino acids in fission yeast

○孫 暁穎[1,2]、八代田 陽子[1]、植木 雅志[3]、廣田 洋[3]、高橋 秀和[4]、長田 裕之[3]、浜本 牧子[2]、吉田 稔[1] ([1]理研・化学遺伝学、[2]明治大院・農、[3]理研・抗生物質、[4]山口大院・医)
○Xiaoying Sun[1,2], Yoko Yashiroda[1], Masashi Ueki[3], Hiroshi Hirota[3], Hidekazu Takahashi[4], Hiroyuki Osada[3], Makiko Hamamoto[2], Minoru Yoshida[1] ([1]Chem. Genet. Lab., RIKEN ASI, [2]Dept. of Life Sci., Grad. Sch. of Agri., Meiji Univ., [3]Antibiotics Laboratory, RIKEN ASI, [4]Medical Dept., Yamaguchi Univ.)

すべての生物は様々な環境変化を認識し、その環境変化に適応することで生存している。単細胞真核生物である酵母には、アミノ酸のような栄養源の取り込みを制御することにより、周りの環境変化に迅速に適応する機構が備わっている。ただちに利用可能な良好な窒素栄養素であるアンモニアやグルタミン酸が細胞外に存在するときは、それらを優先して取り込むため透過酵素によるアミノ酸の取り込みが阻害される。したがって、アミノ酸を合成できない変異株は高濃度のアンモニアやグルタミン酸を含む培地では増殖できない。分岐鎖アミノ酸（Branched-chain amino acid; BCAA）アミノ基転移酵素は BCAA（ロイシン、イソロイシン、バリン）を合成する唯一の経路の最終段階の反応を触媒する。我々は、分裂酵母の BCAA アミノ基転移酵素をコードする *eca39*+遺伝子の破壊株（*eca39Δ* 株）が、グルタミン酸を含む培地においては、BCAA が含まれていても取り込みが阻害され、生育不能となることを示した。ところが同じ培養条件であっても野生株の近傍では *eca39Δ* 株の生育が可能となる適応現象を見出した[1)]。この現象は、野生株から細胞外へ分泌された何らかの物質により、*eca39Δ* 株におけるアミノ酸の取り込み能が回復することで引き起こされたと考えられる。実際に、野生株の培養液上清を寒天培地に添加することにより、*eca39Δ* 株の生育が確認された。そこで、我々はこの野生株から分泌される内因性物質の単離・同定を試みた。まず、野生株の培養液上清の分画実験を行った。その結果、酢酸エチル、ブタノール及びヘキサン層に活性があったため、この因子は脂溶性であることが分かった。また、pH を 3、7、10 に調整し、分画した結果、pH 3 において、より高い活性を示したので、この因子は酸性物質であることが示唆された。次に、20 L の培養上清を酢酸エチルで抽出し、シリカゲルカラムクロマトグラフィーおよび HPLC で分画・精製後、各種 NMR 及び LC/MS で解析した結果、その構造は 10-hydroxy-8-octadecenoic acid ($C_{18}H_{34}O_3$) であると決定した。現在、この物質によって誘導される適応生育のメカニズムの解析を行っている。

1) Takahashi, H. *et al.*, 2012, *J. Biol. Chem.,* 287: 38158

adaptive growth, amino acid uptake, fission yeast

講演番号：4B21p14
講演日時、会場：3 月 29 日 16:43～ B 校舎 21 会場

麹菌 *Aspergillus oryzae* 実用株の細胞融合能および不和合性の解析
Analysis of cell fusion and incompatibility in *Aspergillus oryzae* industrial strains
○岡部 知弥[1]、塚崎 和佳子[1]、金 鋒杰[1]、岩下 和裕[2]、藤井 郁雄[3]、丸山 潤一[1]、北本 勝ひこ[1] ([1]東大院・農生科・応生工、[2]酒総研、[3]阪府大院・理)
○Tomoya OKABE[1], Wakako TSUKASAKI[1], Feng Jie JIN[1], Kazuhiro IWASHITA[2], Ikuo FUJII[3], Jun-ichi MARUYAMA[1], Katsuhiko KITAMOTO[1] ([1]Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo, [2]NRIB, [3]Osaka Pref. Univ.)

【目的】糸状菌は通常の生育条件でも細胞融合を行うことができ、コロニー形成において菌糸どうしのネットワークを形成する。また、細胞融合は有性生殖および疑似有性生殖での第一段階であり、交配育種を行ううえで重要な過程である。我々は最近、麹菌 *Aspergillus oryzae* において、BiFC (bimolecular fluorescent complementation)法を利用して細胞融合を可視化し直接観察する方法を確立した。BiFC 法による解析には、ヘテロダイマーとして結合するように設計されたタンパク質 LZA および LZB[1)]、および蛍光タンパク質 EGFP を使用した。*A. oryzae* の野生株 RIB40 に由来する 2 株において、EGFP の N 末側部分と LZA を融合させた nEGFP-LZA、EGFP の C 末側部分と LZB を融合させた cEGFP-LZB をそれぞれ発現させ、両株を混合して培養した。その結果、*A. oryzae* において融合した細胞を特異的に可視化することに成功した[2)]。しかし、*A. oryzae* の実用株について、細胞融合能力に関する解析はほとんど行われていない。また、他の糸状菌では特定の株の組み合わせで融合すると細胞死が起こる不和合性という現象が知られているが、*A. oryzae* ではこれまでに同様の報告はなされていない。本研究では、BiFC 法を利用して *A. oryzae* の実用株の細胞融合能力および不和合性に関して解析を行った。
【方法と結果】*A. oryzae* 野生株 RIB40、清酒用実用株 RIB128、吟醸酒用実用株 RIBOIS01、醤油用実用株 RIB915 を実験に用いた。これらの株の *niaD* 破壊株もしくは変異株を取得して、nEGFP-LZA または cEGFP-LZB を発現させるプラスミドを導入した。得られた株を混合して培養し、EGFP 蛍光の有無により細胞融合能力の評価を行った。その結果、RIB40 および RIB128 は細胞融合能力が高く、RIBOIS01 および RIB915 は低いことがわかった。しかし、RIB40 同士や RIB128 同士では細胞融合が起こるものの、RIB40 と RIB128 の間では細胞融合が起こらないことも明らかになった。このことから、RIB40 と RIB128 は互いに不和合性である可能性が考えられた。

RIB40 と RIB128 が不和合性であるかを検討するため、細胞質をそれぞれ EGFP と mDsRed で蛍光標識するプラスミドを導入した。得られた株をプロトプラスト化させてから混合し、融合させて培養した。その結果、RIB40 同士や RIB128 同士の混合培養では EGFP と mDsRed の両方の蛍光を発する菌糸が確認されたが、RIB40 と RIB128 とを混合した場合はそのような菌糸が観察されなかった。現在、RIB40 と RIB128 の融合体において細胞死が起こっているかどうかを解析している。

1) Kojima *et al.* (2011) *J. Biosci. Bioeng.* 111:397-401.
2) 岡部知弥ら、2014 年度日本農芸化学会大会講演要旨 4A10a15

Aspergillus oryzae, cell fusion, incompatibility

講演番号：4B21p15
講演日時、会場：3 月 29 日 16:54～ B 校舎 21 会場

麹菌 *Aspergillus oryzae* における有性生殖関連遺伝子の高発現による子嚢胞子形成の促進

Promoted ascospore formation by overexpressing sexual reproduction-related genes in *Aspergillus oryzae*

○田中 勇気、金 鋒杰、丸山 潤一、北本 勝ひこ（東大院・農生科・応生工）
○Yuuki TANAKA, Feng Jie JIN, Jun-ichi MARUYAMA, Katsuhiko KITAMOTO（Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo）

【目的】
麹菌 *Aspergillus oryzae* において有性世代は発見されていないが、株によって異なる接合型遺伝子 *MAT1-1* あるいは *MAT1-2* をもつことから、ヘテロタリックな有性生殖を行う可能性が示唆されている[1)]。*A. oryzae* で有性生殖が可能になれば、優良な形質をもつ菌株の育種に役立つと期待される。近縁の糸状菌での研究から、*A. oryzae* は菌核内に子嚢果、子嚢、子嚢胞子を形成することにより、有性生殖を行うと予想されている。我々の以前の研究で、菌核形成を抑制する転写因子 EcdR の欠損により菌核形成を促進させたうえで[2)]、酵母の有性生殖の主要制御因子 Ime2p と相同性をもつ AoIme2 の高発現により、菌核内の子嚢果の形成を促進させ、子嚢および子嚢胞子様の構造を観察することに成功した[3)]。しかし、子嚢胞子様の構造は小さいものが多く、有性生殖が不完全であることが示唆された。今回は、他の有性生殖関連遺伝子を高発現することにより、*A. oryzae* での子嚢胞子形成の促進効果を検討した。

【方法と結果】
Aspergillus nidulans で有性生殖を促進する主要因子のなかから LaeA と NsdD を選び、*A. oryzae* の相同タンパク質をコードする遺伝子(*laeA*, *AonsdD*)について、*ecdR* 遺伝子が破壊されている条件で高発現する株を作製した。*laeA*、*AonsdD* 高発現株と、以前作製した *Aoime2* 高発現株において、異なる接合型どうしで対峙培養を行った。コロニーの境界線で菌糸融合を行い形成された菌核について培養を続けてその内部構造を観察したところ、*ecdR* 破壊株における *Aoime2*、*laeA* および *AonsdD* 遺伝子の高発現により、菌核内の子嚢果の形成効率が上昇することがわかった。さらに、子嚢胞子様の構造については、*AonsdD* 遺伝子高発現株において、近縁の糸状菌の子嚢胞子と同様の大きさのものが観察されるようになった。現在、子嚢胞子様構造をマイクロマニピュレーターにより単離し、生存率を調べるとともに、導入した遺伝子マーカーの掛け合わせを調べることにより、有性生殖が行われているかどうかの解析を行っている。

1) Wada *et al.* (2011) *Appl. Environ. Microbiol.* 78; 2819-2829.
2) 田中勇気ら、2013 年日本農芸化学会大会講演要旨 4B13a04
3) 田中勇気ら、2014 年日本農芸化学会大会講演要旨 4A10a13

Aspergillus oryzae, sexual reproduction, ascospore

講演番号：4C31a01
講演日時、会場：3 月 29 日 09:00～ C 校舎 31 会場

パン酵母とトルラ酵母を用いた微生物燃料電池の検討

Study on Microbial Fuel Cell using *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida utilis*

○東 雅之、後山 元洋、立花 太郎（大阪市立大学工）
○Masayuki Azuma, Motohiro Ushiroyama, Taro Tachibana (Osaka City Univ.)

近年、種々の電源の開発を目指してバイオ燃料電池の検討が積極的に進められている。例えば、廃水中の有機物を燃料とした廃水処理施設での発電、携帯用機器や生体埋め込み型機器の電源などへの応用が検討されている。バイオ燃料電池では、有機物が持つ化学エネルギーを酵素や微生物によって電気エネルギーに変換する。その性能は、触媒を含めた電池構成要素の進歩とともに上昇している。とくに、酵素を触媒に用いたバイオ燃料電池では、携帯用機器の電源に応用できるレベルにまでその出力が向上している。一方、酵素型に比べ微生物型はそのレベルが低く、さらなる改善が求められている。我々は、安価であることや有機物を完全に酸化できる能力を有することに着目し、微生物型燃料電池（Microbial fuel cell）に注目している。これまでに、電池構成要素や微生物の代謝について検討し、電池性能の向上を目指してきた。とくに、木質系バイオマスから得られるグルコースやキシロースを燃料に、出力および消費有機物量あたりの出力の上昇を検討してきた。パン酵母（Saccharomyces cerevisiae）を触媒に用いて、緩衝液などの電池構成要素の最適化を進め、微生物型としては比較的高い出力を得た（参考文献)。その出力は、数十 mL スケールの電池で小型モーターを駆動できるレベルにある。また、パン酵母のグルコース代謝と出力の関係について、遺伝子破壊株や代謝阻害剤などを用いて検討し、エタノール発酵を抑制することで出力が向上する結果を報告してきた。

ここでは、継続してパン酵母を用いて検討してきた代謝と出力の関係の解析結果について報告する。また、パン酵母と同様に食用酵母として知られるトルラ酵母 Candida utilis は、高い呼吸活性、エタノールを再同化する能力、旺盛な増殖能力を持つことが知られており、電池用触媒に適した微生物であることが期待された。そこで、パン酵母での最適条件を参考に、C. utilis の触媒としての能力を評価した。結果として、パン酵母と同等かそれ以上の高い出力が得られ、電池用触媒として高い能力を有していた。さらに、C. utilis を用いて電池構成要素の最適化を進めており、それらについても報告する予定である。

参考： Biochemical Engineering Journal, 83,90-96(2014).

Microbial fuel cell, Saccharomyces cerevisiae, Candida utilis

講演番号：4C31a02
講演日時、会場：3 月 29 日 09:11～ C 校舎 31 会場

蓄電性ナノ物質を生成する嫌気性複合微生物系の解析

Anaerobic complex culture producing rechargeable nanomaterial

○久保田 博子[1]、鈴木 渓[2]、餅原 弘樹[1]、細川 拓也[1]、千葉 悠介[1]、由井 嵐士[3]、田代 陽介[1]、二又 裕之[1] ([1]静大院工、[2]静大創造院、[3]静大工)
○ Hiroko KUBOTA[1], Kei SUZUKI[2], Hiroki MOCHIHARA[1], Takuya HOSOKAWA[1], Yusuke CHIBA[1], Arashi YUI[3], Yosuke TASHIRO[1], Hiroyuki FUTAMATA[1] ([1]Graduate school of Eng. Shizuoka Univ., [2]Graduate school of Sci. Tech. Shizuoka Univ., [3]Department of Eng. Shizuoka Univ.)

微生物燃料電池（MFC）は有機性廃棄物のエネルギーを、微生物を介して電気に直接変換する発電装置である。そのため、安全かつ低コストのエネルギー創出技術として着目され、電流密度の更なる向上が期待されている。これまで本研究室において、比較的高い電流密度が確認された MFC 由来の複合微生物系が、蓄電能を有するナノ物質（BNM）を生成することを見出した。そこで本研究では、本物質の電気化学的特性ならびに本複合微生物系の解析を目的とした。

複合微生物系由来の BNM は、培養初期に白色沈殿を生じた後に黒色沈殿を生成することが顕微鏡観察によって確認された。色の変化に応じて蓄放電特性が向上し黒色沈殿を生成以降、蓄電容量約 26.4 μAh mg^{-1}で安定した。BNM 生成過程において、培地中の SO_4^{2-}の一部は H_2S へ、Fe^{3+}は BNM 中に Fe^{2+}として存在していた。BNM 生成微生物を特定するため 6-well plate 法を用いて嫌気的に分離した。16S rRNA 遺伝子を用いた系統解析の結果、*Desulfovibrio* 属に近縁の黒色物質を生成する分離株(HB 株と称す)、および *Trichococcus* 属に近縁の白色物質を生成する分離株（KW 株と称す）の取得に成功した。これらの生成する BNM をエネルギー分散型 X 線解析したところ、HB 株および KW 株由来の BNM の主成分はそれぞれ Fe と S および P と Ti であった。充放電試験の結果、HB 株の蓄電容量は KW 株および複合微生物系それぞれの約 16 倍および約 5.3 倍であった。放電容量はそれぞれ約 41 倍および約 7.3 倍であった。Cyclic Voltammetry 解析を行ったところ、HB 株と KW 株は異なった酸化還元波を有し、充放電に寄与しているのは異なる物質であることが示された。BNM 生成に伴う配置中の Fe および S の挙動を解析した結果、HB 株では SO_4^{2-}と Fe^{3+}の還元が生じたのに対し、KW 株ではそれらの還元が生じなかった。そのため、複合微生物系で観察された両イオンの挙動は HB 株に拠ることが示唆された。複合微生物系で生じたバイオミネラリゼーションが主としてこれらの 2 種類の微生物で生じたことを確認するため、両菌株混合培養系を構築し、SO_4^{2-}と Fe^{3+}の挙動、生成した BNM の充放電特性を解析したところ、ほぼ複合微生物系の BNM と同様の傾向を示した。

以上の結果から、複合微生物系由来の BNM は異なる微生物由来の BNM の混合物であり、微生物によって BNM の物質科学的および電気化学的特性は著しく異なることが示された。

Microbial Fuel Cells, Biomineralization, Sulfur reducing bacteria

講演番号：4C31a03
講演日時、会場：3 月 29 日 09:22～ C 校舎 31 会場

微生物により生成される蓄電性ナノ物質の物質科学的解析

Material scientific characterization of chargeable nanomaterials produced by microorganisms

○由井 嵐士[1]、久保田 博子[2]、餅原 弘樹[2]、鈴木 渓[3]、細川 拓也[2]、田代 陽介[2]、小暮 敏博[4]、二又 裕之[2] ([1]静大・工、[2]静大院・工、[3]静大院・自然科学系教育部、[4]東大院・理学系研究所)
○Arashi YUI[1], Hiroko KUBOTA[2], Hiroki MOCHIHARA[2], Kei SUZUKI[3], Takuya HOSOKAWA[2], Yosuke TASHIRO[2], Toshihiro KOGURE[4], Hiroyuki HUTAMATA[2] ([1]Shizuoka Univ., [2]Graduate school of Eng., Shizuoka Univ., [3]Graduate school of Sci., Tech., Shizuoka Univ., [4]Tokyo Univ.)

エネルギー創成に係る複数の技術を有することは、社会基盤の安定化にとって必要不可欠である。これまで本研究室では、乳酸を電子供与体とし水田土壌を接種源とした微生物燃料電池（MFC）を運転してきた。電極付着由来の微生物群を培養したところ、黒色の沈殿物質を生成した。この複合微生物系由来の黒色物質を MFC に添加したところ、培養初期の電流密度が約 80 倍向上し、また蓄電能を有することも確認された。そこで本研究では、本物質の物質科学的特性を明らかにすることを目的とした。

まず、複合微生物系由来の黒色物質の主成分を調べるため、エネルギー分散型 X 線解析（EDS）、X 線回折法（XRD）および走査電子顕微鏡（SEM）観察を実施した。その結果、本物質はリンやチタンを主成分とする非晶質の板状物質であることが示された。複合微生物系から嫌気的に分離された HK2 株および HK3 株を培養したところ、それぞれ黒色および白色の沈殿物質を生成した。同様に物質科学的解析を実施したところ、HK3 株由来の白色物質は、おおよそ複合微生物系由来の物質と同じ特性を示した。しかし、蓄電能はほとんど認められなかった。一方、HK2 株由来の黒色物質は、複合微生物系由来の物質よりも高い蓄電能を有していた。XRD および EDS 解析結果から、本物質の結晶が示した特徴的なピークパターン、および Fe と S をほぼ 1:1 の比率で主成分としていることから、Mackinawite であることが示唆された。また、XRD 解析から結晶子サイズが数 nm と算出された。さらに高分解能透過電子顕微鏡および制限視野電子回折法を用いて解析した結果、間隔 5Åの格子縞が観察され、また単結晶回折像も Mackinawite と同一であった。これらの結果から、HK2 株由来の黒色物質は正方晶の Mackinawite であることが示された。複合微生物系由来の黒色物質を光学顕微鏡で観察した結果、白色物質と黒色物質とが混在していた。そのため、それらの存在比率に応じて蓄電能が異なったものと推察された。現在、HK2 株由来の蓄電性ナノ物質を時系列的に解析し、物質構造と蓄電能との相関性について解析を進めている。

nanomaterial, biomineral, MFC

講演番号：4C31a04
講演日時、会場：3 月 29 日 09:33～ C 校舎 31 会場

偏性嫌気性細菌 *Megasphaera elsdenii* の水素発酵機構に関する研究

Study on hydrogen fermentation mechanism of anaerobic bacterium *Megasphaera elsdenii*

○村山 蘭、大西 章博、藤本 尚志、鈴木 昌治（東農大院・農）
○ ran MURAYAMA, akihiro OHNISHI, naoshi FUJIMOTO, masaharu SUZUKI (Tokyo Univ.Agric.)

【背景及び目的】

水素は次世代のエネルギー媒体として期待されており、その安価な生産方法として嫌気性細菌を利用した水素発酵法が注目されている。発酵の主役を担う微生物としては、糖類から高効率で水素を生産する *Clostridium* 属の菌種が広く用いられている。水素発酵に関連する基質代謝経路は酢酸経路と酪酸経路であり、理論的にはグルコース 1 モルから酢酸経路で 4 mol-H_2/mol-hexose、酪酸経路で 2 mol-H_2/mol-hexose の水素収率が得られる。また、*Clostridium* 属は乳酸菌などの雑菌汚染に脆弱であるため、基質や植種の熱処理が水素発酵の安定化技術として用いられている。しかしながら、熱処理によるエネルギー投入は水素の燃料としての価値を低下させる主因となっている。我々はこの点の打開策として、乳酸を原料として水素生産可能な *Megasphaera elsdenii* を LU-HPB（Lactate Utilizing-Hydrogen Producing Bacteria）として提案している（*RSC Adv.*, 2012,2, 8332)。本研究では *M. elsdenii* の水素発酵に関連する基質代謝経路の理解を目的とする。今回は水素発酵過程における基質と代謝産物の関連性について検討した結果を報告する。

【方法及び結果】

まず、*M. elsdenii* と一般的な水素発酵菌である *Clostridium butyricum* を用いてグルコースを基質とした基礎発酵培地(グルコース 5g/L、トリプトン 5 g/L、酵母エキス 3 g/L、pH7.0)による回分実験を行い、水素収率と生成される主な有機酸を比較した。その結果、*C. butyricum* では主に酢酸、酪酸、乳酸が生成され、水素収率は 2.1mol-H_2/mol-hexose であった。これに対し、*M. elsdenii* では酢酸、酪酸のほかにイソ吉草酸、カプロン酸、イソ酪酸が生成され、水素収率は 2.6 mol-H_2/mol-hexose で、*C. butyricum* の 1.2 倍の高い水素発酵能を示した。また、^{13}C で同位体標識したグルコースを用いて基質と生成される有機酸の関係を評価した。その結果、*M. elsdenii* が生成する酢酸、酪酸、カプロン酸はグルコースに由来していることが示された。しかしながら、イソ吉草酸、イソ酪酸では質量変化が見られず、培地中のグルコース以外の有機物に由来していることが示された。さらに、TLC により発酵過程におけるアミノ酸消費を評価した結果、*C. butyricum* ではアミノ酸の変化は見られないのに対し、*M. elsdenii* は水素発酵過程で複数のアミノ酸を消費していることが示唆された。*M. elsdenii* の培養過程で生じる分岐鎖有機酸はこれらの消失したアミノ酸に由来している可能性が考えられ、アミノ酸代謝の水素生成への関与が示唆された。

hydrogen fermentation, *Megasphaera elsdenii*, LU-HPB

講演番号：4C31a05
講演日時、会場：3 月 29 日 09:44～ C 校舎 31 会場

バイオガス生産への消化汚泥分解微生物の利用可能性

Potential of sludge-degrading microbes for biogas production

○佐藤 颯音、藤井 克彦（山口大院農）
○HAYATO SATO, KATSUHIKO FUJII (Yamaguchi Univ.)

【目的】

活性汚泥法では処理にともない余剰汚泥が発生する。余剰汚泥の減容ならびにバイオガスを生産する手段として嫌気消化槽を導入する下水処理場が増えている。しかし嫌気消化後の減容率は 30 程度に留まり、生分解性の低い消化汚泥が発生する。最近になって演者らは消化汚泥分解能を持つ 6 株の糸状菌株（以下、分解菌）を分離した。分解菌はキシラナーゼ、キチナーゼ、ケラチナーゼ活性を有しており、これらの加水分解酵素によって消化汚泥を分解していると考えられた。そこで本研究では、まず分解菌が消化汚泥のみならず余剰汚泥に対しても分解能を持つかを検討した。次に、分解菌酵素を用いることでバイオガスの増産が可能かを検討した。

【方法】

脱水消化汚泥は近隣下水処理場から入手し、105℃で乾燥した後にミキサーで粉砕した。また、終濃度 1 N の硫酸に消化汚泥を 1 時間室温浸漬し、アルミニウム等の凝集剤成分を抽出除去した汚泥（酸処理汚泥）も調製した。余剰汚泥は遠心分離を行い、粘土状の固形沈殿を脱水余剰汚泥として用いた。

余剰汚泥、消化汚泥、あるいは酸処理汚泥を水に懸濁させたものを培養液とし、分解菌を 30℃で培養した。培養後の上清液を回収し、これを分解酵素溶液として用いた。酵素活性は各々キシラン、アゾキチン、アゾケラチンを基質として 50℃で 1 時間反応させ、遊離される還元糖あるいはアゾ色素の吸光度を分光光度計で測定することで算出した。嫌気消化実験は 15 mL 容バイアルを用いて行った。分解菌培養上清、汚泥、および消化液をバイアルに加え、窒素充填して 50℃で静置培養した。培養で発生したメタンをガスクロマトグラフで定量した。

【結果】

未検討であった余剰汚泥に対する分解能を検討した結果、分解菌は余剰汚泥でも良好に生育するが、分解酵素活性は消化汚泥を与えた場合よりも低い傾向となった。次に、バイオガス生産に対する分解酵素の効果を検討した。余剰汚泥を嫌気消化の基質とした場合、分解菌培養上清を加えてもバイオガス生産が促進されることはなかった。しかし、酸処理汚泥を嫌気消化の基質としたところ、分解菌培養上清を加えることでバイオガス生産が促進された。さらに、効率良く汚泥の固液分離ができ、なおかつ分解菌とメタン生産菌の生育を阻害しない凝集剤を見出すこともでき、今後は酸処理を施すことなく消化汚泥からバイオガスを生産できると期待された。

sewage sludge, microbial degradation, biogas

講演番号：4C31a06
講演日時、会場：3 月 29 日 10:05～ C 校舎 31 会場

放射性物質汚染バイオマス減容化プロセスを目指したバイオマス前処理技術と UASB メタン発酵システムの開発

Development of biomass pretreatment technology and UASB system for volume reduction of biomass which contaminated with radioactive material.

○木村 光平[1]、原川 洋明[1]、大塚 祐一郎[2]、中村 雅哉[2]、新谷 政己[1]、金原 和秀[1] ([1]静岡大工、[2]森林総研)
○KOHEI KIMURA[1], HIROAKI HARAKAWA[1], YUICHIRO OHTSUKA[2], MASAYA NAKAMURA[2], MASAKI SHINTANI[1], KAZUHIDE KIMBARA[1] ([1]Shizuoka Univ., [2]FFPRI)

【背景】福島原発事故後、放射性物質で汚染されたバイオマスが大量に発生した。こうしたバイオマスの量は膨大であり減容化が必要である。我々は、減容化プロセスの開発を行っているが、当研究室では、湿式ミリング法によるバイオマスの効率的糖化と、糖化処理により得られた糖化液の UASB メタン発酵に焦点を絞って研究を行っている。汚染バイオマスの湿式ミリングにより、1)放射性物質が固体画分、液体画分のどちらにどれだけ移行するのか、2)どれくらいバイオマスを糖化できるのか、3)汚染バイオマス糖化液の UASB メタン発酵が可能か、4)放射性物質が排出液、バイオガス、菌体のどこにどれだけ移行するのかという 4 点を明らかにすることを目的とし、実験を行った。
【方法】(Ⅰ)湿式ミリング：イナワラ粉 50g、蒸留水 445mL、リン酸バッファー(pH5.5)5mL を混ぜスラリーとし、糖化酵素として OPTIMASH BG (GENENCOR®) を 5 mL (59225 U)、OPTIMASH XL (GENENCOR®) を 5 mL (35650 U) 加え、ビーズミルを 2 時間行った。2 時間後、回収したスラリーを固液分離し、糖化液と固形残渣を回収した。固形残渣には、蒸留水と酵素を加え、55℃の恒温槽内で 24 時間撹拌し 2 次糖化をした。再び固液分離し、2 次糖化液は回収、固形残渣は蒸留水を加えて再懸濁し、再度固液分離をした後に回収した。上清も残渣洗浄水として回収した。1 次糖化液、2 次糖化液、洗浄水、固形残渣の計 4 サンプルそれぞれに含まれる放射能を計量し、湿式ミリングによる放射性物質の移行性を調査した。(Ⅱ)UASB メタン発酵：イナワラ糖化液を、COD 1200 mg/L に希釈し供給した。温度は 35℃、滞留時間 6.0h で運転をし、ガス生成量の測定を行い、メタン発酵性能を評価した。供給液、排出液、バイオガスに含まれる放射性物質の放射能を計量し、放射性物質の移行性を調査した。
【結果と考察】(Ⅰ)イナワラ粉の 2 時間の湿式ミリングで、約 60%の糖化率を得ることができた。1 次糖化液、2 次糖化液、洗浄水、固形残渣に移行した放射性物の質割合はそれぞれ、51.8%、17.8%、4.1%、26.6%であった。2 時間の湿式ミリング、それに続く追加糖化、洗浄により、約 75%の放射性物質が液体画分に移行した。このことから、このプロセスにおいて、UASB メタン発酵に対する放射性物質の影響を注視する必要がある。(Ⅱ)イナワラ糖化液の UASB メタン発酵では、安定したガス生成が認められた。放射性物質を含んだ糖化液の供給を開始して 24 時間後には、排出液と供給液における放射能がほぼ同値になったことから、24 時間以内に菌体への放射性物質の吸着が平衡に達し、以降は排出液とともに系外へ排出されることが示唆された。　なお本研究は、文科省国家課題対応型研究開発推進事業“原子力基礎基盤研究イニシアティブ”の委託費で行った。

radioactive material, biomass pretreatment, UASB methane fermentation

講演番号：4C31a07
講演日時、会場：3 月 29 日 10:16～ C 校舎 31 会場

高温可溶化メタン発酵に関する新規好熱性細菌 KK2012－0012 株の研究

Study of thermophilic strain KK2012-0012 in high-temperature methane fermentation

○薬師寺 佑佳[1]、中島 琢自[2]、甲斐 穂高[5]、中道 隆弘[6]、松本 厚子[3,4]、高橋 洋子[3,4]、石橋 康弘[1]
([1]熊本県大院環境、[2]北里大感染制御研究機構、[3]北里大生命研、[4]北里大院感染制御科学府、[5]鈴鹿高専生物応用、[6]長崎総科大情報学)
○Yuka Yakushiji[1], Takuji Nakashima[2], Hotaka Kai[5], Takahiro Nakamichi[6], Atuko Matumoto[3,4], Youko Takahashi[3,4], Yasuhiro Ishibashi[1] ([1]Prefectual Kumamoto Univ., [2]Kitasato University Research Organization for Infection Control Sciences, [3]Kitasato Institure for Life Sciences, [4]Kitasato University Graduate School of Infection Control Sciences, [5]Suzuka national college of technology, [6]Nagasaki Institure of applied science Univ.)

深刻な環境問題の一つである地球温暖化は異常気象をもたらし、さらには生物への悪影響を引き起こすことが危惧されている。温暖化問題は二酸化炭素（CO_2）などの温暖化ガスが大きな要因となっている。家畜の糞尿などの廃棄物系バイオマスを利用したメタン発酵は CO_2の排出を抑え、エネルギーを生み出す技術であり、温暖化問題に貢献できると期待されている。メタン発酵は、１）高分子有機物の可溶化・加水分解、２）可溶性有機物から有機酸を生成する酸生成、３）水素や酢酸などからメタンと二酸化炭素を生成するメタン生成、という三つのプロセスからなる。特に、第一段階である高分子有機物の可溶化工程の改良が重要であると考えられる。我々はこの可溶化工程に注目し、メタン発酵の高効率化を目指した。メタン発酵槽の前に 80℃に加熱した可溶化槽を設け、メタン発酵の阻害物質であるアンモニアを除去した。熱処理によりアンモニアは除去できるが、高分子有機物の可溶化率は約 15%にとどまり、さらなる可溶化率の向上が望まれた。本研究は、高温環境下で高分子有機物を分解できる好熱性細菌を探索し、可溶化向上を目的とした。

可溶化に用いる好熱性細菌を分離するため、温泉地である熊本県阿蘇群小国町岳の湯の土壌から微生物を分離した。土壌試料を Yeast-Malt extract（YM）寒天培地に塗沫し、60℃および 80℃で培養した。生育してきたコロニーを高分子有機物（スキムミルクやリグニン）含有 YM 寒天培地に植菌し、ハロー形成を指標に有機物可溶化の能力を有する好熱性細菌を選択した。60℃培養およびスキムミルクを可溶化できる細菌が多く得られ、その中から 20 株を選択した。選択した 20 株を液体培地で 1～5 日間、60℃で培養し、遠心により上清を得た。その上清と終濃度 1%となるようにスキムミルクを加え、60℃で 18 時間インキュベート後、吸光度 600 nm を測定することにより、スキムミルクの可溶化率を測定した。その結果、KK2012-0012 株は培養日数に関わらず、高く安定した可溶化率を示した。

本菌株の高分子有機物の分解能力を調べるため、ドッグフードを用いた可溶化模擬試験を実施した。ドッグフードの固形物濃度を 3%になるように蒸留水で希釈した。その懸濁液を 80℃に加温し、CODcr 法を用いて可溶化率を算出した。その結果、菌体無添加郡は 25％の可溶化率を示した。一方、KK2012-0012 株添加郡は 30 時間後に最大可溶化率を示し、可溶化率 40%に上昇した。この結果よりメタンガスの収支予測を行った結果、菌体無添加郡と比較して約 10%の増加が見込まれた。

メタン発酵工程の可溶化において熱処理によるアンモニア除去および KK2012-0012 株添加による高分子有機物の可溶化率を考えると、従来法に比べ、メタン発生量がかなり向上すると期待される。

methane fermentation, high-temperature solubilization, thermophilic strain

講演番号：4C31a08
講演日時、会場：3 月 29 日 10:27～ C 校舎 31 会場

鶏糞のメタン発酵における珪藻土焼結体添加の細菌解析

Analysis of microbial community in methane fermentation of chicken manure using sintered diatomite

○根本 大輔、大貫 純、滝口 泰之（千葉工大工）
○Daisuke NEMOTO, jun OONUKI, Yasuyuki TAKIGUCHI (Chiba Tech.)

[背景・目的]

千葉県の廃棄系バイオマス量は，家畜排せつ物が約 50%と最も高い割合を占めている．家畜排せつ物は主に堆肥として利用されているが，需要量より生産量が上回っているため，新規の利用および適切な処理方法が求められている．これらを可能にする技術として，メタン発酵が挙げられる．

既往研究[1)]において，鶏糞に珪藻土焼結体を担体として添加した系は，微生物固定化によりメタンガス生成量が増加し，メタン生成までの誘導期の短縮が認められた．そこで本研究では，珪藻土焼結体の添加の有無によるメタン生成菌数および菌相を経時的に比較することにより，メタンガス生成量向上メカニズムの解明を目的とした．

[方法・結果]

鶏糞 100 g，純水 170 mL，菌液 30 mL を発酵槽に投入し，珪藻土焼結体の添加系は発酵槽の体積当たり 10%(30 g)入れ，密栓して 37℃でバッチ培養を行った．珪藻土焼結体は，イソライト CG2 号を用いた．イソライト CG2 号は，珪藻土を 1000℃で焼成した 2 mm の粒状多孔質体(気孔=体積の 70%，細孔=0.5～1 μm)であり，土壌改良材などに使用されている．培養開始から，3 日毎にテトラバッグでバイオガス，シリンジで発酵液 3 mL を回収した．バイオガスは，ガスクロマトグラフィー(GC-TCD)を用いてガス組成を分析し，水槽に沈めたメスシリンダーに水上置換することでガス発生量の測定をした．発酵液から DNA を抽出し，16S rRNA 遺伝子領域を PCR-DGGE 法を用いて，一般細菌および古細菌の菌相解析を行った．また，メタン生成菌数は蛍光顕微鏡を用いて励起波長 400-440 nm で測定した．

メタン生成は，珪藻土焼結体を添加することにより，メタンガス生成までの誘導期を短縮し，メタンガス生成量も向上した．また，メタン生成菌数はメタンガス生成量と相関していた．よって，珪藻土焼結体を添加することにより，メタン生成菌数が増加し，メタンガス生成量が増加したと考えられる．さらに，メタン生成菌の菌相変化を解析したところ，優占種は珪藻土焼結体の添加の有無で変化が見られず，同一のバンドであった．よって，珪藻土焼結体の添加により，メタン生成菌を固定化したためか，または阻害物質を吸着したことにより，メタン生成菌が増殖しやすい環境になったためと考えられる．

現在，PCR-DGGE 法を用いて，珪藻土焼結体の添加の有無で一般細菌相比較の検討を行っている．

1) 中島隆夫ら，日本農芸化学会 2013 年度大会要旨,(2C11p01)

methane fermentation, DGGE, diatomite

講演番号：4C31a09
講演日時、会場：3 月 29 日 10:38～ C 校舎 31 会場

Effects of feed solid content and alkalinity on biogas production from mango peel waste using a plug flow reactor

Phongphun WATTANAKANKITIKUL[1], Worakrit SUVAJITTANONT[2], Chureerat PUTTANLEK[3], Dudsadee UTTAPAP[4], ○Vilai RUNGSARDTHONG[1] ([1]Department of Agro-Industrial, Food and Environmental Technology, Faculty of Applied Science, King Mongkut's University of Technology North Bangkok, Bangkok, 10800, Thailand, [2]Biochemical Engineering and Pilot Plant Research and Development Unit (BEC), National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), King Mongkut's University of Technology Thonburi, 83 Moo 8 Thakham, Bangkhuntien, Bangkok 10150, Thailand, [3]Department of Biotechnology, Faculty of Engineering and Industrial Technology, Silapakorn University, Nakorn Pathom 73000, Thailand, [4]Division of Biochemical Technology, School of Bioresources and Technology, King Mongkut's University of Technology Thonburi, Bangkok, 10150, Thailand)

The production of biogas was carried out by using mango peel in a plug flow reactor which divided into 3 compartments, with 15 liters working volume, started up with VSS 10 g/l. The effect of hydraulic retention time (HRT) of 50, 30, 20, 15, 10, 7, 5 and 3 days with total solid (TS) 1% on the efficiency of biogas production was studied. The biogas production at HRT of 7 day revealed highest biogas production rate at 0.074 v/v-d, biogas yield at 0.223 m^3/kgCOD removed, methane yield 0.113 m^3/kgCOD removed and COD removal at 92.09%. Methane content was about 49.07, 47.95 and 38.66% in the 1st, 2nd and 3rd compartment of the reactor. The feed solid concentrations of mango peel were increased from 1% to 2% and 4% TS. The results showed that the biogas production at 2% TS, HRT of 7 day indicated highest biogas production rate at 0.179 v/v-d, biogas yield at 0.271 m^3/kgCOD removed and methane yield of 0.124 m^3/kgCOD removed. The efficiency of COD removal was 81.68%. However, the increase of feed TS from 2 to 4 % resulted in higher acid production than the acid utilization which affected the balance between acidogenic and methanogenic fermentation. The adjusting of alkalinity by using $NaHCO_3$ (alkalinity = 2,000 as $CaCO_3$ mg/l) was investigated in the digester operating at TS 4% with HRT 7 day. The alkaline addition showed a positive effect on biodegradation of mango peel in a plug flow reactor as indicated by high biogas production and high methane percentages. Biogas yield, methane yield, biogas production rate were 0.537 v/v-d, 0.319 m^3/kgCOD removed and 0.131 m^3/kgCOD removed respectively. The efficiency of COD removal was 89.41%. Methane content was 28.09, 40.07 and 50.17% in the 1st, 2nd and 3rd compartment of the reactor.

Mango Peel, Plug Flow Reactor, Biogas Production

講演番号：4C31a10
講演日時、会場：3 月 29 日 10:49～ C 校舎 31 会場

土壌中における堆肥および有機資材の無機化

Mineralization of manure and organic material in soil

○向 真樹、Adhikari Dinesh、荒木 希和子、久保 幹（立命館大学）
○Masaki Mukai, Dinesh Adhikari, Kiwako S Araki, Motoki Kubo (Ritsumei Univ.)

【背景・目的】

これまでに、堆肥および肥料に用いる有機資材の成分分析を行ってきた。これらの堆肥および有機資材を土壌に入れると、同じ成分の堆肥、有機資材であっても、土壌中での肥料効果は、堆肥や有機資材によって異なることがわかった。また、同じ堆肥あるいは有機資材であっても、異なる土壌に入れると肥料効果が変わることが明らかになった。このような違いは、土壌中における堆肥および有機資材の無機化が関わっていると考えられる。堆肥および有機資材の成分および無機化といった特徴が把握できれば、より目的に応じた施肥を行うことができ、肥料効果の再現性を高めることができる。本研究は、土壌中における堆肥および有機資材の無機化の解析を目的とした。

【方法・結果】

動物系堆肥である牛糞堆肥、鶏糞堆肥、植物系堆肥であるバーク堆肥、肥料として用いられる未発酵有機資材である大豆粕、木質チップ、水草の TC、総窒素量（TN）、無機態窒素（アンモニア態窒素、亜硝酸態窒素、硝酸態窒素）の成分分析を行った。次に、同じ C/N 比で TC、TN の量が異なる 2 つの農地土壌に上記処理を行った堆肥および有機資材を土壌に対して一定の割合で混ぜてよく撹拌し実験土壌を作製した。実験土壌と、堆肥および有機資材を入れない Blank 土壌とを 25℃で静置した。1 週毎に 4 週までサンプリングを行い、土壌成分（TC、TN、無機態窒素）の経時変化を分析した。TC は、TOC-V5000（島津製作所）、TN は、ケルダール全分解法、無機態窒素は、それぞれ公定法を用いて測定した。

堆肥および有機資材の無機化は、4 週間あたりの堆肥および有機資材由来の TC の減少量および無機態窒素の増加量で評価した。その結果、堆肥では、無機化は鶏糞堆肥＞牛糞堆肥＞バーク堆肥であった。未発酵の有機資材では、水草が最も無機化が進んだ。

mineralization, manure, organic material

講演番号：4C31a11
講演日時、会場：3 月 29 日 11:10～ C 校舎 31 会場

ワックスエステル生産に関わる緑藻ユーグレナの RNA-Seq 解析

RNA-Seq analysis of Euglena gracilis, a feedstock for wax ester production

○冨山 拓矢[1]、吉田 勇太[2]、丸田 隆典[1]、澤 嘉弘[1]、荒川 和晴[2]、石川 孝博[1,3]（[1]島根大・生物資源・生命工、[2]慶応大・先端生命、[3]JST/CREST）
○TAKUYA TOMIYAMA[1], YUTA YOSHIDA[2], TAKANORI MARUTA[1], YOSHIHIRO SAWA[1], KAZUHARU ARAKAWA[2], TAKAHIRO ISHIKAWA[1,3] ([1]Dept. Appl. Biosci. and Biotech., Fac. Life and Environ. Sci., Shimane Univ., [2]Inst. Adv. Biosci., Keio Univ., [3]JST/CREST)

微細藻類ユーグレナ（*Euglena gracilis*）は、好気条件下においてβ-1,3-グルカンで構成される貯蔵多糖パラミロンを大量に合成し、嫌気条件下ではワックスエステル発酵によりパラミロンをワックスエステルに変換する。ユーグレナが生産するワックスエステルの主成分はミリスチルミリステート C28 であり、その構成脂肪酸ミリスチン酸 C14 は、バイオディーゼル燃料や代替ジェット燃料としての利用が期待されている。本研究では、ユーグレナの嫌気応答時の脂質合成調節機構の解明を目的に、次世代シーケンサーを用いた網羅的な遺伝子発現解析を行うとともに、新規ワックスエステル合成酵素の同定を行った。

光従属栄養条件で定常期まで培養したユーグレナを嫌気 24 時間処理した後、RNA を抽出し RNA-Seq 解析を行った。アセンブルしたコンティグのうち発現していることが確からしい遺伝子候補数は約 28,000 遺伝子であることが推測された。また、約 50%の遺伝子の 5'末端にユーグレナ固有のスプライシングリーダー配列が確認された。edgeR を用いた有意差検定の結果、2,080 の遺伝子が嫌気条件に応答して有意に発現変動する（FDR＜0.05）ことが示され、その内 88 遺伝子が 2 倍以上の変動を示した。得られた RNA-Seq データからワックスエステル発酵経路に関連する候補遺伝子を推定した。ワックスエステル合成酵素に関して、*Acinetobacter baylyi* ADP1 由来 Wax Synthase/Diacylgrycerol acyltransferase(*WSD*)遺伝子をクエリに相同性検索を行ったところ、6 つの遺伝子(*WSD1-6*)が高い類似性を示した。二本鎖 RNA 導入により *WSD1-6* を個別にサイレンシングをした結果、嫌気処理 24 時間後のワックスエステル蓄積量にコントロール細胞との有意な差は認められなかった。しかし、発現量の高い 3 つの *WSD* 遺伝子(*WSD2*、*WSD3*、*WSD5*)を同時にサイレンシングしたところ、コントロールに比較して嫌気処理 24 時間後のワックスエステル蓄積量は約 50%に低下したことから、ワックスエステル合成には複数の酵素の関与が示唆された。現在これらの酵素の酵素学的性質の検討進めている。

Euglena gracilis, wax ester, transcriptome

講演番号：4C31a12
講演日時、会場：3 月 29 日 11:21～ C 校舎 31 会場

ラン藻 FBP/SBPase 遺伝子導入によるユーグレナのバイオ燃料生産性の向上
Expression of cyanobacterial fructose-1,6-/sedoheptulose-1,7-bisphosphatase in *Euglena gracilis* leads to increases in biomass production

○木村 彩子[1,2]、小川 貴央[1,2]、作山 治美[1,2]、丸田 隆典[2,3]、鈴木 健吾[2,4]、石川 孝博[2,3]、田茂井 政宏[1,2]、重岡 成[1,2]（[1]近畿大・農・バイオ、[2]JST, CREST、[3]島根大・生資科・生命工、[4]（株）ユーグレナ）
○Ayako KIMURA[1,2], Takahisa OGAWA[1,2], Harumi SAKUYAMA[1,2], Takanori MARUTA[2,3], Kengo SUZUKI[2,4], Takahiro ISHIKAWA[2,3], Masahiro TAMOI[1,2], Shigeru SHIGEOKA[1,2] ([1]Kinki Univ., [2]JST, CREST, [3]Shimane Univ., [4]euglena Co., Ltd.)

【目的】近年、次世代エネルギー資源として藻類バイオ燃料が注目されている。真核藻類ユーグレナは、好気条件下では光合成産物として貯蔵多糖パラミロンを蓄積し、嫌気条件下に移行するとパラミロンを分解し、ワックスエステル発酵によりミリスチン酸（C14）とミリスチルアルコール（C14）からなるミリスチルミリステート（C28）を主成分とするワックスエステルを高生産する特徴を有する。C14 程度の軽質な脂肪酸は、一般的なバイオディーゼルはもちろん代替ジェット燃料としての利用も期待されている。他の微細藻類の多くは鎖長 C16 以上の脂肪酸が主要な生成物であることからも、ユーグレナの C14 合成能は際立った特徴である。そこで本研究ではユーグレナのワックスエステル生産性向上を目的として、ラン藻カルビン回路で機能する FBP/SBPase 遺伝子をユーグレナへ形質転換し、ユーグレナのバイオマス生産性に及ぼす光合成能強化の影響について解析した。
【方法・結果】CaMV35S プロモーター下流にラン藻 FBP/SBPase 遺伝子を連結したプラスミド DNA（pRI101-35S:*fbp/sbp*）の LB-RB 領域を PCR により増幅し、対数増殖期まで培養したユーグレナ野生株へパーティクルガン法により導入した。パロモマイシン添加培地で選抜を繰り返し、複数の薬剤耐性株を得た。得られた薬剤耐性株について、導入遺伝子特異的なプライマーを用いたゲノミック PCR および抗 FBP/SBPase 抗体を用いたウエスタンブロッティングにより、FBP/SBPase 遺伝子の導入および葉緑体でのタンパク質の発現を確認した。最も高い FBP/SBPase タンパク質発現が認められた EpFS4 株の FBPase 活性は、野生株の約 1.4 倍に上昇していた。通常条件（光独立栄養培地、100 μmol photons/m^2/s, 0.04% CO_2）で野生株と生育比較を行った結果、生育速度に顕著な差は認められなかったが、EpFS4 株において細胞体積の増加が認められた。一方、強光・高 CO_2 条件（350 μmol photons/m^2/s, 0.3% CO_2）で生育比較を行った結果、EpFS4 株は野生株と比較して生育速度の上昇、細胞体積の増加が認められ、EpFS4 株の光合成活性は野生株の約 1.5 倍、クロロフィル量は野生株の約 1.6 倍、バイオマス量（乾燥重量）は野生株の約 2 倍に増加していた。パラミロン蓄積量は細胞あたりで野生株の約 1.2 倍、培養体積あたりでは約 2 倍に増加していた。さらに、同条件下で培養した細胞を 24 時間嫌気処理し、ワックスエステル（C28）および脂肪酸を GC-MS により定量した結果、EpFS4 株のワックスエステル（C28）量は野生株の約 100 倍に増加しており、総脂肪酸量は約 1.9 倍、中でも C14 は野生株の約 5.6 倍に増加していた。以上より、FBP/SBPase 遺伝子導入による光合成能の強化は、ユーグレナのバイオマスおよびワックスエステル生産性向上を可能にすることが示された。

Euglena, transformation, biofuel

講演番号：4C31a13
講演日時、会場：3 月 29 日 11:32～ C 校舎 31 会場

ラパマイシンが *Euglena gracilis* の脂質生産に与える影響

Rapamycin induces lipid accumulation without growth inhibition in *Euglena gracilis*

○向田 志保、有田 正規（国立遺伝学研究所）
○Shiho MUKAIDA, Masanori ARITA (National Institute of Genetics)

極長鎖脂肪酸（VLCFA）は、炭素数が 20 以上の飽和または不飽和脂肪酸を指す。緑色の原核生物であるミドリムシ(*Euglena gracilis*) は、エイコサペンタエン酸(EPA)、ドコサヘキサエン酸(DHA)を含む多種類の VLCFA を生産する。VLCFA 伸長酵素（VLCFAE）遺伝子には植物型と動物型があり、EST 解析によれば *E. gracilis* はどちらの型も有している。植物型 VLCFAE 阻害剤は除草剤として市場に流通しており、その一つであるフルフェナセットを *E. gracilis* に添加することで、細胞内脂質蓄積量が増加することがすでに報告されている [1)]。そこで我々は、膜形成不全等に陥らない程度に VLCFAE を阻害すれば、VLCFA の前駆体（< C18 の脂肪酸）が細胞内に蓄積すると考え、酵母において動物型 VLCFAE を不活化する抗生物質ラパマイシン [2)] の添加実験をおこなった。まず、*E. gracilis* の定常期の細胞を PBS で 2 回洗浄・懸濁後、新しい KH 培地に播種し、ラパマイシン溶液（in EtOH）を最終濃度が 1 または 10 μM となるように添加した。コントロールとして、エタノールのみを添加したものを用いた。明暗いずれかの条件下で 5 日間、28℃、160 rpm で旋回培養し、OD_{750}、ジメチルホルムアミド抽出によるクロロフィル含量および Nile Red による細胞内油滴の蛍光強度を測定した。その結果、明条件下で培養すると、ラパマイシンは、増殖には影響を与えず、クロロフィルを欠損させ、脂質生産量を増加させることが分かった。暗条件下では、明条件下よりも脂質生産量大幅に増加し、ラパマイシン添加による脂質蓄積効果もみられた。また、興味深いことに、暗条件下でラパマイシンを添加すると、増殖が促進されることが分かった。微細藻類は、ラパマイシンにより増殖阻害を受けるものと受けないものに分かれる。*E. gracilis* と同様ラパマイシンに対して増殖阻害を受けない紅藻 *Cyanidioschyzon merolae* は、ラパマイシンを添加すると、クロロフィルは減少したものの、脂質蓄積効果は認められなかった。

ラパマイシンは細胞内で FKBP12（12 kDa FK506 binding protein）と結合し、この ”FKBP12-ラパマイシン複合体” がラパマイシンの標的タンパク質 Target of rapamycin (TOR) に結合することで TOR 活性を阻害する。*E. gracilis* の EST 及び RNA-seq 解析により、TOR 遺伝子も見つかった。EST 解析からは、ヒトや緑藻等の FKBP12 と相同性がある配列が 3 種見つかり、系統樹解析により、すべて *C. merolae* といったラパマイシンに非感受性の藻類や植物と同じグループに属していた。

1) Tucci, S. *et al.*; *J. Eukaryot. Microbiol.*, **57**, 63 (2011).
2) Zimmermann, C. *et al.*; *Cell Reports*, **5**, 1036 (2013).

Euglena gracilis, rapamycin, biodiesel production

講演番号：4C31a14
講演日時、会場：3 月 29 日 11:43～ C 校舎 31 会場

ユーグレナ 3-ケトアシル CoA チオラーゼ発現抑制によるワックスエステル生産の制御
Alteration of wax ester content and composition in *Euglena gracilis* with gene silencing of 3-ketoacyl-CoA thiolase isozymes

○中澤 昌美[1,2]、小山 啓一郎[1]、安藤 博子[1,2]、渡辺 嘉[4]、中井 猛夫[4]、上田 光宏[1]、阪本 龍司[1]、乾 博[3]、中野 長久[5]、宮武 和孝[6] ([1]阪府大生命、[2]JST さきがけ、[3]阪府大総リハ、[4]阪市工研、[5]大阪女子短大、[6]帝塚山学院大)
○Masami Nakazawa[1,2], Keiichiro Koyama[1], Hiroko Andoh[1,2], Yomi Watanabe[4], Takeo Nakai[4], Mitsuhiro Ueda[1], Tatsuji Sakamoto[1], Hiroshi Inui[3], Yoshihisa Nakano[5], Kazutaka Miyatake[6] ([1]Osaka Pref. Univ. Life, [2]JST PRESTO, [3]Osaka Pref. Univ. Rehab., [4]OMTRI, [5]Osaka Woman Jr. Col., [6]Tezukayama Gakuin Univ.)

近年、二酸化炭素の削減とエネルギー生産を両立できる系として、光合成生物である微細藻類による燃料生産が注目されている。油糧植物と比較して面積当たりの油脂生産量が 10 倍程度と非常に高いことも、藻類オイルが注目される理由のひとつである。微細藻類の生産する油脂は、生物種により異なるが、炭素鎖が 16～18 のものが多く、飽和化合物と不飽和化合物の両方を含んでいる。このことは、バイオ燃料を実用化するにあたり低温での流動性の低さおよび酸化安定性の問題を引き起こす。この 2 つの問題を同時に解決する方策として、より短鎖の飽和化合物を活用することが挙げられる。我々が研究に用いた生物であるユーグレナは低酸素条件下で、飽和脂肪族化合物から構成されるワックスエステル（WE）を合成する。主産物はミリスチン酸ミリスチル（C14:0-C14:0Alc）であり、WE から調製したバイオディーゼルは、植物や他の藻類オイルから調製されたものより短鎖の化合物から構成される。このため、軽質なバイオディーゼルとしての利用が期待されるが、実用に向けてはさらに炭素長を短くすることが望ましい。そこで本研究では、ユーグレナが産生する WE の鎖長を短縮することを目指した。ユーグレナにおいて WE はミトコンドリア脂肪酸 β 酸化の逆行経路を経由して合成される。本研究ではアシル鎖伸長反応を触媒する 3-ケトアシル CoA チオラーゼ（KAT）に注目した。KAT アイソザイムが果たす役割を解明し、最終的には WE 合成を制御することを目的とした。

ユーグレナ EST データベース上にミトコンドリア局在が予想される KAT アイソザイムを 4 種見出した（以下 EgKAT1～4)。各アイソザイムを RNAi によりノックダウンし、低酸素下で生産される WE をガスクロマトグラフィーにより分析した。その結果、EgKAT1 および EgKAT2 のノックダウンで、WE 組成分布が短鎖にシフトした。EgKAT3 のノックダウンでは、WE 総量がコントロール細胞の約 30%に減少していた。WE 短縮化に最も効果的であった EgKAT1 のノックダウン細胞由来 WE をケン化分解し組成を解析したところ、脂肪酸、脂肪アルコールともに炭素長 12、13 が大幅に増加していた。最後に、EgKAT1 ノックダウン細胞の WE 組成をもとに脂肪酸メチルエステル、脂肪アルコール標品を混合して調製したモデルバイオ燃料を用いて、低温での流動性の指標となる融点、凝固点の測定を行った。その結果、EgKAT1 のノックダウンにより融点、凝固点が約 8℃低下した。

以上のことから、適切に KAT を代謝調節するにより、ユーグレナが生産する WE の鎖長を制御することができ、より実用に近いバイオ燃料を作ることができると結論した。

Euglena, wax ester, 3-ketoacyl-CoA thiolase

講演番号：4C31a15
講演日時、会場：3 月 29 日 11:54～ C 校舎 31 会場

バイオディーゼル燃料生産に利用可能な微細藻類の単離とその増殖最適化に関する研究
Isolation of microalgae available for the biodiesel fuel production and optimization of its growth
○高 未麗[1]、新居 由莉[1]、岡本 早紀[1]、松村 吉信[1,2] ([1]関西大・生命生物工、[2]関西大・ORDIST)
○Miryo KOH[1], Yuri ARAI[1], Saki OKAMOTO[1], Yoshinobu MATSUMURA[1,2] ([1]Dept. of Life Science and Biotechnol, Kansai Univ., [2]ORDIST, Kansai Univ.)

【目的】
近年、天然資源の枯渇や環境汚染が深刻な問題になっており、その対策としてバイオ燃料などのカーボンニュートラルなクリーンエネルギーの研究開発が進められている。現在、サトウキビやトウモロコシなどの穀物類よりも二酸化炭素固定能が高く、食糧とも競合しない微細藻類の活用が新たなバイオマスとして注目されている。これまでに多くの大学や研究機関で油脂含有率の高い微細藻類の単離が試みられているが、培養に要する時間やコストなどの問題が未解決なために実用化に至っていない。そこで本研究では、バイオディーゼル燃料として利用可能な新たな有用微細藻類を探索すると共に油脂生産能力を高める培養条件の検討を目的とした。
【方法と結果】
近畿圏内の池や川で採水した試料水から画線培養法や限界希釈法により計 138 株の微細藻類を、炭酸ナトリウムを炭素源とした BG11 培地で単離した。単離株を、同培地、光量子束密度 400 μmol·m^{-2}·s^{-1}（30,000 lux)、14 日間（明条件 12 時間/暗条件 12 時間)、25℃、125 rpm で振盪培養し、ナイルレッド染色よる蛍光顕微鏡観察で油脂生産能を判別した。その結果、10 株の微細藻類で高い中性脂質生産能が確認された。これらの微細藻類細胞の油脂を Bligh & Dyer 法で抽出してその質量を測定した結果、3 株が乾燥菌体質量あたり 50%以上の油脂生産能を有していた。そのうち 2 株について、*rbsL* や 18SrRNA 遺伝子の塩基配列を解読して相同性を検索した結果、*Monactinus sturmii* と *Diplosphaera sp.* であった。この 2 株について、培養終了直前の明暗条件の違いによる油脂生産量への影響を検討した結果、暗条件 2 時間目で最も油脂量が高かった。また、培地中の炭酸ナトリウム濃度の違いによる油脂生産量への影響を検討した結果、5mM のとき最も高い油脂生産量を示した。さらに、抽出した油脂を脂肪酸メチルエステル化後、ガスクロマトグラフィー(ZB-5 カラム・水素炎イオン化検出)で脂肪酸組成分析を行った結果、不飽和脂肪酸であるパルミトレイン酸とオレイン酸が主成分であると確認された。今後更なる油脂生産量やバイオマス量の向上に向けた培養条件の検討を行う予定である。

microalgae, neutral lipid, cell mass

講演番号：4C22a01
講演日時、会場：3 月 29 日 09:00～ C 校舎 22 会場

ヒト RNase P タンパク質 Pop5 と Rpp30 の古細菌相当タンパク質の機能

Functional Implication of Archaeal Homologues of Human RNase P Protein Pairs Pop5 with Rpp30

○杤山 紘輔、濱崎 真人、中島 崇、角田 佳充、木村 誠 (九大院生資環)
○Kohsuke Hazeyama, Masato Hamasaki, Takashi Nakashima, Yoshimitsu Kakuta, Makoto Kimura (Kyushu Univ.)

【背景・目的】超好熱性アーキア（*Pyrococcus horikoshii*）の前駆体 tRNA プロセシング酵素・リボヌクレアーゼ P (RNase P)は、RNA (pRNA)と 5 種のタンパク質(Pop5, Rpp21, Rpp29, Rpp30、Rpp38)から構成され、pRNA のみでは触媒活性を示さず、5 種のタンパク質と相互作用することではじめて触媒活性を獲得する。また、Pop5 と Rpp30 はヘテロ四量体を形成し pRNA の触媒ドメインを、Rpp21 と Rpp29 はヘテロ二量体を形成して、pRNA の特異性ドメインを活性化している。さらに、Pop5 と Rpp30 は pRNA のヘリックス P3 と P16 を含む 2 本のステムループ (P3 ステムループと P16 ステムループ) に結合することが明らかとなっている。Pop5 は RNA 結合タンパク質に多く見られる RRM (RNA recognition motif)を持つが、典型的な RRM には見られない、3 つの余分なヘリックス構造(α2, α4 及びα5)を有し、α2 は Pop5 の二量体化に関与し、C 末端に位置するα4 及びα5 は大きく正電荷に偏っている。本研究では、Pop5 の余分なヘリックス構造に着目し、Pop5 の構造機能相関の解明を目指すとともに、Pop5 と Rpp30 のヘテロ四量体における機能について検討した。
【方法・結果】Pop5 のα5 領域の 6 残基を欠損させたΔ6C と、α4 及びα5 領域の 14 残基を欠損させたΔ14C、そして二量体系性部位の 6 残基を欠損させたΔL を作製し、それらを含む再構成 RNase P により、前駆体 tRNA 切断活性を測定した。その結果、Δ6C を含む再構成酵素では野生型 Pop5 (WT) を含む再構成酵素と同程度の活性を維持していたが、Δ14C 及びΔL を含む再構成酵素では、活性が著しく低下していた。続いて、表面プラズモン共鳴法を利用し、Pop5、Rpp30、および Pop5-Rpp30 と P3 ステムループとの結合親和性を検討したところ、Pop5-Rpp30 は P3 ステムループと特異的に強く結合したが (解離定数 K_D, 2.9 nM)、Pop5 は弱く結合し (K_D, 2.41 μM)、Rpp30 はほとんど結合しなかった。この結果より、Pop5 と Rpp30 のヘテロ四量体において、Pop5 が P3 ステムループとの結合に関与し、Rpp30 は Pop5 の構造形成に関与していることが示唆された。続いて、Δ14C およびΔL の P3 ステムループに対する結合親和性を Rpp30 の存在下で検討したところ、Δ14C-Rpp30 の親和性は著しく低下していたが、ΔL-Rpp30 は Pop5-Rpp30 と同程度 (K_D, 7.2 nM) の親和性を維持していた。以上の結果と、Pop5 と Rpp30 のヘテロ四量体の結晶構造および pRNA のモデル構造に基づき、Pop5-Rpp30-pRNA 複合体モデルを構築した。このモデル構造では、ヘテロ四量体において Pop5 の C 末端ヘリックスα4 が P3 ステムループと P16 ステムループを架橋して、pRNA のヘリックス P4 を含む触媒ドメインを活性化し、Rpp30 は Pop5 の二量体形成を促す分子シャペロンとして機能していることが示唆された。

ribonuclease P, *Pyrococcus horikoshii*, ribozyme

講演番号：4C22a02
講演日時、会場：3 月 29 日 09:11～ C 校舎 22 会場

リボヌクレアーゼ P RNA の Rpp21-Rpp29 結合部位に関する研究

Binding site of Rpp21 and Rpp29 on Ribonuclease P RNA

○泉 健太[1]、江 丹[2]、上田 敏史[2]、中島 崇[1,2,3]、角田 佳充[1,2,3]、木村 誠[1,2,3] ([1]九大農、[2]九大院 システム生命、[3]九大院農)

○ Kenta IZUMI[1], Dan JIANG[2], Toshifumi UEDA[2], Takashi NAKASHIMA[1,2,3], Yoshimitu KAKUTA[1,2,3], Makoto KIMURA[1,2,3] ([1]Dep. Agr., Kyushu Univ., [2]Grad. Sch. Sys Life Sci., Kyushu Univ., [3]Fac.Agr., Kyushu Univ.)

リボヌクレアーゼ P（RNase P）は前駆体 tRNA(pre-tRNA)の 5’末端余剰配列を切断するエンドヌクレアーゼで、触媒活性中心を持つ RNA と補助因子であるタンパク質から構成されている。我々は、超好熱性アーキア(*Pyrococcus horikoshii*)RNase P が 1 分子の RNA(pRNA)と 5 種のタンパク質(*Pho*Pop5、*Pho*Rpp21、*Pho*Rpp29、*Pho*Rpp30、*Pho*Rpp38）から構成され、*Pho*Pop5 と *Pho*Rpp30 および *Pho*Rpp21 と *Pho*Rpp29 は複合体を形成し、それぞれ pRNA の触媒ドメインと特異性ドメインの活性化に関与していることを明らかにした。本研究では、*Pho*Rpp21-*Pho*Rpp29 複合体の pRNA における結合部位を、SELEX 法により選択したアプタマーの塩基配列により推定するとともに、各ステムループを欠失した pRNA 変異体に対する結合能を評価することにより検討した。

まず、*Pho*Rpp21 の C 末端に His タグを付加した組換えタンパク質を調製し、*Pho*Rpp29 と混合後、*Pho*Rpp29-*Pho*Rpp21-His 複合体を精製した。次に、T7 プロモーター配列と 50 ヌクレオチドのランダム配列を含む総数 98 ヌクレオチドからなる 2 本鎖 DNA を PCR により増幅し、T7 RNA 合成酵素による試験管内転写によりランダム RNA を調整した。得られた RNA プールをニッケルカラムに固定化した *Pho*Rpp21-*Pho*Rpp29 と混合後、カラムを洗浄した後、*Pho*Rpp21-*Pho*Rpp29 と RNA 鎖複合体を溶出した。その後、得られた RNA 鎖を鋳型として RT-PCR により DNA を増幅し、それを鋳型として再度試験管内転写により RNA プールを再度調製した。上記のサイクルを 8 サイクル繰り返し、得られたアプタマーの塩基配列を決定した。また、各ステムループ構造を欠失した pRNA 変異体に対する結合能は、pRNA 変異体と 5 種のタンパク質を混合後、グリセロール密度勾配遠心により得られた画分のタンパク質を SDS-PAGE を用いて分析することにより行った。

*Rpp*21-*Rpp*29 複合体を標的として SELEX を 8 サイクル繰返し、得られた 48 種のアプタマーの塩基配列を決定したところ、その塩基配列比較から 26 グループに分類された。それらの塩基配列と pRNA の塩基配列と比較したところ、pRNA の触媒ドメインに含まれるヘリックス P5/15 と特異性ドメインに含まれる P11/12 近傍に結合することが示唆された。一方、各ステムループを欠失した pRNA 変異体に対する *Pho*Rpp21 と *Pho*Rpp29 の結合能を検討したところ、ほとんどの pRNA 変異体に結合していたが、P12 と P15/P16 ヘリックスを含む 2 本のステムループを同時に欠失した pRNA 変異体に *Pho*Rpp21 と *Pho*Rpp29 が結合していないことが分かった。以上の結果より、*Pho*Rpp21-*Pho*Rpp29 は P5/15 と P11/12 を架橋し、触媒ドメインと特異性ドメインの相対的位置を安定化していることが示唆された。

Archeae, pre-tRNA processing, Ribonuclease P

講演番号：4C22a03
講演日時、会場：3 月 29 日 09:22～ C 校舎 22 会場

超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis*RNase P 構成タンパク質の構造と活性
Structure and activity of RNase P proteins in the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakarensis*
○末松 光太郎、上田 敏史、垣内 洋介、中島 崇、角田 佳充、木村 誠（九大院生資環）
○KOTARO SUEMATSU, TOSHIFUMI UEDA, YOSUKE KAKIUCHI, TAKASHI NAKASHIMA, YOSHIMITSU KAKUTA, MAKOTO KIMURA (Kyushu Univ.)

【背景・目的】リボヌクレアーゼ P（RNase P）は、前駆体 tRNA（pre-tRNA）の５’末端余剰配列を切断するエンドヌクレアーゼで、触媒活性を持つ RNA と補助因子であるタンパク質から構成されている。最近、真核生物の RNase P が pre-tRNA のプロセシングだけではなく、その他の non-coding RNA のプロセシングや RNA 合成酵素の転写因子としても機能していることが報告されているが、その全容は未解明である。我々は、RNase P の機能の解明を目指して、遺伝子操作系が確立されている超好熱性アーキア（*Thermococcus kodakarensis*）を用いて、RNase P 活性が低下した *T. kodakarensis* 変異株を調製し、現在そのトランスクリプトーム解析を進めている[1)]。本研究では、*T. kodakarennsis* RNase P を構成する 5 種のタンパク質（*Tko*Pop5、*Tko*Rpp21、*Tko*Rpp29、*Tko*Rpp30、*Tko*Rpp38）の pre-tRNA 切断活性への寄与を検討するとともに、*Tko*Pop5 と *Tko*Rpp30 の結晶構造を決定し、生化学的情報が蓄積されている超好熱性アーキア（*Pyrococcus horikoshii*）RNase P の相当タンパク質と比較した。
【方法・結果】各タンパク質は大腸菌を用いて発現させ、SP-Sepharose と Resourse ISO カラムにより精製した。また、*Tko*Pop5-*Tko*Rpp30 複合体は、両タンパク質を等モル比で混合後、SP-Sepharose カラムにより精製した。各タンパク質の活性は pre-tRNA を基質として *P. horikoshii* RNase P 再構成実験により評価した。*Tko*Rpp30 の結晶化は 0.4 M NaCl を含む緩衝液にて濃縮することにより行った。また、*Tko*Pop5-*Tko*Rpp30 の結晶化は結晶化スクリーニングキットを用いて行い、位相の決定はプログラム Phaser による分子置換法を用い、構造の精密化はプログラム COOT および Refmac を用いた。
まず、各タンパク質の活性を *P. horikoshii* RNase P 再構成実験により評価したところ、全てのタンパク質ともそれぞれの相同タンパク質と交換可能であることが分かった。次に、*Tko*Rpp30 の結晶構造を *Pho*Rpp30 の構造をモデルとした分子置換法により分解能 2.2Å で決定した。*Tko*Rpp30 は *Pho*Rpp30 と類似した TIM バレル様の構造を形成していた。また、*Tko*Pop5-*Tko*Rpp30 複合体の構造に関しても、*Pho*Pop5-*Pho*Rpp30 複合体をモデルとした分子置換法により分解能 2.8Å で決定した。*Tko*Pop5-*Tko*Rpp30 は *Pho*Pop5-*Pho*Rpp30 と類似したヘテロ四量体構造を形成し、タンパク質間相互作用に関しても、相互作用に関与するアミノ酸残基は保存されていないものの、相互作用様式は高く保存されていた。以上のことから、*T. kodakarensis* RNase P と *P. horikoshii* RNase P の構成タンパク質は、機能において交換可能で、構造もよく保存されていることが明らかとなった。
１．Ueda T., Suematsu K., *et al.*, *FEMS Lett.*, submitted (2014).

Archaea, Ribonuclease P protein, Crystal structure

講演番号：4C22a04
講演日時、会場：3 月 29 日 09:33～ C 校舎 22 会場

シロイヌナズナ前駆体 tRNA プロセシング酵素・PRORP の結晶構造に関する研究

Crystal structures of the pre-tRNA processing enzyme PRORP in Arabidopsis thaliana

○前田 卓、今井 崇喜、中島 崇、角田 佳充、木村 誠 (九大院生資環)
○TAKU MAEDA, TAKAYOSHI IMAI, TAKASHI NAKASHIMA, YOSHIMITSU KAKUTA, MAKOTO KIMURA (Kyushu Univ)

【背景・目的】触媒活性をもつ RNA（リボザイム）の発見により、生体触媒はリボザイムからタンパク質酵素（エンザイム）へと進化したことが提唱されているが、同一の反応（基質）を触媒するリボザイムとエンザイムが発見されていなかったことから、その比較情報はなかった。リボヌクレアーゼ P（RNaseP）は、前駆体 tRNA の 5’末端プロセシングを触媒するリボザイムで、触媒活性を持つ RNA と補助因子であるタンパク質から構成されている。近年、シロイヌナズナに RNaseP と同様の活性を持つエンザイム・PRORP（Proteinaceous RNase P）が発見されたことで、エンザイム（PRORP）とリボザイム（RNase P）比較が可能になり、PRORP の構造とその触媒機構に興味が持たれている。シロイヌナズナには 3 つの PRORP アイソザイムが存在し、PRORP1 は葉緑体とミトコンドリアに、PRORP2 と PRORP3 は核内に局在し、それぞれ 47～80 %のアミノ酸配列が同じである。既に、PRORP1 の結晶構造が決定され、N 末端側に５つの RNA 認識モチーフ（PPR ドメイン）を、C 末端側に新規金属ヌクレアーゼドメイン（NYN ドメイン）を持つことが報告されている[1)]。 さらに、我々は PRORP1 と tRNA の複合体モデルを構築し、PRORP1 の基質認識機構が RNase P のそれと異なっていることを報告した[2)]。本研究では、核局在酵素・PRORP2 の結晶化と、PRORP1 および PRORP2 と基質複合体の結晶化を試みた。
【方法・結果】PRORP2 の大腸菌内での発現では、N 末端 9 残基欠損させた PRORP2N9 の遺伝子を調製し、宿主大腸菌として BL21(DE3)を、発現ベクターとして pET-15b ベクターを用い、1 mM IPTG により 16℃で 20 時間発現を誘導した。PRORP2N9 の精製は、ニッケルアフィニティーカラム（COSMOGEL His-Accept）と陰イオン交換カラム(Resource Q)を用いて行った。その後、スロンビンにより His-tag を切断し、ベンズアミジンカラム（Benzamidine Sepahrose 6B）によりスロンビンを除去後、ゲル濾過カラム（Sephacryl S-200）によって精製した。PRORP2 を 15 mg/mL に濃縮後、4℃の条件において結晶化スクリーニングを行ったところ PEG3,350 を含む複数の条件で結晶が生じ、8% Tacsimate (pH 7.0), 18% PEG3,350 の沈殿剤と 1:1 で混合した条件で生じた結晶を用いて放射光施設 SPring-8 で X 線回折実験を行った。その結果、最大分解能 2.7Åの回折データが得られ、その格子定数は a = 73.2 Å, b =68.8 Å, c =121.4 Å, β=90.7° で、空間群は $P2_1$ であった。現在、分子置換法を用いて構造解析を進めるとともに、PRORP1 および PRORP2 と基質複合体の結晶化条件を検討中である。

1. Gobert *et al.*, *Nat. Struc. Mol. Biol.*, **17**, 740-746 (2010).
2. Imai *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **450**, 1541-1546 (2014).

Arabidopshis thaliana, crystal structure, PRORP

講演番号：4C22a05
講演日時、会場：3 月 29 日 09:44～ C 校舎 22 会場

超好熱性アーキア RNase P タンパク質の遺伝子診断への応用に関する研究
Study of the application of archaeal RNase P proteins to a genetic diagnosis.
○宮ノ下 充、中島 崇、角田 佳充、木村 誠（九大院生資環）
○MITSURU MIYANOSHITA, TAKASHI NAKASHIMA, YOSHIMITSU KAKUTA, MAKOTO KIMURA (Kyushu Univ.)

【背景・目的】近年、個人の遺伝子差異に適したテーラーメイド医療を実現するため、一塩基の違いを迅速かつ安価に検出できる遺伝子診断法の開発が待たれている。既に、次世代シークエンサーの開発により、迅速に大量の塩基配列を決定できるようになったが、特殊な装置や酵素などを利用する点で欠点がある。また、核酸間のハイブリッド形成を利用する方法は、簡便・安価であるが、通常の条件ではハイブリッド形成の速度は遅く、一塩基の違いを検出できるほど厳密性がない。しかしながら、生体内において正確なハイブリッド形成は核酸シャペロンの介助に行われていることから、ハイブリッド形成を原理におく遺伝子診断法においても核酸シャペロンを用いることで正確性が高められることが期待されている。我々は、超好熱性アーキア（*Pyrococcus horikoshii*）の前駆体 tRNA プロセシング酵素・リボヌクレアーゼ P (RNase P) が、1 分子の RNA (pRNA) と 5 種のタンパク質 (*Pho*Pop5、*Pho*Rpp21、*Pho*Rpp29、*Pho*Rpp30、*Pho*Rpp38) から構成され、5 種タンパク質のうち *Pho*Rpp38 を除く 4 種のタンパク質が、RNA の 2 本鎖への会合と 1 本鎖への解離反応を促進する RNA シャペロンであることを報告した[1)]。本研究では、超好熱性アーキア RNase P を構成する RNA シャペロンの遺伝子検査への応用の可能性につて検討した。
【方法・結果】まず、RNA シャペロンの存在下または非存在下で、Cy3 もしくは Cy5 で蛍光標識した２本の相補的塩基配列（21 nt）を持つ DNA（Cy3-Oligo と Cy5-Oligo）を室温で混合後、日立蛍光分光光度計により Cy3 を励起波長 λ=535 nm で照射し、λ=590 nm の蛍光強度の減少を測定することにより、アニーリング促進活性を評価した。一方、上記の系に Cy3-Oligo と同じ塩基配列を持つ競合 DNA を加え、λ=590 nm の蛍光強度の回復を測定することにより、解離促進活性を評価した。その結果、いずれの RNA シャペロンも DNA に対して同様に 2 本鎖への会合と 1 本鎖への解離反応を促進する核酸シャペロンであることが分かった。続いて、Cy3-Oligo と Cy5-Oligo を各核酸シャペロンと混合後、一塩基変異を含む未標識の DNA 鎖と含まない DNA 鎖を過剰量添加し、鎖交換反応を比較した。その結果、一塩基変異を含む DNA 鎖を添加した場合、含まない DNA 鎖と比較して鎖交換反応における反応速度の低下が確認できた。次に、ヒト遺伝子 *BRCA1* と *BRCA2* の遺伝子変異を模倣した塩基の欠失/挿入の変異 DNA 鎖を用いて同様の操作を行ったところ、一塩基変異を含む DNA 鎖を用いた場合と同様に鎖交換反応速度の低下を確認することができた。このことから、超好熱性アーキア RNase P を構成する４種の RNA シャペロンについて遺伝子検査への応用の可能性が示唆された。
1. Ishihara *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **76,** 2335-2337 (2012).

Archaea, Ribonuclease P, RNA chaperone

講演番号：4C22a06
講演日時、会場：3 月 29 日 10:05～ C 校舎 22 会場

超好熱性アーキア由来ミスマッチ特異的エンドヌクレアーゼ
A mismatched DNA-specific endonuclease from hyperthermophilic archaea
○織田 宗一郎[1]、西 祐紀[1]、石野 園子[1]、山上 健[1]、上森 隆司[2]、相良 武宏[2]、石野 良純[1]([1]九大院・農、[2]タカラバイオ)
○Soichiro Oda[1], Yuki NIshi[1], Sonoko Ishino[1], Takeshi Yamagami[1], Takashi Uemori[2], Takehiro Sagara[2], Yoshizumi Ishino[1] ([1]Kyushu Univ., [2]Takara Bio Inc.)

【目的】複製時の誤りや紫外線などによって DNA 鎖上に生じた塩基の修復機構としてミスマッチ修復が知られている。バクテリアおよび真核生物においては MutS、MutL およびそれらのホモログが関与する共通の機構が同定されているが、第 3 の生物ドメインであるアーキアにおいては MutS、MutL ホモログを有しないものが多く、ミスマッチ修復についてはこれまで全く不明であった。しかし、我々は超好熱性アーキア *Pyrococcus furiosus* からミスマッチを含む二本鎖 DNA を切断するエンドヌクレアーゼ活性を見つけた。ところがそのオルソログと考えられる、*Pyrococcus abyssi* 由来のタンパク質である PabNucS は、一本鎖 DNA 特異的エンドヌクレアーゼとして、その結晶構造とともに報告されている［1］。しかし、掲載されている PabNucS のヌクレアーゼ活性や結晶構造から、PabNucS の構造と機能を議論するには無理が多く疑問が持たれる。我々は NucS について詳細に理解するために、遺伝学的解析も可能な近縁種、*Thermococcus kodakarensis* の NucS ホモログ（TkoNucS）を調製してその生化学的性質解析を行い、やはりこのタンパク質がミスマッチ切断活性を有するかどうか調べた。また、多くの DNA 複製・修復因子と相互作用する Proliferating Cell Nuclear Antigen（PCNA）との相互作用についても解析した。
【方法】切断活性測定は、ミスマッチを含む二本鎖 DNA を基質として用い、切断産物を非変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離することにより行った。切断位置の特定は、切断産物を変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離することにより行った。DNA との結合力は、EMSA を用いて解析した。PCNA との相互作用は、SPR 法と活性測定によって解析した。
【結果と考察】切断活性測定の結果、TkoNucS はミスマッチを含まない二本鎖 DNA を切断せず、ミスマッチを含む二本鎖 DNA を特異的に切断した。さらに、ミスマッチの種類によって活性の強さに違いが見られた。TkoNucS はミスマッチ部位の近傍で二本鎖とも切断し、その切断位置はミスマッチ塩基の 2 塩基 5′側であり、5′側が 5 塩基突出した切断産物を生じた。TkoNucS はミスマッチを含む二本鎖 DNA に特異的に結合し、結合力は切断活性の強さと相関が見られた。さらに、TkoNucS は *T. kodakarensis* の有する PCNA（TkoPCNA1）と物理的相互作用があり、TkoPCNA1 の存在下で TkoNucS のミスマッチ切断活性は促進された。以上の結果より、超好熱性アーキアは MutS を用いる従来のミスマッチ修復ではなく、NucS を用いる新規の修復機構を有していることが示唆される。
［1］Ren B, *et al. EMBO J.* **28**, 2479-2489 (2009)

archaea, endonuclease, hyperthermophile, DNA repair

講演番号：4C22a07
講演日時、会場：3 月 29 日 10:16～ C 校舎 22 会場

中度好塩性および非好塩性 *Shewanella* 属細菌由来の膜結合 5'-ヌクレオチダーゼの耐塩性の違い
Difference in salt tolerance of membrane-bound 5'-nucleotidases from moderately halophilic and non-halophilic *Shewanella* species

○栗林 貴明[1]、藤井 創太郎[2]、政成 美沙[2]、三本木 至宏[2]、為我井 秀行[3]、山中 優[4]、若井 暁[5] ([1]広島大・生物生産、[2]広島大院・生物圏、[3]日本大・文理、[4]奈良先端大・物質、[5]神戸大院・自然科学)
○ Taka-aki KURIBAYASHI[1], Sotaro FUJII[2], Misa MASANARI[2], Yoshihiro SAMBONGI[2], Hideyuki TAMEGAI[3], Masaru YAMANAKA[4], Satoshi WAKAI[5] ([1]Hiroshima Univ., [2]Hiroshima Graduate School., [3]Nihon Univ., [4]Naist., [5]Kobe Univ.)

【目的】*Shewanella* 属細菌は、淡水、汽水、および海水に広く分布しており、塩耐性を持つものと持たないものが存在している。本研究では、中度好塩性菌 *Shewanella violacea* と非好塩性菌 *Shewanella amazonensis* 由来の膜結合 5'-ヌクレオチダーゼの生化学的特徴を比較し、タンパク質の塩耐性メカニズムを解明することを目的とした。

【方法・結果】*S. violacea* と *S. amazonensis* の菌体をフレンチプレスで破砕し膜画分を得た。膜画分を界面活性剤($C_{12}E_8$)で可溶化後、Hi-Trap Q およびゲル濾過カラムによりそれぞれの 5'-ヌクレオチダーゼを精製した。SDS-PAGE の結果から、精製した 5'-ヌクレオチダーゼはどちらも単量体であることが分かった。5'-ヌクレオチダーゼの N 末端配列解析を行った結果、*S. violacea* 由来のものは XGSDNDD、*S. amazonensis* のものは XMDAD であった。これらの配列はそれぞれのゲノム上にコードされている 5'-ヌクレオチダーゼの成熟部分のアミノ酸配列と一致した。いずれも約 550 残基から成り、70 %のアミノ酸が一致していた。また、MS 測定によって精製した 5'-ヌクレオチダーゼの分子量を求めたところ、*S. violacea* 由来のものは 59,200 Da、*S. amazonensis* 由来のものは 59,600 Da であった。これらの分子量は、それぞれの 5'-ヌクレオチダーゼのアミノ酸一次配列から計算される分子量とほぼ一致した。

精製した 5'-ヌクレオチダーゼを用いて ATPase 活性測定を行った。どちらの 5'-ヌクレオチダーゼも活性に 10 mM $MgCl_2$ を要求し、同様の pH 依存性と 5'-ヌクレオチドに対する基質特異性を持っていた。しかし、活性の温度依存性と塩耐性が異なっていた。*S. violacea* 由来のものは 35 ℃で最大の活性を示したが、*S. amazonensis* 由来のものは 45 ℃で最大の活性を示した。特に大きな差が現れたのが塩耐性で、*S. violacea* 由来のものは 2.5 M KCl、NaCl 存在下でも高い活性を有していたのに対し、*S. amazonensis* 由来のものは 2.5 M KCl、NaCl 存在下では大きく活性が低下していた。

分子シミュレーション解析によると、*S. violacea* 由来のものと *S. amazonensis* 由来のもので塩橋の数と基質結合部位付近のループの長さが異なっており、こうした違いが塩存在下における活性に影響を及ぼしていると考えている。

5'-nucleotidase, salt tolerance, *Shewanella*

講演番号：4C22a08
講演日時、会場：3 月 29 日 10:27～ C 校舎 22 会場

放線菌由来の新規 nucleoside hydrolase の機能解析と核酸医薬生産プロセスへの応用開発

Functional analysis of novel nucleoside hydrolases derived from actinomycetes towards the production of the nucleic acid drug.

○光川 侑輝[1]、日比 慎[2]、松谷 成裕[1]、堀之内 伸行[1]、高橋 里美[2]、小川 順[1]（[1]京大院・農・応用生命、[2]京大院・農・産業微生物）
○Yuuki MITSUKAWA[1], Makoto Hibi[2], Narihiro Matsutani[1], Nobuyuki Horinouchi[1], Satomi Takahashi[2], Jun Ogawa[1] ([1]Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]Ind. Microbiol., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)

【目的】核酸医薬は低分子医薬や抗体医薬に続く次世代の医薬品として期待されており、その合成原料には高いヌクレアーゼ耐性をもつリボース誘導体が利用されている。このうち、ピリミジンヌクレオシド誘導体については効率的合成法が確立されているが、プリンヌクレオシド誘導体に関しては多段階反応が必要なために化学合成が困難である。そこで我々は、微生物酵素を活用したピリミジンヌクレオシド誘導体のプリンヌクレオシド誘導体への変換を試みている。これまでに、*Lactobacillus buchneri* LBK78 由来の nucleoside hydrolase が、2'-*O*-methyl-uridine（2'-OMe-UR）を基質に 2'-*O*-methyl-adenosine（2'-OMe-AR）を生産する糖転移活性を示すことを見いだしているが、同時に 2'-OMe-AR への高い加水分解活性を持つことも確認している。本研究ではより効率的な 2'-OMe-AR 合成を目指し、微生物に新規な nucleoside hydrolase を探索し、得られた酵素の機能解析に取り組んだ。

【方法と結果】2'-OMe-UR に対して分解活性を持つ菌株の探索を行ったところ、２種の放線菌 *Agromyces* sp.および *Austwickia chelonae* において目的の活性を見出した。これらの菌株を対象に nucleoside hydrolase 遺伝子の取得を試み、新規な nucleoside hydrolase であることを示す結果を得た。そこで、プラスミドベクターpQE60 を用いたプラスミドベクター法によって酵素遺伝子を導入した *E. coli* JM109 の形質転換体を作成し、この無細胞抽出液および精製酵素を用いて 2'-OMe-UR をはじめとする種々の基質に対する分解活性を検討した。その結果、本酵素が広範な核酸誘導体に対して分解活性を持ち、また 2'-OMe-UR に対して *Lactobacillus buchneri* LBK78 由来の酵素よりも強い活性を示すことを明らかにした。現在、2'-OMe-AR 生産への応用に向け、詳細な機能解析を進めている。

nucleic acid drug, nucleoside hydrolase, ribosyltransferase

講演番号：4C22a09
講演日時、会場：3 月 29 日 10:38～ C 校舎 22 会場

5-メチルシトシンの脱アミノにより生成する T/G ミスマッチ修復酵素の配列特異性

Sequence specificity of repair endonuclease for T/G mismatches arising by deamination of 5-methylcytosines

大内 優彦[1]、渡辺 文昭[2]、○喜多 恵子[1] ([1]京大院農、[2]三菱レイヨン)
Masahiko OUCHI[1], Fumiaki WATANABE[2], ○Keiko KITA[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Mitsubishi Rayon Co. Ltd.)

DNA には複製の際に取り込まれる 4 種類の塩基のほかに、修飾塩基がしばしば見出される。最も一般的な修飾塩基である 5-メチルシトシン（5mC）は、細菌においては制限修飾系を構成するメチルトランスフェラーゼ（MTase）によって生成するが、生体内で自発的に脱アミノを受けて T に変化することで T/G ミスマッチが生じて突然変異のホットスポットになる。このようにして生じた T/G ミスマッチは、very short patch repair エンドヌクレアーゼ(vsr)が T の 5’側のホスホジエステル結合を加水分解してニックを入れたのち、ヌクレオチド除去修復系によって正常な塩基対に修復される。細菌ゲノム上には vsr ホモログの遺伝子が多数存在しており、大腸菌 K-12 MG1655 株では、CC(A/T)GG を認識する dcm MTase 遺伝子の下流に vsr 遺伝子が見出されている。

私たちは、グラム陽性細菌であるロドコッカス属細菌が生産する vsr が大腸菌由来の vsr とは異なるユニークな触媒活性を示すことをこれまでに見出しており(1)、生体内における vsr の機能を明らかにすることを目指して研究を行っている。そこで、配列特異性に関する知見を得ることを目的として実験を行った。

His-tag を付加した vsr 遺伝子を大腸菌を宿主として発現させて、電気泳動的に均一な酵素標品を調製した。2 本鎖オリゴ DNA を基質として反応を行い、反応生成物をマイクロチップ電気泳動装置で分離して、切断活性を定量的に測定した。DNA との相互作用は、ゲルシフトアッセイと表面プラズモン共鳴法を用いて解析した。

解析の対象とした vsr を生産するロドコッカス属細菌は、GCCGGC を認識する制限修飾系をもつことを私たちは既に明らかにしている(2)。この配列に加え、データベースに登録されているロドコッカス属細菌のゲノム配列から 5mC MTase のホモログを抽出して、それらの推定認識配列中に T/G ミスマッチを導入した基質に作用させた。その結果、ミスマッチ周辺の配列が切断活性に影響を与えること、複数の MTase 認識配列中の T/G ミスマッチに対して高い切断活性を示すことを見出した。当該 vsr の多様な配列認識機構について、変異酵素の解析結果を報告するとともに、MTase 遺伝子との関連性について考察する。

(1)第 35 回日本分子生物学会年会　(2)日本農芸化学会 2006 年度大会

mismatch repair, endonuclease, 5-methylcytosine

講演番号：4C22a10
講演日時、会場：3 月 29 日 10:49～ C 校舎 22 会場

Thermus thermophilus 由来アデニンホスホリボシルトランスフェラーゼホモログの構造・機能解析

Analyses of structure and function of homologs of Adenine phosphoribosyltransferase from *Thermus thermophilus*

○富田 武郎、西山 真（東大生物工学セ）
○Takeo Tomita, Makoto Nishiyama (BRC, The Univ. of Tokyo)

（目的）アデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(APRT)はアデニンと PRPP から AMP への変換を触媒するプリンサルベージ経路の酵素である。*T. thermophilus* のゲノム上には APRT ホモログをコードする *TTC1249* と *TTC1250* が並んで存在しているがそれらの機能は明らかにされていない。一方、我々はこれまでに *T. thermophilus* 由来グルタミン酸脱水素酵素遺伝子 *gdhA* と *gdhB* はゲノム上で並んで存在しており、GdhA は調節サブユニット、GdhB は触媒サブユニットとしてヘテロ複合体を形成し、ロイシンによって活性化を受けることを見出している。このことから TTC1249 と TTC1250 も細胞内でヘテロ複合体を形成し機能している可能性が考えられた。そこで、我々はそれらの個別の機能解析とともに、互いの機能相関についても解析を行った。

（方法と結果）C 末端にヒスタグを融合した TTC1249 と TTC1250 をそれぞれ大腸菌を用いて発現させ、熱処理、Ni^{2+}アフィニティーカラム、ゲルろ過クロマトグラフィーにより精製した。アデニンをはじめとしたプリン塩基を基質として、活性測定を行った結果、TTC1250 はアデニンに対し特異的に活性を示したのに対し、TTC1249 はどの基質に対しても活性を示さなかった。このことから *T. thermophilus* において TTC1250 が APRT の機能を担っているのに対し、TTC1249 は未知の機能を有している可能性が示唆された。組換え TTC1249 溶液は黄色を呈しており、吸収スペクトル測定や LC-MS 分析を行った結果、フラビン様物質が結合していることが示唆された。TTC1250 についてアデニン/PRPP 存在下で結晶を得て、1.98 Å 分解能で結晶構造を決定したところ活性中心にアデニンを結合しており、活性中心残基の配置から既知の APRT と同様の反応機構を有していることが示唆された。一方、TTC1249 についても 2.3 Å 分解能で結晶構造を決定することに成功した。活性中心に相当する部位にはフラビン様物質に相当する電子密度は観察できなかったが、活性中心に相当するポケットにフラビン様基質が結合する可能性が示唆された。このことから TTC1249 は既知の APRT ホモログとは異なりフラビン様物質を補酵素または基質として利用する酵素、あるいはフラビン様物質受容体等として機能している可能性が示唆された。また、TTC1249 と TTC1250 を共発現させ、精製したしても共精製されなかったことから、両者は個別に機能していると考えられ、現在 TTC1249 の機能についても解析を行っている。

Adenine phosphoribosyltransferase, Thermus thermophilus, Crystal structure

講演番号：4C22a11
講演日時、会場：3 月 29 日 11:10～ C 校舎 22 会場

Chlorella kessleri 由来新規ガラクトリパーゼの精製とその特性解析
Purification and characterization of a novel galactolipase from *Chlorella kessleri*
○藤内 恒有[1]、羽城 周平[2]、安枝 寿[2]、杉森 大助[1]([1]福島大・理工、[2]味の素・イノベ研)
○ Kouyu FUJIUCHI[1], Shuhei HASHIRO[2], Hisashi YASUEDA[2], Daisuke SUGIMORI[1]
([1]Fukushima Univ., [2]AJINOMOTO Co. Inc.)

【目的】 Galactolipase (以下 GL と略記)は、グリセロ糖脂質のアシルエステル結合を加水分解して脂肪酸を遊離する加水分解酵素である。近年、糸状菌 *Aspergillus* 由来 GL を用いた小麦粉の物性改良や小麦粉製品の品質向上が検討されている。しかしながら、糸状菌由来酵素は二次代謝産物などの除去を必要とするといった技術的課題も考えられる。そこで本研究では、産業上有用な新規 GL の開発を目指し、食品にも用いられる緑藻 *Chlorella* を対象に GL 活性を調べた結果、緑藻 *Chlorella kessleri* が高い GL 活性を有することを見出した。本発表では、*C. kessleri* 由来新規 GL (chGL) の精製およびその酵素学的特性について報告する。

【実験方法】 *C. kessleri* を 30℃、光照射下で CO_2 バブリングにより 14 日間培養し、遠心分離により藻体を回収した。ビーズ破砕による細胞破砕後、1% (w/v) Triton X-100 で可溶化した後にアセトン沈殿により chGL の粗分画を行った。この粗酵素液から疎水性相互作用および陰イオン交換カラムクロマトグラフィーを用いて目的 chGL の精製を行った。

【結果と考察】 *C. kessleri* の藻体 37.7 g-wet から精製 chGL(比活性 143 U mg-protein^{-1})を 0.557 mg-protein 得た。SDS-PAGE 分析の結果、本酵素は約 53 kDa のポリペプチド鎖からなり、N 末端アミノ酸配列は TALREVATKSEVSEA であることがわかった。本精製酵素を用いて諸特性解析を行った結果、本酵素は pH 6.5、37℃付近で最大活性を示し、弱酸性 pH から中性 pH 域、20℃～40℃付近において活性を示した。chGL は、2 mM EDTA 存在下において活性が強く阻害され、Ca^{2+}存在下で活性が増強されたことから、本酵素は Ca^{2+}要求性酵素であると考えられる。Triton X-100 および Ca^{2+}濃度が酵素活性に与える影響を調べた結果、ジガラクトシルジアシルグリセロール(DGDG)を基質として用いた場合、0.3% (w/v)Triton X-100、2 mM Ca^{2+}存在下において酵素活性が最大となった。この条件において chGL の基質特異性試験を行った結果、DGDG に対する活性が最も高く、モノガラクトシルジアシルグリセロール(MGDG)、スルホキノボシルジアシルグリセロール(SQDG)にはそれぞれ 30%程度の活性を示すことがわかった。さらに、リン脂質およびトリグリセリドにはほとんど作用しないことから、本酵素はグリセロ糖脂質に対する特異性が高い酵素であることが明らかとなった。以上の結果より、本酵素は新規 GL と結論づけた。

Chlorella, galactolipase, characterization

講演番号：4C22a12
講演日時、会場：3 月 29 日 11:21～ C 校舎 22 会場

Chlorella 由来新規ガラクトリパーゼの遺伝子取得とその応用

Cloning and characterization of cDNA encoding *Chlorella* galactolipase and its application

○羽城 周平[1]、藤内 恒有[2]、杉森 大助[2]、安枝 寿[1]([1]味の素・イノベ研、[2]福島大・理工)
○ Shuhei HASHIRO[1], Tsuneari FUJIUCHI[2], Daisuke SUGIMORI[2], Hisashi YASUEDA[1] ([1]AJINOMOTO Co. Inc., [2]Fukushima Univ.)

【背景と目的】

BDF 生産用として微細藻類が着目されているが、我々は、藻類由来の脂質を分解する手法として、培養した藻体を中程度の温度(40-50℃程度)にて加温することで多量の脂肪酸が細胞内に生成することを見出している。脂肪酸生成は、細胞内に蓄積された油脂や各種細胞内小器官のリン脂質や糖脂質の分解によるものと推定されたため内在性リパーゼの関与が示唆された。そこで、BDF 生産の効率化のために、藻体中の糖脂質分解酵素すなわちガラクトリパーゼ(GL)に着目し、その構造解析及び特性について検討を行った。今回は、モデル緑藻 *Chlorella kessleri* 株由来のジガラクトシルジアシルグリセロール(DGDG)分解酵素 chGL を対象に解析したので、その応用例も併せて報告したい。

【方法と結果】

C. kessleri のドラフトゲノム配列情報を取得し、また単離精製された chGL のアミノ酸配列情報をもとに、構築した cDNA ライブラリーより chGL-cDNA を取得した。その配列情報から、本 chGL はプロ領域として 34 アミノ酸残基を有し、そして成熟型 chGL は 476 アミノ酸残基(約 53 kDa)からなることが分かった。また、次世代シーケンサを用いた *de novo* アセンブリ解析から chGL 遺伝子は全長約 5.6 kbp で 10 箇所のイントロン領域を有する事も判明した。なお、本 chGL に対して、GL 活性があるとされる既知の、*Aspergillus* または *Chlamydomonas* 由来の酵素とのアミノ酸配列比較を行った結果、相同性は各々約 12%、約 20%と、いずれも極めて低いことから、本 chGL は新規な GL 酵素であることが示された。次に、取得した chGL-cDNA を可溶化タグ(TF)融合型発現ベクターへ搭載し、*E. coli* にて発現させたところ、産生した TF-chGL 融合タンパク質およびそこから切り出された chGL 部分は各々予測された分子量であることがわかり、また、それらを含む菌体の粗酵素液中には糖脂質分解活性が見出された。

一方、本 chGL の応用面として、その食品素材の物性改質能力についても簡易評価を行ったところ、chGL 添加の小麦粉生地サンプルでは、生地の柔らかさが維持される効果が示唆された。

今回、*Chlorella* 株で見出された chGL は、糖脂質を葉緑体の主要脂質として含有する藻類において重要な働きを担うと予想される新規酵素であり、生体内の糖脂質分解機構の解明につながることが期待される。他方、chGL 酵素自体は小麦粉などを含めて食品素材の物性改質に利用できる可能性も示唆された。

Chlorella, galactolipase, cDNA-cloning

講演番号：4C22a13
講演日時、会場：3 月 29 日 11:32～ C 校舎 22 会場

組換え大腸菌を用いた *Candida antarctica* lipase B の菌体外分泌発現系の構築

Construction of extracellular secretion expression system of *Candida antarctica* lipase B using recombinant *Escherichia coli*

○氏家 彩奈、中野 秀雄、岩崎 雄吾 (名大農)
○Ayana UJIIE, Hideo NAKANO, Yugo IWASAKI (Nagoya Univ.)

【目的】

担子菌類酵母 *Candida antarctica* 由来 lipase B (CALB) は優れた立体選択性を持つため医薬中間体等、多くの光学活性物質の製造に用いられる非常に重要な酵素である。CALB は有機溶媒中での反応特性が他の多くのリパーゼと異なるなど、酵素科学的にも非常に興味深い性質を示す。CALB の蛋白工学的手法による高機能化や機能解析の基盤となるのは、組換え大腸菌による効率的な発現系の構築と精製法の確立である。組換え菌を用いた CALB の発現はいくつかの報告があり、それらは *Pichia pastoris, Saccharomyces cerevisiae* などの組換え酵母を使用したものと *Aspergillus oryzae* のような組換え糸状菌を使用したもの、組換え大腸菌を使用したものに大別される。組換え酵母や組換え糸状菌による CALB の発現は菌体外分泌であるのに対し、現在 CALB の大腸菌による発現は細胞内であり、細胞外に分泌された例は少ない。CALB の蛋白工学が目的であれば、組換え大腸菌は第一の選択肢である。そこで本研究では CALB の組換え大腸菌での菌体外発現系の構築を目的とした。

【方法・結果】

大腸菌に適したコドンに変換した *CALB* 遺伝子配列に *pelB* signal 配列を付加し、pET システムを用いて発現実験を行った。その結果、CALB の培養上清中での発現が確認された。続いて、CALB の活性中心である 105 番目のセリン基をアラニン基に置換した変異型 CALB プラスミドを構築し、同様に発現実験を行ったところ培養上清における発現が確認された。これより CALB はその触媒活性に関わらず、菌体外に分泌されることが示唆された。

次に発現量を上げるため培地の検討を行った。LB 培地、2xYT 培地、Super broth、SOB 培地、Terrific broth の 5 種類の培地を用いて発現量の比較を行った。その結果、Terrific broth を用いた場合、発現量が最も多くなった。そこで Terrific broth を用いて CALB 発現後、培養上清を限外ろ過により濃縮し、Resourse Q、HiPrep butyl FF により精製した。45 mL の培養上清から約 6 mg もの精製 CALB を調製することに成功した。また、精製 CALB の比活性から培養上清中の発現量を算出すると、1 L 当たり 500 mg 程度と見積もられた。

以上より、組換え大腸菌による CALB の菌体外分泌発現系の構築と精製法の確立に成功した。

Candida antarctica lipase B, extracellular production, recombinant *Escherichia coli*

講演番号：4C22a14
講演日時、会場：3 月 29 日 11:43～ C 校舎 22 会場

カイコで発現させたヒトアセチル CoA カルボキシラーゼ 1 の解析

Analysis of human acetyl-CoA carboxylase 1 expressed in silkworms.

牧島 悠[1]、○加藤 竜也[1,2,3]、パク サンジョウ[4]、タージック アンドレ[4]、朴 龍洙[1,2,3] ([1]静大農・応生化、[2]静大・創科技院、[3]静大・グリーン研、[4]メイヨクリニック)
Yu Makishima[1], ○Tatsuya Kato[1,2,3], Sungjo Park[4], Andre Terzic[4], Enoch Y. Park[1,2,3] ([1]Dep. Appl. Biol. Cem., Fac. Agr., Shizuoka Univ., [2]GSST. Shizuoka Univ., [3]RIGST, Shizuoka Univ., [4]Ctr. Regenetative Med., Mayo clinic)

【目的】食生活の洋風化や外食産業の発展により、肥満や糖尿病、メタボリックシンドロームなどに代表される生活習慣病の蔓延化が、近年大きな社会問題となっている。Acetyl-CoA carboxylase (ACC)は、アセチル CoA からマロニル CoA の合成を触媒するビオチン依存性酵素であり、生体内の脂肪酸代謝に深く関与している。ヒトには Acetyl-CoA carboxylase1 (ACC1)及び Acetyl-CoA carboxylase2 (ACC2)が存在し、脂肪酸の代謝経路の初反応を触媒したり、長鎖脂肪酸の β 酸化を調節したりすることで脂肪酸代謝経路全体を高度に制御している。この ACC の生体内における活性は、クエン酸やリン酸化を含む複数の要因によって調節されていることが知られているが、詳細な解析は行われていない。以前に本研究室において、ヒト ACC2 はカイコを用いて活性を有した状態で組換え体として精製されている[1]。本研究では、大腸菌とカイコ *Bombyx mori* のシャトルベクターであるカイコ発現系 (BmNPV バクミド-カイコ発現系)を用いて、活性を有する ACC1 の発現と解析を行い、得られた結果を報告する。
【方法】ヒト ACC1 遺伝子に FLAG タグ遺伝子を付加し、PCR で増幅した。PCR 産物を BmNPV バクミドに挿入し、組換え BmNPV バクミドを作製した。構築したバクミドをカイコ幼虫及び蛹に注射し、カイコ体内で目的タンパク質を発現させた。回収したカイコを破砕し、抗 FLAG M2 抗体アフィニティーゲルを用いて精製を行った。精製後のタンパク質をウエスタンブロットおよび活性測定に供することで、組換えヒト ACC1 の機能を確認した。
【結果】ウエスタンブロッティングにより、カイコ脂肪体からヒト ACC1 (250 kDa)の発現を確認した。精製後の CBB 染色の結果、適切な位置にシングルバンドが検出され、カイコ一頭あたりから 800-900 μg の目的タンパク質が得られた。精製後の ACC1 はカルボキシラーゼ活性による ATP の脱リン酸化反応 (1.2 mU/mg)を示した。また、抗ビオチン抗体および抗ホスホセリン抗体を用いてウエスタンブロットを行ったところ特異的なバンドが検出され、ビオチン化及びリン酸化が確認された。BmNPV バクミドシステムを用いたヒト ACC1 の発現は、活性型ヒト ACC1 にとって必須な翻訳後のビオチン化とリン酸化を実証し、構造的および機能的解析のための信頼性のあるヒト ACC1 の発現と創薬基盤を提供するものである。

1.Hwang et al., Appl. Microbial. Biotechnol. 98(16), 6973-6982.

acetyl-CoA carboxylase, silkworms, post-translational modification

講演番号：4C22p02
講演日時、会場：3 月 29 日 14:11～ C 校舎 22 会場

MMLV 逆転写酵素の RNase H ドメインの調製と性状解析

Preparation and characterization of the RNase H domain of MMLV reverse transcriptase

○西村 耕作[1]、横川 貫太[1]、深津 浩佑[2]、久世 郁実[2]、久好 哲郎[1]、小西 篤[1]、三上 文三[1]、兒島 憲二[1]、保川 清[1] ([1]京大院・農、[2]京大・農)
○Kosaku NISHIMURA[1], Kanta YOKOKAWA[1], Kosuke FUKATSU[2], Ikumi KUZE[2], Tetsuro HISAYOSHI[1], Atsushi KONISHI[1], Bunzo MIKAMI[1], Kenji KOJIMA[1], Kiyoshi YASUKAWA[1] ([1]Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]Fac. Agric., Kyoto Univ.)

【目的】モロニーマウス白血病ウイルス（MMLV）逆転写酵素（RT）は分子量 75,000 のモノマーで、5 個のドメイン（Fingers、Palm、Thumb、Connection、RNase H）から成り、DNA ポリメラーゼ活性と RNase H 活性をもつ。両活性の活性部位はそれぞれ Palm および RNase H ドメインに存在する。MMLV RT[1] およびヒト免疫不全ウイルス 1 型（HIV-1）RT[2] の耐熱性は、RNase H 活性の触媒残基である Asp に変異を導入して RNase H 活性を消失させることにより向上する。しかし、その機構は明らかではない。本研究では、本機構を調べるため、MMLV RT の RNase H ドメインを調製し、性状解析を行った。
【方法】①RNase H ドメイン（I498－L671）の調製：完全長のもの（WT）および基質結合部位を含む I593－L603 あるいは G595－T605 が欠失したもの（それぞれ ΔC1、ΔC2）に、Strep-tag（WSHPQFEK）と $(His)_6$ をそれぞれ N および C 末端に付加させたものを大腸菌で発現させ、菌体から精製した。②蛍光基質を用いた RNase H 活性の測定：3’-fluorescein 修飾 18 塩基の RNA（5’-GAUCUGAGCCUGGGAGCU-3’）と 5’-Dabcyl 修飾 18 塩基の DNA（5’-AGCTCCCAGGCTCAGATC-3’）から成る RNA/DNA 二本鎖を基質として、37℃で 45 分間反応を行い、反応停止後、490 nm で励起したときの 515 nm の蛍光強度を解析した。③放射性基質を用いた RNase H 活性の測定：5’末端が ^{32}P で標識された 25 塩基の RNA（5’-AUGUAUAGCCCUACCAGCAUCCTGG-3’）と未標識 25 塩基の相補的 DNA から成る RNA/DNA 二本鎖を基質として 37℃で反応を行い、経時的にサンプルを採取し、反応停止後、変性ポリアクリルアミド電気泳動にかけ、切断された RNA 鎖のパターンを解析した。
【結果】①蛍光基質を用いた RNase H 活性の測定：WT は活性を示したが、ΔC1 と ΔC2 は活性を示さなかった。蛍光増加量が 3.4 μM WT と 5 nM HIV-1 RT（全長）で同程度であったことから、RNase H ドメイン単独の本活性は RT のそれよりも著しく低いことが示された。②放射性基質を用いた RNase H 活性の測定：WT では鎖長が異なる 16－24 塩基のバンドが同程度の強度で検出された。これは、本基質に MMLV RT（全長）を作用させたとき、17、20 塩基のバンドが強く検出されたことと異なった。
【考察】単独発現させた RNase H ドメインは DNA 合成活性の活性部位をもたないために、基質との親和性が低く、切断部位が不特定になったと考えられる。現在、放射性基質を用いて切断パターンの解析と速度論的解析を行っている。さらに、WT、ΔC1、ΔC2 の結晶化を試みている。

1. G.F. Gerard, R.J., Potter, M.D. Smith, K. Rosenthal et al. *Nucleic Acids Res.* **30**, 3118-3129 (2002)
2. K. Nishimura, M. Shinomura, A. Konishi, K. Yasukawa, K. *Biotechnol. Lett.* **35**, 2165-2175 (2013)

MMLV, RNase H, RT

講演番号：4C22p03
講演日時、会場：3 月 29 日 14:22～ C 校舎 22 会場

RNase H 触媒部位から離れた部位へのアミノ酸変異による MMLV 逆転写酵素の耐熱化と RNase H 活性の消失
Amino acid substitutions away from the RNase H catalytic site increase the thermal stability of MMLV reverse transcriptase through RNase H inactivation

○久好 哲郎[1]、小西 篤[1]、横川 貫太[1]、Barrioluengo Veronica[2]、Menendez-Arias Luis[2]、保川 清[1]（[1]京大院・農、[2]Centro de Biologiacute Molecular “Severo Ochoa”）
○ Tetsuro Hisayoshi[1], Atsushi Konishi[1], Kanta Yokokawa[1], Veronica Barrioluengo[2], Luis Menendez-Arias[2], Kiyoshi Yasukawa[1] ([1]Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]Centro de Biologiacute Molecular "Severo Ochoa")

【目的】モロニーマウス白血病ウイルス逆転写酵素（MMLV RT）は、高い触媒活性と転写の正確性から cDNA 合成に用いられている。cDNA 合成は、鋳型 RNA の二次構造やプライマーの非特異的結合を解消するため高温で行うことが望ましい。しかし、MMLV RT の耐熱性は低く、その向上が求められている。鋳型プライマー（T/P）は RT の耐熱性を向上させることが知られている。我々はこれまでに、部位特異的変異導入により、MMLV RT の T/P との結合部位に正電荷を導入した変異体を作製し、三つの耐熱化変異（E286→R, E302→K, L435→R）を見いだした。[1)] しかし、その耐熱化機構は明らかではない。本研究では、これらの変異による MMLV RT の耐熱化機構を調べた。
【方法】①酵素の調製：野生型酵素（WT）と 5 種類の耐熱型変異体（E286R, E302K, L435R, D524A, E286R/E302K/L435R/D524A（MM4））を大腸菌で発現させ、菌体から精製した。②RT-T/P 複合体の解離定数（K_d）の決定： 31-nt の DNA または RNA と 5’末端が ^{32}P で標識された 21-nt の DNA から成る T/P（2-40 nM）と MMLV RT（6 nM）の混合液に、Mg^{2+}、未標識 T/P（終濃度 20 μM）を加え、37℃で 1 塩基伸長反応を開始させた。経時的に反応液を採取し、ポリアクリルアミド電気泳動により 1 塩基伸長された ^{32}P 標識プライマーの濃度を求めた。③RNase H 活性の測定：鋳型 RNA の 5’末端が ^{32}P で標識された 4 種類の T/P のいずれかと MMLV RT を混合して切断反応を開始させ、②と同様の操作を行い、切断された RNA 鎖のパターンを解析した。
【結果】①スペクトルの比較：WT と変異体の UV, CD, 蛍光スペクトルの形状に差は見られなかった。このことから、二次構造と Tyr および Trp 残基近傍の環境に変化はないと考えられた。②T/P との親和力：WT あるいは変異体と T/P との複合体の K_d は 2.9～6.5 nM であり、同程度であった。このことから、耐熱化変異は T/P との親和力に影響を与えないと考えられた。③RNase H 活性：WT では反応開始 15 秒後で RNA 鎖が分解されたのに対し、変異体では 40 分後でも分解されなかった。このことから、耐熱化変異は RNase H 活性を消失させると考えられた。
【考察】本変異による MMLV RT の耐熱化機構は、T/P との親和力の向上によるものではなく、三次構造の変化により RT 自身の安定性が向上したものと思われる。また、RNase H 活性の消失は、三次構造の変化により T/P が RNase H 活性部位に結合できなくなったからであると考えられる。[2)]

1. K. Yasukawa, M. Mizuno, A. Konishi, K. Inouye: *J. Biotechnol.* **150**: 299-306 (2010)
2. A. Konishi, T. Hisayoshi, K. Yokokawa et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **454**: 269-274 (2014)

Moloney murine leukemia virus, reverse transcriptase, RNase H activity

講演番号：4C22p04
講演日時、会場：3 月 29 日 14:33～ C 校舎 22 会場

ヘリカーゼを用いた高感度核酸検出技術の開発

Enhancing effect of helicase on the reverse transcription and PCR specificity

○藤原 綾子[1]、横山 高広[2]、保川 清[2]、藤原 伸介[1] ([1]関西学院大院理工、[2]京都大院農)
○ AYAKO FUJIWARA[1], TAKAHIRO YOKOYAMA[2], KIYOSHI YASUKAWA[2], SHINSUKE FUJIWARA[1] ([1]Grad. Sch. Sci. Technol., Kwansei Gakuin Univ., [2]Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)

ヘリカーゼは ATP 加水分解エネルギーを用いて DNA/RNA の塩基間の水素結合を解消する酵素であり、DNA 複製、スプライシング、転写、翻訳、リボソーム生合成など様々な生命活動に寄与している。ヘリカーゼは核酸の高次構造をほどくという特徴から、RNA、DNA 合成に影響を与えると考えられる。現在、RT-PCR、PCR は遺伝子診断、遺伝子工学実験、核酸を標的とした病原性微生物の検出等に有用とされている手法である。しかしながら、RT-PCR では逆転写反応時(40℃)での RNA の高次構造形成による cDNA 合成阻害、PCR ではランダムアニールによる誤増幅という問題がある。これまでに逆転写反応時に RNA と cDNA を分離させ、反応を効率化させたり、ホットスタート法を用いて PCR 時にランダムアニールを防ぐ例が報告されている。本研究では高感度核酸検出技術の開発を目的とし、超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* が有する様々なヘリカーゼを用いた逆転写反応及び PCR 反応への影響を検討した。

SF2 ヘリカーゼである TK0306、TK0566、TK0928 を精製し、ssRNA 存在下で ATPase 活性を測定した。TK0566、TK0928 の反応至適温度は 80, 90℃であったのに対し、低温誘導型 RNA ヘリカーゼである TK0306 は 50℃であった。TK0306 が低温で活性を有すことから、TK0306 の逆転写反応へ及ぼす影響を検討した。反応には嘔吐型セレウス菌のセレウリド合成酵素をコードする *cesA* の mRNA を鋳型とし、レトロウイルス由来の逆転写酵素 MMLV-RT を用いた。その結果、TK0306 の添加時に逆転写反応の促進効果が見られた。次に 3 種類の SF2 ヘリカーゼの PCR 反応特異性への影響を検討するため、様々な鋳型 DNA を用いて PCR を行った。高次構造を形成しやすい *T. kodakarensis* 由来の合成した 16S rDNA を鋳型とし、酵素に KOD plus ポリメラーゼを用いた結果、TK0566 を添加することで PCR 時のノイズバンドが消失した。TK0306 及び TK0928 の添加では顕著な変化は見られなかった。また過剰量の TK0566 を添加すると、目的とするバンドが消失した。TK0566 は PCR 反応時にミスアニールしたプライマーと鋳型 DNA の二本鎖をアンワインドしているが、過剰量存在するとプライマーの標的配列へのアニールをも阻止すると考えられる。次に高 GC 含量の 緑膿菌 *Pseudomonas aeruginosa* 由来の DNA（エキソトキシン A をコードする *Pa-toxA*）を鋳型にして検証した。TK0566 非添加時にはアニーリング温度を上昇させても誤増幅は低減されなかったが、TK0566 を添加することで誤増幅が低減された。このことから PCR 時の特異性を顕在化する場合、TK0566 の添加はアニーリング時の温度上昇よりも効果的と思われる。以上のことから、TK0306 は高次構造をとる RNA をほどき逆転写反応効率を上昇させ、TK0566 は PCR のノイズを低減させる効果があると考えられる。

helicase, unwinding, reverse transcription

講演番号：4C22p05
講演日時、会場：3 月 29 日 14:44～ C 校舎 22 会場

封入体を形成する酵素のランダム変異による活性型酵素としての発現

Heterologous expression of inclusion body as active enzymes by random mutagenesis

○松井 大亮[1,2]、浅野 泰久[1,2] ([1]富山県大工・生工研セ、[2]JST ERATO)
○Daisuke MATSUI[1,2], Yasuhisa Asano[1,2] ([1]Toyama Pref. Univ., [2]JST ERATO)

【目的】大腸菌で異種のタンパク質を発現させた場合、SDS-PAGE で不溶性画分に観察され、本来の酵素活性が見られないことが多く、この点が異種発現における最大の問題の一つである。活性型酵素として大腸菌で発現させる手法として、従来からシャペロンとの共発現や可溶化タグとの融合、またリフォールディングなどが検討されている。我々は、変異導入による植物 *Manihot esculenta* 由来ヒドロキシニトリルリアーゼ[1)]や海洋性細菌 *Marinomonas mediterranea* 由来 L-リシンε-酸化酵素[2)]の大腸菌での異種発現に成功してきた。本研究では、大腸菌で封入体を形成する *Thermus thermophilus* HB8 由来の酵素を用いて、変異導入による活性型酵素としての発現系の構築を検討した。
【方法】*T. thermophilus* HB8 のプラスミドコレクション[3)]で大腸菌 BL21 (DE3)を形質転換し、得られたコロニーを培養後破砕し、SDS-PAGE で発現確認を行った。活性型酵素として大腸菌で発現させるスクリーニング方法として、フレオマイシン耐性遺伝子を 3'末端に融合した目的酵素遺伝子で、ランダム突然変異用コンピテントセル大腸菌 XL1-Red を形質転換し、ランダム変異を誘発した。得られた変異型酵素ライブラリーで、大腸菌 BL21(DE3)を形質転換し、フレオマイシン添加培地でスクリーニングした。SDS-PAGE や活性測定で、活性型をもつ酵素としての発現の確認を行った。
【結果と考察】大腸菌の異種発現系で、*T. thermophilus* HB8 由来の 85 種の酵素が SDS-PAGE で不溶性画分のみに確認された。3-ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼやトレオニンアルドラーゼなど、封入体を形成した酵素遺伝子にランダム変異を入れ、フレオマイシン添加培地でスクリーニングし、粗酵素液中に活性を有する形質転換体を得ることに成功した。その粗酵素液から精製した変異型酵素とリフォールディングで得られた野生型酵素の CD スペクトルに違いが見られ、アミノ酸置換が酵素の機能的な発現に影響することが明らかとなった。変異導入による活性型酵素として大腸菌で発現させる手法は、いくつかの酵素において、異種発現系の構築法の一つとして利用可能であることが示唆された。
【参考文献】

1) Y. Asano, M. Dadashipour, M. Yamazaki, N. Doi, and H. Komeda, Protein Eng. Des. Sel., **24**, 607-616 (2011).
2) Y. Asano, and D. Matsui, JP2013-209828.
3) S. Yokoyama et al., Nature Struct. Biol., **7**, 943-945 (2000).

heterologous expression, inclusion body, random mutagenesis

講演番号：4C22p06
講演日時、会場：3 月 29 日 15:05～ C 校舎 22 会場

回転磁場を用いた酵素・磁性粒子複合体の活性の促進

Increase of activity of enzyme-magnetic particle hybrids using a rotational magnetic field

○平田 圭亮、水木 徹、立原 直人、長岡 豊、森本 久雄、前川 透（東洋大）
○Keisuke HIRATA, Toru MIZUKI, Naoto TACHIHARA, Yutaka NAGAOKA, Hisao MORIMOTO, Toru MAEKAWA (Toyo Univ.)

近年、研究の分野を越えた学際的な研究が盛んに行われており、バイオサイエンスとナノテクノロジーを組み合わせた融合研究分野においても生体材料と微小粒子を用いた研究分野では、酵素を粒子と吸着させると酵素の安定性が上がる [1)]、DNA を粒子と吸着させると粒子の拡散性が上がる [2)] 等の様々な興味深い研究が多数報告されている。一方、ナノテクノロジー分野の研究において、磁性粒子分散液に回転磁場を印加することで粒子が棒状のクラスターを形成し回転することが報告されている [3)]。

我々は磁性ナノ粒子と回転磁場を用い酵素活性を上昇させることを試みた。磁性粒子表面に加水分解酵素（α-amylase、chitinase、lipase）を固定化することで複合体を作製し、回転磁場が複合体の酵素活性に及ぼす影響を解析した。結果、すべての酵素において酵素活性の上昇が確認された [4),5)]。低い周波数域においては回転磁場の周波数の上昇とともに酵素活性が上昇していくことが確認された。しかしながら、高い周波数の回転磁場中においては無磁場よりは活性が上昇しているものの、周波数の上昇とともに活性の上昇率が減少していく現象が確認された。これには回転磁場中における磁性粒子のクラスター構造の変化が大きく関与していると考えた。

本研究では回転磁場中で磁性粒子が形成するクラスターの構造が酵素・磁性粒子複合体の活性に及ぼす影響の解析を行った。反応液中に含まれる粒子数を変化させ、回転磁場が酵素・磁性粒子複合体の活性に与える影響を解析するとともに磁性粒子の形成するクラスターの構造を観察した。各周波数における磁性粒子のクラスター構造は高速度カメラを接続した顕微鏡を用いて観察した。

一方で加水分解酵素以外の酵素についても同様に回転磁場が及ぼす影響を解析すべく研究を進めている。

1) S. G. Valerio et al., Carbohydrate Polymers, 92(1), 462-468, (2013)
2) H. Einaga et al., Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 455, 179-184, (2014)
3) H. Morimoto et al., Physical Review E, 78, 021403, (2008)
4) T. Mizuki et al., Biochemical and Biophysical Research Communications, 393(4), 779-782, (2010)
5) T. Mizuki et al., PLoS One, 8(6), e66528, (2013)

enzyme activity, hydrolase, magnetic particle

講演番号：4C22p07
講演日時、会場：3 月 29 日 15:16～ C 校舎 22 会場

*Streptomyces griseoloalbus*SN-22 株由来エラスターゼ様酵素遺伝子のクローニングと発現
Cloning and heterologous expression of elastase-like protease gene from *Streptomyces griseoloalbus* strain SN-22

○浴野 圭輔[1]、尾山 廣[2]、岡 拓二[1]、野村 善幸[1]、新 隆志[1] ([1]崇城大 応微工、[2]摂南大学 理工 生命科学)
○Keisuke Ekino[1], Hiroshi Oyama[2], Takuji Oka[1], Yoshiyuki Nomura[1], Takashi Shin[1] ([1]Sojo Univ., [2]Setsunan Univ.)

【目的】我々の研究室では、過去に微生物由来の新規なエラスターゼ様酵素の探索を行い、*Streptomyces griseoloalbus* SN-22 株の分離に成功している。本酵素は分子量約 24 kDa のセリン酵素であり、還元アルキル化されたリゾチームを基質として反応した場合、Ala と Val の C 末端側を加水分解する。また、酸化インシュリン B 鎖を基質として反応した場合、12 番目の Val と 23 番目の Gly の C 末端側を特異的に加水分解し、その加水分解特性を他のエラスターゼと比較した結果、既知のそれらとは異なっていることが明らかとなっている。そこで我々は本酵素を生産菌が分離された地名に因んで masikinolysin と呼称している。本研究ではこの SN-22 株由来のエラスターゼ様酵素である masikinolysin 遺伝子のクローニングと大腸菌による遺伝子発現系の構築を目的とした。
【方法および結果】まず、精製酵素の N 末端および、内部アミノ酸配列について配列分析を行った。得られたアミノ酸配列を基に合成したプライマーを用いて SN-22 のゲノム DNA を鋳型として PCR を行い、部分遺伝子を取得した。この遺伝子断片をプローブとしてコロニーハイブリダイゼーション、さらにインバース PCR により本酵素の構造遺伝子を取得した。その結果、本酵素は 36 アミノ酸残基のシグナル配列を含む約 35 kDa の前駆体タンパク質をして発現され、24 kDa の成熟型酵素へプロセシングされるものと考察した。また、セリンプロテアーゼの触媒残基であるアミノ酸 His(40 番目)、Asp(90 番目)、Ser(168 番目)は保存されていた。相同性検索の結果、本酵素は Trypsin-like serine proteases superfamily に属し、V8-like Glu-specific endopeptidase の保存領域が存在することが明らかとなった。
つぎに本遺伝子の大腸菌による発現を行った。ベクターに pET32b、宿主に BL21(DE3)および Rosetta-gami を用いた。構造遺伝子の全長である prepro 型タンパク質、シグナル配列を除いた pro 型タンパク質および成熟型タンパク質をコードする遺伝子領域それぞれの発現を試みた。その結果、ほとんどの発現が確認できなかった。ただ、Trx タンパク質との融合型での発現においてのみ SDS-PAGE で発現を確認することができた。しかしながら、酵素活性は確認できなかったため、現在発現系の再検討を行っている。

elastase, protease, cloning

講演番号：4C22p08
講演日時、会場：3 月 29 日 15:27～ C 校舎 22 会場

微生物による第 4 級アンモニウム化合物の分解（第 14 報）：γ-ブチロベタイニル CoA 合成酵素遺伝子のクローニングとリコンビナント酵素の諸性質検討

Microbial degradation of quaternary ammonium compounds (No.14) : Cloning and characterization of γ-butyrobetainyl CoA synthetase (ADP-forming)

○藤光 洋志[1]、田窪 沙也加[2]、松本 彬[2]、有馬 二朗[2]、森 信寛[2]([1]鳥取大院連農、[2]鳥取大農)
○Hiroshi Fujimitsu[1], Sayaka Takubo[2], Akira Matsumoto[2], Jiro Arima[2], Nobuhiro Mori[2] ([1]Tottori Univ. The United Graduate School of Agri. Sci., [2]Tottori Univ. Fac. of Agri.)

【背景・目的】本研究グループでは、コリンや L-カルニチンなどの第 4 級アンモニウム化合物の微生物での分解経路・分解酵素の研究を行っている。第 4 級アンモニウム化合物のうち、L-カルニチンは真核生物において、脂質代謝に必須の物質である。近年は、サプリメントに利用されるなど、その需要は拡大している。L-カルニチンの主な製造法は、*Agrobacterium* 属細菌によるγ-ブチロベタインの水酸化反応である。L-カルニチン製造に関する特許によると、γ-ブチロベタインは脂肪酸のβ酸化類似の酵素反応を経て L-カルニチンに代謝されると推定されているが、これらの酵素に関する報告は少ない。そこで我々は、土壌分離菌、*Agrobacterium* sp. 525a 株を用い代謝の初発酵素と考えられるγ-ブチロベタイニル CoA 合成酵素を精製し、その諸性質の検討を行った(*)。しかし完全精製には至らず、収量もわずかであったため、反応速度論的パラメーター等の算出が困難であった。そこで本発表では、本酵素遺伝子のクローニングおよびリコンビナント酵素の諸性質検討の結果を報告する。

【方法】野生株由来の部分精製酵素を Native-PAGE に供した後、5mm 刻みにゲルを回収し、活性を示したゲル中のタンパク質を N-末端アミノ酸配列解析に供した。この得られた配列を元に InversePCR により本酵素をコードする遺伝子の配列を解析した。リコンビナント酵素の活性測定にはヒドロキサム酸法およびピルビン酸キナーゼ、乳酸脱水素酵素を用いた酵素カップリング法を併用した。

【結果】N-末端アミノ酸配列解析を行った結果、23 残基の N-末端アミノ酸配列が決定された。Inverse PCR の結果、2,082 bp の ORF からなる本酵素遺伝子配列データが得られた。塩基配列を BLAST 検索にかけた結果、*Agrobacaterium* 属に近い *Sinorhizobium* 属や *Ensifer* 属由来のアシル CoA 合成酵素と推定されている ORF が報告されていたが、全て推定上の酵素であり機能は不明点が多いと考えられた。リコンビナント酵素の活性はヒドロキサム酸法および酵素カップリング法の両方で検出できた。現在リコンビナント酵素を用い、諸性質の検討を行っている。

(*) 2014 年度日本農芸化学大会（東京）講演番号：3D01a16

L-carnitine, ß-oxidation, γ-butyrobetaine-CoA ligase (ADP-forming)

講演番号：4C22p09
講演日時、会場：3 月 29 日 15:38～ C 校舎 22 会場

希少糖生産酵素 *Pseudomonas cichorii* 由来 D-タガトース 3-エピメラーゼの変異酵素を用いた糖アルコールおよびデオキシ希少糖との複合体構造解析

Crystal structures of *Pseudomonas cichorii* D-tagatose 3- epimerase mutant forms in complexes with sugar alcohols and deoxy rare sugars

○吉田 裕美[1]、吉原 明秀[2]、石井 知彦[3]、何森 健[2]、神鳥 成弘[1]([1]香川大・総合生命研究セ、[2]香川大・希少糖研究セ、[3]香川大・工学部)
○Hiromi YOSHIDA[1], Akihide YOSHIHARA[2], Tomohiko ISHII[3], Ken IZUMORI[2], Shigehiro KAMITORI[1] ([1]Life Science Research Center, Kagawa Univ., [2]Rare Sugar Research Center, Kagawa Univ., [3]Faculty of Engineering, Kagawa Univ.)

【目的】*Pseudomonas cichorii* D-タガトース 3-エピメラーゼ(D-TE)は、ケトヘキソースの3位をエピマー化する酵素であり、D-タガトースとD-ソルボース間のエピマー化だけではなく、D-フルクトースから希少糖D-プシコースを生産できる酵素として実用化されている。演者らは、D-TEのX線結晶解析を行い、その3次元構造について既に報告しているが、本酵素は幅広い基質特異性があり、その基質認識機構を解明することは興味深い。本研究では、阻害効果が考えられる糖アルコールや、デオキシ希少糖との認識機構を調べるため、様々な糖類との複合体構造解析を行った。
【方法】Hisタグを付けたHis-tagged D-TEの野生型と同程度の酵素活性を示し、X線結晶構造解析において分解能が向上している変異酵素Cys66Ser(C66S)の精製酵素を用いて、ハンギングドロップ蒸気拡散法により結晶を作成した。得られた結晶を用いて、様々な糖類のソーキングを行い、RIGAKU MicroMax-007 HFを用いたRAXIS VII イメージングプレートシステム、高エネルギー加速器研究機構 PF-AR NW12A, NE3Aにてデータ収集を行った。
【結果】D-TE C66S の結晶中には野生型と同様に非対称単位あたり 4 分子（ホモダイマーが 2 分子）存在していた。これまでにソーキングを行った糖類では、3 炭糖のグリセロール、6 炭糖の D-タリトール、1-デオキシ D-タガトース、1-デオキシ L-タガトース、1-デオキシ 3-ケトガラクチトールが触媒部位に結合していた複合体構造が得られている。通常、これまでの基質複合体の構造においては、ケト基が触媒部位の金属イオンに配位して、エピマー化する炭素（3 位）を適切な場所に配置している。今回、ケト基がない糖アルコールも触媒部位において水酸基が金属イオンに配位して結合していた。

D-tagatose 3-epimerase, rare sugar, X-ray structure

講演番号：4C22p10
講演日時、会場：3 月 29 日 15:49～ C 校舎 22 会場

ニトリル合成酵素の多機能性
Nitrile-synthesizing enzyme: unique activity
○山田 優駿、橋本 義輝、熊野 匠人、小林 達彦（筑波大院　生命環境）
○MASATOSHI YAMADA, YOSHITERU HASHIMOTO, TAKUTO KUMANO, MICHIHIKO KOBAYASHI (Grad. Sch. of Life and Environ. Sci., Univ. of Tsukuba)

アルドキシムデヒドラターゼはニトリルの合成に関与する酵素として発見され、ニトリル分解・代謝酵素群と遺伝子クラスターを構成する。*Pseudomonas chlororaphis* B23 株は、生物に対し毒性を呈するニトリルを分解する微生物としてスクリーニングされ、本菌株の Fe 型ニトリルヒドラターゼを利用し、B23 株はかつて（アクリロニトリルから）アクリルアミド工業生産の第二世代菌として使用され、現在でも農薬の前駆体である 5-シアノバレルアミドの工業生産に使用されている。我々は既に本菌株からアルドキシムデヒドラターゼ（OxdA）を単離精製し、本酵素の性質を解析した結果、本酵素は水溶液中での反応にも関わらずアルドキシム（炭素-窒素２重結合）を脱水してニトリル（炭素-窒素３重結合）を形成する反応を触媒し、極度の光解離性を示すなど希有な特徴を持つことを明らかにした [1-3]。また、本酵素の立体構造を決定し、種々の変異酵素の解析により反応機構の全貌を解明した [4]。本研究では OxdA の脱水反応以外の触媒能を調査するために、脱水反応とは異なるカタラーゼ活性を検討することにした。

OxdAの発現プラスミドを用いて*Escherichia coli* BL21codon plus (DE3) RIL 株でOxdAを大量発現させ、本酵素を大量に精製した。本酵素を用いてカタラーゼの基質である過酸化水素の減少を分光光度計により定量することでカタラーゼ活性を測定した。その結果、微弱ではあるがOxdAのカタラーゼ活性の検出に成功し、OxdAが脱水反応以外の酵素反応を触媒できることを初めて発見した。また、カタラーゼ反応の前後で吸収スペクトルの測定を行ったところ、過酸化水素添加時にOxdAのスペクトルのシフトが認められた。現在、詳細な分光学的解析を進めている。

(1) JBC, 278, 29600 (2003); (2) JBC, 279, 47619 (2004); (3) PNAS, 103, 564 (2006); (4) PNAS, 110, 2810 (2013)

nitrile, enzyme, synthesis

講演番号：4C22p11
講演日時、会場：3 月 29 日 16:10～ C 校舎 22 会場

フタル酸モノエステル加水分解酵素と基質カルボキシル基の相互作用
Interaction of the phthalate monoester esterase with a carboxyl group of the substrate
○西山 孝[1]、岩田 眞人[1,2]、美馬 健作[1]、春口 康輔[1]、藤井 隆夫[1]([1]崇城大・応生命、[2]アイエムビー株式会社)
○Takashi NISHIYAMA[1], Makoto IWATA[1,2], Kensaku MIMA[1], Kousuke HARUGUCHI[1], Takao FUJII[1] ([1]Dept. Appl. Life Sci., Sojo Univ., [2]iMB Co, Ltd.)

【背景・目的】フタル酸エステル類は塩化ビニルなどのプラスチック製品の可塑剤として広く使われているが、ヒトへの発がん性や生殖毒性、水生生物への内分泌撹乱作用が疑われている。我々が土壌より分離した 2 株のフタル酸エステル類資化性菌、*Gordonia* sp. P8219 株と *Rhodococcus* sp. EG-5 株は共にフタル酸エステル類の分解に関わる mono-(2-ethylhexyl) phthalate（MEHP）加水分解酵素を持っていた。それらの活性中心部には G_{109}-H_{110}-S_{111}-R_{112}-G_{113}（ナンバリングは P8219 株のもの）からなる serine hydrolase の共通配列（G-x-S-x-G）が保存されていた。MEHP 加水分解酵素に相同性の高い酵素ではこの部位に塩基性アミノ酸残基は少なく、特に R_{112} は serine hydrolase を含む他の esterase/lipase や C-C hydrolase には全く存在していなかった。そのためこれら塩基性残基、特に R_{112} がフタル酸モノエステル類のエステル結合加水分解に重要であると予想された。本研究ではこれら残基を他のアミノ酸に置換し、その影響を調べることを目的とした。
【方法・結果】野生型および H_{110} と R_{112} を置換した H_{110}N、R_{112}M の変異 MEHP 加水分解酵素をコードする遺伝子をそれぞれ大腸菌で発現させ、ニッケルカラム精製した。これら野生型酵素と変異型酵素のフタル酸モノエステル類やその他のエステル基質に対する分解活性を、基質と分解産物の差スペクトルを測定することで調べた。

フタル酸モノエステル類を基質とした場合、H_{110}N 変異酵素では野生型酵素に比べ V_{max} の減少および K_m の増加が見られ、活性中心部の塩基性残基が加水分解活性と基質との親和性の両者に関与することが推定された。R_{112}M 変異酵素では活性は検出限度以下に低下し、R_{112} が加水分解活性に極めて重要であることが示唆された。また、MEHP からフリーのカルボキシル基を除いた構造を持つ 2-ethylhexyl benzoate を基質とした場合、野生型酵素、変異酵素の全てで活性が見られず、基質のカルボキシル基も加水分解活性に非常に重要と推察された。さらに、カルボキシル基の位置に芳香環を持つエステル基質 1-naphthyl butyrate を用いた場合、野生型酵素の K_m が R_{112}M 変異酵素のそれの約 4 倍に上昇した。これは、R_{112} と芳香環が干渉するためと考えられ、R_{112} と基質のカルボキシル基が相互作用することを示唆していた。これらの結果から、MEHP 加水分解酵素の活性中心部の塩基性残基、特に R_{112} とフタル酸エステル類のカルボキシル基の静電的相互作用が、エステル結合の加水分解に非常に重要であると推定した。

phthalate ester esterase, *Gordonia*

講演番号：4C22p12
講演日時、会場：3 月 29 日 16:21～ C 校舎 22 会場

ビタミン K の新規代謝経路としての硫酸化
Identification of Vitamin K Sulfotransferase

○武安 智樹[1]、黒木 勝久[1]、榊原 陽一[1]、Liu Ming-Cheh[2]、水光 正仁[1] ([1]宮崎大院農、[2]トレド大薬)
○ Tomoki TAKEYASU[1], Katsuhisa KUROGI[1], Youichi SAKAKIBARA[1], Ming-Cheh Liu[2], Masahito SUIKOU[1] ([1]Miyazaki Univ., [2]Toledo Univ.)

【目的】硫酸転移酵素(SULT)は、生体外異物や薬物、内因性物質の生理活性を調節する代謝酵素である。これまでに SULT は水酸基やアミノ基をもつ化合物を硫酸化することが知られていた。最近の我々の研究において、α,β-不飽和カルボニル基をもつナフトキノンなどの化合物も硫酸化されることが明らかとなった。血液凝固や組織の石灰化に関わる脂溶性ビタミンであるビタミン K は、ナフトキノン骨格を有する生体分子である。本研究では、このビタミン K を新たな基質の一つとして着目し、その硫酸化の機能を解明することを目的とした。
【方法】酵素は pGEX 系発現ベクターを用いて大腸菌で発現したリコンビナント SULTs を精製して使用した。SULT 酵素活性測定は、放射性同位体【^{35}S】で標識した 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate (PAPS)を硫酸基供与体、ビタミン K 関連化合物を基質として測定した。反応産物であるビタミン K 硫酸体は、質量分析装置(Q-Exactive)を用いて構造解析した。
【結果および考察】本研究結果から、ビタミン K1 やその代謝物である K3 が硫酸化を受けることが明らかとなった。活性を示した SULT1B1 の基質特異性は、ビタミン K1(0.39 pmol/min/mg protein)、ビタミン K3(44.97 pmol/min/mg protein)となり、K1 の側鎖に存在するフィチル基の有無が硫酸化活性に影響している可能性が考えられた。さらに、質量分析の結果より硫酸体の構造を推定した。

Vitamin K, Sulfotransferase

講演番号：4C22p13
講演日時、会場：3 月 29 日 16:32～ C 校舎 22 会場

ナメコ由来チロシナーゼ活性化に関与する金属プロテアーゼ

A metalloprotease activates tyrosinase in *Pholiota nameko.*

○犬塚 竜馬[1]、寺岡 佑[1]、小原 涼太[2]、野田 文雄[2]、小西 康子[1]([1]石川県大、[2]株式会社スギヨ)
○Ryoma INUZUKA[1], Tasuku TERAOKA[1], Ryota OHARA[2], Fumio NODA[2], Yasuko KONISHI[1]
([1]Ishikawa Pref. Univ., [2]SUGIYO CO., LTD.)

【諸言】菌類のチロシナーゼは不活性な前駆体（プロチロシナーゼ）として発現し、C 末端側がプロセッシングを受けて切断除去されることにより活性型となることが知られているが、活性化に関与する特異的プロテアーゼは明らかになっていない。食用キノコであるナメコに含まれるプロチロシナーゼ（67 kDa）は、Phe 387 で切断されて C 末端側（25 kDa）が除去されることにより活性化された成熟体チロシナーゼ（42 kDa）となることが分かっている。我々は、ナメコ子実体には亜鉛を有し EDTA で強く阻害される 29 kDa のプロテアーゼが存在し、この酵素はトリプシンやキモトリプシンに対する合成基質には作用しないことを見出した。本研究では、本酵素がプロチロシナーゼの活性化に関わるプロテアーゼであるかどうかについて検討した。

【方法】プロテアーゼは、ナメコ子実体を破砕して得た抽出溶液から、硫安沈殿、イオン交換およびゲルろ過カラムを用いて精製した。活性は、アゾカゼインを基質として 50 mM リン酸緩衝液（pH 8.0）中、37℃で 1 時間反応させ、TCA 添加後の遠心上清について 405 nm の吸光度を測定して求めた。プロチロシナーゼは、大腸菌発現系を用いて N 末端側にチオレドキシンと His-tag を有する 84 kDa の融合タンパク質として調製し、カラム精製した。Western blotting には、第一抗体として成熟体チロシナーゼに対するウサギ IgG（抗チロシナーゼ抗体）あるいはプロチロシナーゼの C 末端側 13 アミノ酸配列に対するウサギ IgG（抗 C 末端抗体）を、第二抗体として酵素標識したヤギ抗ウサギ IgG 抗体を用いた。チロシナーゼの活性染色では、非熱処理サンプルについて 4℃非還元条件下で SDS-PAGE を行い、3-methyl-2-benzo-thiazolinone hydrochloride hydrate 共存下で基質 tyramine と反応させた。

【結果・考察】組換えプロチロシナーゼに本酵素を反応させたところ、SDS-PAGE で 44 kDa のタンパク質バンドが検出された。このバンドは Western blotting で抗チロシナーゼ抗体と反応したが、抗 C 末端抗体とは反応しなかった。また、活性染色では活性バンドとして検出された。これらの結果は、キモトリプシンを用いて組換えプロチロシナーゼの N 末端側 15 kDa と C 末端側 25 kDa を除去して活性をもつ組換えチロシナーゼを調製した際の結果と同じであったが、キモトリプシンより本酵素の方が低濃度、短時間で作用したことから、組換えプロチロシナーゼに対する反応性が高いことが分かった。以上の結果から、本酵素は *in vivo* でチロシナーゼの活性化に関与している可能性が示唆される。

metalloprotease, tyrosinase, activation

講演番号：4E32a01
講演日時、会場：3 月 29 日 09:00～ E 校舎 32 会場

変異型ガラクトキナーゼによる糖 1 リン酸の調製

Preparation of sugar 1-phosphates using the mutated galactokinase

○西本 完、北岡 本光（農研機構　食品総合研究所）
○Mamoru NISHIMOTO, Motomitsu KITAOKA (NARO National Food Research Institute)

【目的】糖 1 リン酸は 1 位の水酸基にリン酸がエステル結合した化合物で、糖質の代謝における中間体として重要である。糖キナーゼによって ATP と単糖から合成、あるいは糖加リン酸分解酵素によって多糖、オリゴ糖から生成される。我々は糖加リン酸分解酵素の逆反応を用いたオリゴ糖合成に興味を持ち研究を行っている。近年、これまでの D-グルコース 1 リン酸を糖供与体とする糖加リン酸分解酵素に加え、*N*-アセチル-D-グルコサミン 1 リン酸、D-ガラクトース 1 リン酸、D-マンノース 1 リン酸を糖供与体とする酵素が見いだされてきた。これまでに入手困難なこれらの糖 1 リン酸を既存の糖キナーゼおよび ATP 再生系を用いて低コストで調製してきた。今回、糖 1 リン酸のライブラリーを拡充することを目的として、ガラクトキナーゼの基質認識能を改変した E46G 変異酵素を用い、L-アラビノース 1 リン酸､D-フコース 1 リン酸､D-ガラクツロン酸 1 リン酸のグラムスケールでの調製を行ったので報告する。

【方法および結果】糖キナーゼとしてガラクトキナーゼにおいてガラクトースの 6 位水酸基と直接水素結合がある 46 番目のグルタミン酸残基をグリシン残基に置換した E46G 変異酵素を用いた。E46G 変異酵素は D-ガラクトースに対する触媒効率が大幅に低下するものの、ガラクトキナーゼが作用しづらい D-ガラクトースの 6 位誘導体、L-アラビノース、D-フコース、D-ガラクツロン酸を基質にできるという利点がある。また、本研究では生成した ADP をホスホエノールピルビン酸とピルビン酸キナーゼによって ATP に再生させることで ATP 濃度を低く維持し、高濃度の ATP 存在下において糖キナーゼが受ける基質阻害を回避することとした。反応は、60mM 糖、50mM ホスホエノールピルビン酸（NaOH で pH7.0 に調整）、1mM ATP、5mM 塩化マグネシウム、0.14mg/ml E46G 変異酵素、0.5U/ml ピルビン酸キナーゼを混合し、30℃ で行った。生成した糖 1 リン酸は陰イオンクロマトグラフシステム（ICA-2000）を用いて定量し、反応収率が 90%以上になった時点で酵素を限外ろ過することで反応を停止した。電気透析によって副成したピルビン酸、未反応の基質を分離した後、強酸性陽イオン交換樹脂を用いてカウンターイオンをシクロヘキシルアミンに交換した。濃縮後、エタノールを加え、4℃ に静置することで結晶を調製した。その結果、いずれの糖 1 リン酸についても高純度の標品を 1 グラム程度得ることができた。

galactokinase, sugar 1-phosphate

講演番号：4E32a02
講演日時、会場：3 月 29 日 09:11～ E 校舎 32 会場

ビフィズス菌由来 *N*-アセチルヘキソサミン 1-キナーゼのオリゴ糖合成を目指した機能改変
Structure-based protein engineering of *N*-acetylhexosamine 1-kinase from Bifidobacterium for synthesis of oligosaccharide

○佐藤 真与[1]、荒川 孝俊[1]、西本 完[2]、北岡 本光[2]、伏信 進矢[1]([1]東大・院農、[2]農研機構・食総研)
○Mayo SATO[1], Takatoshi ARAKAWA[1], Mamoru NISHIMOTO[2], Motomitsu KITAOKA[2], Shinya FUSHINOBU[1] ([1]Grad. Sch. Agr. and life sci., Univ. Tokyo, [2]NARO, NFRI)

ビフィズス菌はヒトの健康に有益な代表的な腸内細菌として知られている。小腸下部から大腸にかけての貧栄養環境中に棲息するため、他の腸内細菌が利用しにくい難分解性の糖質を代謝する独特な代謝経路を持つ。その一つである GNB/LNB 経路は母乳オリゴ糖や腸管ムチン糖タンパク質から切り出された二糖を代謝する。*N*-アセチルヘキソサミン 1-キナーゼ(NahK)は、この経路中で GlcNAc または GalNAc の 1 位に ATP からリン酸を付加する酵素である。我々は X 線結晶構造解析により NahK の立体構造を明らかにし、反応に関わる残基や金属イオンの重要性を確認した（日本応用糖質科学会 2014 年度大会)。NahK は基質特異性が広く、多種の糖を認識するという特徴を持つため、糖質ホスホリラーゼとのカップリングにより、ワンポットでの効率的なオリゴ糖合成が可能である。我々は、GH130 ホスホリラーゼの逆反応を利用したβ-マンノシド合成の効率化を図るため、NahK の Man に対する活性を増強したマンノース 1-キナーゼを作出することを目標とした。
Bifidobacterium longum JCM1217 由来の BLLJ_1622 遺伝子を pET30a ベクターに連結し、大腸菌 BL21 codon+ (DE3)を宿主として、His-Tag 融合組換え NahK タンパク質を調製する系をもとに、部分特異的変異体を作製し精製酵素を得た。活性は PK/LDH 法により生成した ADP を定量することで測定した。NahK の活性部位において GlcNAc の *N*-アセチル基と相互作用している F149、D208、T231、Y317 に変異を加え、F149W、F149Y、D208E、T231F、T231Y、Y317F の各種変異酵素を得た。活性測定の結果、F149Y において、野生型酵素に対し GlcNAc 活性の約 0.6 倍の低下と、Man 活性の約 1.5 倍の上昇がみられた。この変異をベースに、さらに変異を加え、マンノキナーゼ活性上昇を試みている。

sugar kinase, oligosaccharide synthesis, bifidobacterium

講演番号：4E32a03
講演日時、会場：3 月 29 日 09:22～ E 校舎 32 会場

Sd^a 抗原を分解するビフィズス菌由来のバイファンクショナル酵素

Bifunctional glycosidase from *Bifidobacterium bifidum* degrading Sd^a antigen

○芦田 久[1]、鈴木 里奈[2] ([1]近畿大・生物理工、[2]京大院・生命科学)
○Hisashi Ashida[1], Rina Suzuki[2] ([1]Fac. of Biology-Oriented Science and Technology, Kinki Univ., [2]Grad. Sch. of Biostudies, Kyoto Univ.)

Sd^a 抗原は血液型抗原のひとつであり、その抗原構造は GalNAcβ1-4(NeuAcα2-3)Galβ1-4GlcNAc-R である。ヒトでは赤血球以外に胃や大腸などの消化管の正常組織で発現しており、ガン化にともない発現量が減少する抗原として知られている。類似の構造はガングリオシド GM2: GalNAcβ1-4(NeuAcα2-3)Galβ1-4Glcβ1-1Cer にも存在する。末端の分岐３糖構造は立体的コンフォメーションを取っており、GM2 がヒトリソソーム酵素により分解される際にはアクティベータータンパク質が必要である。

私たちは、腸内の善玉菌であるビフィズス菌 *Bifidobacterium bifidum* JCM 1254 のゲノム中に GH33 ドメインをコードするふたつのシアリダーゼ遺伝子 *siabb1* と *siabb2* を見出しているが、これらとはホモロジーのやや低い第３のシアリダーゼ遺伝子 *siabb3* を見出した。興味深いことに *siabb3* には GH33 ドメイン以外に GH123 β-*N*-アセチルガラクトサミニダーゼドメインをコードする部分が含まれていた。そこで、この遺伝子を大腸菌で発現させ、組換え酵素を得た。SiaBb3 は *p*NP-α-Neu5Ac と *p*NP-β-GalNAc の両方を加水分解するバイファンクショナルな酵素であった。本酵素を GM2 に作用させると Lactosylceramide にまで分解し、Neu5Ac と GalNAc の遊離が認められた。GH33 ドメインまたは GH123 ドメインの機能欠失変異体を作製して反応させたところ、シアリダーゼ活性が残存する GH123 ドメイン変異体は GM2 を分解してアシアロ GM2 を生成したが、β-*N*-アセチルガラクトサミニダーゼ活性が残存する GH33 ドメイン変異体は GM2 を分解できなかった。この結果から、SiaBb3 はまず GM2 のシアル酸を切断し、次に GalNAc を切断することが示唆された。本酵素は、ビフィズス菌による消化管内の Sd^a 抗原含有糖タンパク質糖鎖の利用に関わるものと考えられる。

参考文献） Kiyohara *et al*. Glycobiology **21**, 437–447, 2011.

bifidobacteria, glycosidase, glycoprotein

講演番号：4E32a04
講演日時、会場：3 月 29 日 09:33～ E 校舎 32 会場

石川県の伝統食品から単離された乳酸菌由来 GH ファミリー1 に属する酵素の性質決定
Characterization of glucosidases belonging to GH1 family derived from *Lactobacillus* sp.
○本多 裕司、坂田 優、片山 高嶺、熊谷 英彦、小柳 喬（石川県大 生資環）
○Yuji HONDA, Yu SAKATA, Takane KATAYAMA, Hidehiko KUMAGAI, Takashi KOYANAGI (Ishikawa Prefectural Univ.)

【目的】ヒトがアブラナ科の野菜（キャベツやブロッコリーなど）を摂取すると、それらの野菜に含まれるカラシ油配糖体が消化されずに大腸に到達し、腸内細菌群によって分解されると考えられている。その際に腸内細菌が有するカラシ油配糖体分解酵素（チオグリコシダーゼ、別名ミロシナーゼ）が、カラシ油配糖体に作用していると考えられている。腸内細菌がチオグリコシダーゼを持つ可能性は高く、*Bifidobacterium* 属や *Lactobacillus* 属などからカラシ油配糖体を分解する活性が報告されている。しかし、これらの原核生物からチオグリコシダーゼは全く精製されてはおらず、精密な酵素学的解析は未報告であった。

最近、演者らは石川県で食されている「かぶら寿し」や「大根寿し」などの発酵食品より単離された乳酸菌から、*Lactobacillus* 属や *Enterococcus* 属などの乳酸菌がシニグリンを分解する事を発見した。本研究では、カラシ油配糖体の 1 種であるシニグリンを分解した乳酸菌からグリコシダーゼ遺伝子をクローニングして組換え体酵素を作製するとともに、その酵素学的な性質を解析することを目的とした。

【方法および結果】これまでにクローニングされた植物や昆虫に由来するチオグリコシダーゼは、すべて糖質加水分解酵素(GH)ファミリー1 に分類されている。上記の乳酸菌のゲノム情報を参照して GH1 ファミリー酵素遺伝子を検索してみると、 GH1 酵素遺伝子が 2-9 種存在することが判明した。*Lactobacillus sakei subsp. sakei 23K* は 2 種の GH1 遺伝子（LSA1169 と LSA1531）を有していたので、これらの GH1 酵素遺伝子配列を参考にして、*Lactobacillus sakei* YP14-8 株から 2 種の GH1 遺伝子を PCR 法で増幅した。続いて、C 末端側に His-Tag を導入したグリコシダーゼ遺伝子を高発現系ベクターに組み込み、大腸菌を宿主とした大量発現系を構築した。得られた 2 種の組換え体酵素を His-tag を利用したアフィニティーカラムで精製したところ、電気泳動的に単一のバンドになるまで精製する事ができた。現在、得られた 2 種の組換え体酵素の酵素活性と基質特異性について分析している。

glycoside hydrolase, sinigrin, Lactobacillus

講演番号：4E32a05
講演日時、会場：3 月 29 日 09:44～ E 校舎 32 会場

マルトトリオース生成アミラーゼを用いたマルトトリオシル配糖体の合成
Synthesis of maltotriosyl glycosides by transglycosylation of maltotriose-forming amylase
○松岡 智里[1]、掃部 正浩[1]、西村 重徳[1]、谷 修治[1]、炭谷 順一[1]、多田 俊治[2]、川口 剛司[1] ([1]阪府大院・生環科、[2]阪府大院・理)
○CHISATO MATSUOKA[1], MASAHIRO KAMON[1], SHIGENORI NISHIMURA[1], SHUJI TANI[1], JUNICHI SUMITANI[1], TOSHIJI TADA[2], TAKASHI KAWAGUCHI[1] ([1]Osaka Pref. Univ. Grad. Sch. of Life&Env. Science, [2]Osaka Pref. Univ. Grad. Sch. of Science)

【目的】化合物の水溶性や安定性を改善する方法のひとつとして配糖体化が知られており，食品，化粧品，医薬品など様々な分野で利用されている。*Kitasatospora* sp. MK-1785 株が生産するマルトトリオース生成アミラーゼ（G3Amy）は，澱粉をマルトトリオース（G3）単位で特異的に加水分解する活性に加えて，水酸基を有する各種化合物に対して G3 を転移する活性も有している。配糖体を合成する酵素のほとんどは単糖を転移するもので，G3Amy のように特定のオリゴ糖を転移させる酵素はあまり知られていない。G3 配糖体とすることで，水溶性や安定性がさらに改善されることに加え，アミラーゼ阻害活性など新たな生理機能を付与することも期待される。しかしながら，産業的利用のためには加水分解活性をおさえ，また糖転移活性をさらに向上させることが望まれる。以前我々は，G3Amy の G3 アクセプター結合部位に存在すると考えられるアミノ酸に対して部位特異的変異導入を行い，芳香族化合物をアクセプター基質としたとき，加水分解活性に対する糖転移活性（T/H）が向上した変異酵素の取得に成功している。本研究ではさらなる糖転移活性の向上を達成するために，その変異部位を組み合わせた二重変異酵素を作製し，野生型酵素と比較することで配糖体合成活性の評価を行った。
【方法と結果】以前取得した G3Amy 変異酵素の変異部位を組み合わせて二重変異酵素 14 種（L191R/D323R，L191R/D323W，L191R/R223K，L191R/F258H，L191R/L277T，L191R/L277Q，L191R/F279L，L191R/F279V，L191R/D323H，F258H/D323R，F258H/D323H，F258H/D323W，R223K/D323R，R223K/D323W）を作製した。それらの変異酵素と野生型酵素を，アクセプター基質存在下で可溶性澱粉と反応させ，反応産物を TLC 及び HPLC によって確認した。アクセプター基質として，フェルラ酸，カフェ酸，クエルセチンを用いた。その結果，フェルラ酸及びカフェ酸では野生型酵素と比べ 9 種の二重変異酵素において T/H の上昇が確認された。なかでも L191R/F279V，R223K/D323R，R223K/D323W において T/H が劇的に上昇した。クエルセチンでは 4 種の変異酵素において同様の結果が確認され，特に L191R/L277Q，R223K/D323W の T/H が著しく上昇した。またそれぞれの変異酵素によって糖転移活性が上昇しているものや，加水分解活性が低下しているものなど活性の違いも確認された。今後は他のアクセプター基質に関しても同様に実験を進めるとともに，さらに糖転移活性の高い変異酵素の取得のため，変異導入部位の検討及び変異部位の組み合わせによる三重変異体酵素の作製を行っていく予定である。

amylase, transglycosylation, maltotriose

講演番号：4E32a06
講演日時、会場：3 月 29 日 10:05～ E 校舎 32 会場

澱粉様貯蔵多糖を蓄積するシアノバクテリア由来枝作り酵素の構造解析と機能改変
Characterization and engineering of branching enzyme from cyanobacteria accumulating insoluble starch-like α-glucan
○鈴木 龍一郎、林 真里、藤田 直子、鈴木 英治 (秋田県大生物資源)
○Ryuichiro SUZUKI, Mari HAYASHI, Naoko FUJITA, Eiji SUZUKI (Akita Prefectural Univ.)

【目的】枝作り酵素(BE; EC 2.4.1.8)は一次構造の相同性に基づき糖加水分解酵素ファミリー13(GH13) に属しており、αグルカンを基質としてα-1,4 結合を切断し、6 位に転移してα-1,6 結合から成る分岐を作る分子内または分子間糖転移反応を触媒する。BE の反応機構は他の GH13 酵素と同様に反応中間体を経る保持型であることが知られているが、基質認識機構などの作用機序は不明である。

αグルカンなどの多糖を基質とする酵素は、分子表面に Secondary binding site (SBS)と呼ばれる糖結合部位を持ち、基質との結合、基質の活性中心への誘導、基質をほどくなどの役割が知られている(Cuyvers *et al.*, 2012)。しかしながら、BE における SBS の報告は 1 例のみであり、その役割は未解明である (Chaen *et al*, 2012)。そこで本研究では、澱粉様貯蔵多糖を蓄積するシアノバクテリア *Cyanothece* sp. ATCC 51142 株由来 BE1 が基質（マルトオリゴ糖）と複合体を形成した状態での立体構造を解析することで新規 SBS を探索し、BE の作用機序の解明を試みた。

【方法・結果】大腸菌内で常法により BE1 の組換え酵素を調製し、精製・結晶化した。BE1（全長 773 残基）の N 末端（残基番号：3）から C 末端領域（残基番号：759）まで合計 757 残基の立体構造を分子置換法によって決定した。BE1 は、N 末端から順にドメイン N (3-99)、CBM48 ドメイン (100-206)、ドメイン A (触媒ドメイン; 207-652)、およびドメイン C (653-759) の 4 つのドメインから構成されていた。

次に、基質存在下で BE1 の立体構造解析を行ったところ、酵素表面 7 ヶ所にマルトオリゴ糖が結合した状態での立体構造が得られた。そこで、糖との結合に重要と予想されるアミノ酸残基を部位特異的変異導入法によってアラニンに置換させた変異体を構築し、ヨウ素染色法によって比活性を求め、野生型 BE1 のそれと比べた。その結果、いずれの変異体においても野生型 BE1 より比活性が低下したため、これら 7 ヶ所の SBS が酵素反応に関与することが証明された。

BE1 の酵素活性中心と SBS の間に見出されたタンパク質分子表面の溝、および結合した糖の配向性に基づき、本酵素の作用機序モデルを提案した。野生型 BE1 は、重合度 6 の分岐鎖を優先的に生産する。そこで、重合度 6 のドナー鎖が結合すると予想される SBS を重合度 7 のドナー鎖が結合できるように改変した変異体を構築し、キャピラリー電気泳動法によって酵素反応産物の鎖長分布解析を行った。その結果、変異体は重合度 7 の分岐鎖を優先的に生産した。以上の結果から、BE の作用機序モデル案の信頼性の高さが示された。本研究は、島津科学技術振興財団の研究助成を受けて行われた。

Cyanobacteria, Branching enzyme, Engineering

講演番号：4E32a07
講演日時、会場：3 月 29 日 10:16～ E 校舎 32 会場

澱粉を基質とする環状イソマルトオリゴ糖生産に重要な酵素の解析
Characterization of a key enzyme in cycloisomaltooligosaccharides production from starch
○一ノ瀬 仁美[1,2]、鈴木 龍一郎[3]、木村 啓太郎[1]、齋藤 勝一[1]、荒木 紀美[4]、小林 幹彦[4]、藤本 瑞[5]、木村 淳夫[6]、舟根 和美[1]([1]農研機構食総研、[2]信州大農、[3]秋田県立大生物資源、[4]実践女子大生活科学、[5]農生資研、[6]北大院農)
○Hitomi ICHINOSE[1,2], Ryuichiro SUZUKI[3], Keitarou KIMURA[1], Katsuichi SAITO[1], Motomi ARAKI[4], Mikihiko KOBAYASHI[4], Zui FUJIMOTO[5], Atsuo KIMURA[6], Kazumi FUNANE[1] ([1]NFRI, NARO, [2]Shinshu Univ, [3]Akita Prefectural Univ, [4]Jissen Women's Univ, [5]NIAS, [6]Hokkaido Univ)

【目的】環状イソマルトオリゴ糖（CI）生産菌である *Bacillus circulans* T-3040 株および *Paenibacillus* sp. 598K 株は、デキストランまたは澱粉を基質として CI を生産する。環状イソマルトオリゴ糖グルカノトランスフェラーゼ（CITase）はデキストランから CI を生産するが、澱粉から CI を生産することはできず、*B. circulans* T-3040 株において CITase と 135 kDa の未知タンパク質が澱粉からの CI 生産に必要であることが示唆された。未知タンパク質は、澱粉を分解し CITase の基質となるα-1,6-結合鎖を生成する活性を有すると推定された。本研究は、*Paenibacillus* sp. 598K 株を用いて、澱粉を基質とした CI 生産に関与する酵素を同定し、その性質を明らかにすることを目的とした。
【方法・結果】*Paenibacillus* sp. 598K 株の培養上清から、澱粉を基質とする CI 生産活性を指標として新規酵素（PsAGL）を精製した。CITase は PsAGL 存在下で澱粉から CI を生成した。本酵素遺伝子をクローニングし、組換え酵素を作製して特性解析を行った。PsAGL は、澱粉と反応させるとグルコースを遊離した。マルトオリゴ糖またはイソマルトオリゴ糖と反応させた場合には、これらを不均化し、元の基質よりも長いオリゴ糖を生成した。PsAGL とイソマルトテトラオースの反応では、反応初期において分解産物と共にイソマルトペンタオースが生成し、PsAGL は糖転移によりα-1,6-結合を生成する活性を有することが示唆された。同様に、PsAGL とマルトテトラオースの反応では、反応初期の産物の分子量測定および ^{13}C-NMR 解析を行ってマルトテトラオースの非還元末端にグルコースがα-1,6-結合で転移したオリゴ糖が生成することを確認した。CITase の最小基質はイソマルトテトラオースであることから、転移反応が進みα-1,6-結合鎖が生じると考えられた。そこで、PsAGL とマルトペンタオースを 24 時間反応させ、HPLC により分離した各反応産物について、分子量測定、酵素処理による結合様式の推定、CITase による CI 生産量測定を行った。最長で重合度 10 のオリゴ糖が得られ、重合度 4～10 の反応産物はα-1,6-結合とα-1,4-結合からなり、非還元末端側にα-1,6-結合鎖を持つオリゴ糖を含んでいた。各産物と CITase を反応させたところ、非還元末端側に重合度 4 以上のα-1,6-結合鎖を持つオリゴ糖を含む産物を基質とした場合に、CI 生産が認められた。以上の結果から、PsAGL が澱粉を分解し、不均化反応により澱粉に新たにα-1,6-結合鎖を付加し、澱粉から CITase の基質を作り出すことが明らかになった。本研究は、生研センターイノベーション創出事業および農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業の支援のもとで行われた。

Cycloisomaltooligosaccharide, Starch, Transglycosylation

講演番号：4E32a08
講演日時、会場：3 月 29 日 10:27～ E 校舎 32 会場

澱粉を原料とした環状イソマルトオリゴ糖・メガロ糖の酵素生産と分離精製
Enzymatic production and separation of cycloisomaltooligosaccharides and cycloisomaltomegalosaccharides from starch
○舟根 和美[1]、一ノ瀬 仁美[1,2]、鈴木 龍一郎[3]、木村 啓太郎[1]、齋藤 勝一[1]、荒木 紀美[4]、小林 幹彦[4]、藤本 瑞[5]、石塚 敏[6]、木村 淳夫[6]([1]農研機構　食総研、[2]信州大　農学、[3]秋田県立大　生物資源、[4]実践女子大　生活科学、[5]農生資研、[6]北大院農)
○Kazumi FUNANE[1], Hiomi ICHINOSE[1,2], Ryuichiro SUZUKI[3], Keitarou KIMURA[1], Katsuichi SAITO[1], Motomi ARAKI[4], Mikihiko KOBAYASHI[4], Zui FUJIMOTO[5], Satoshi Ishizuka[6], Atsuo KIMURA[6] ([1]NFRI, NARO, [2]Shinshu Univ, [3]Akita Prefectural Univ, [4]Jissen Women's Univ, [5]NIAS, [6]Hokkaido Univ)

【目的】*Bacillus circulans* T-3040 株および *Paenibacillus* sp. 598K 株は、グルコース分子 7、8 または 9 個から成る環状イソマルトオリゴ糖（CI）およびグルコース 10 分子以上から成る環状イソマルトメガロ糖（C-IMS）を生産する。C-IMS である CI-10、CI-11 および CI-12 に高い包接能が示唆されているが、これらの菌株は主として CI を生産し、C-IMS の生産量が少ないために環状イソマルトメガロ糖の特性解明および利用は進んでいない。CI および C-IMS はデキストランまたは澱粉を基質として生産される。澱粉から CI、C-IMS を生産するためにはα-1,6 転移酵素および CI グルカノトランスフェラーゼが必要である。本研究では *Paenibacillus* sp. 598K 株由来のα-1,6 転移酵素 PsAGL および *B. circulans* T-3040 株由来の CI グルカノトランスフェラーゼ(CITase)を用いて澱粉から CI および C-IMS を生産し、未反応基質を除去し、CI および C-IMS を分離回収する方法を検討した。
【方法・結果】*Paenibacillus* sp. 598K 株より PsAGL 遺伝子を、*B. circulans* T-3040 株より CITase 遺伝子をそれぞれクローニングし、組換え酵素を作製し、これらの酵素に澱粉を添加して CI および C-IMS を生産した。反応液は CI-7 と CI-8 が主成分で、C-IMS の生産量は少なく、CI:C-IMS＝4:1(w/w)程度であった。まず、エタノール分画で C-IMS 高濃度標品を調製する方法を検討した。反応液中の未反応の澱粉を取り除くために残渣を遠心除去後、さらに残存する澱粉残渣をαアミラーゼとグルコアミラーゼで分解した。反応液を濃縮し 3 倍量のエタノール（v/v)で沈殿を集め、これを数回繰り返すと、CI:C-IMS＝1:1(w/w)程度まで C-IMS の割合が高まり、アミラーゼ分解によって生じた低分子のオリゴ糖も除去することができた。次に逆相クロマトグラフィーにより CI と C-IMS の分離を試みた。αアミラーゼとグルコアミラーゼ処理を行った上記反応液を Preparative C18 （125Å, Waters）カラムに供した。ミリ Q 水で洗浄してグルコース、直鎖のマルトオリゴ糖、イソマルトオリゴ糖などの還元糖を除去後、まず 3.5%エタノールで CI を溶出し、次に 20%エタノールで C-IMS を溶出した。 CI 標品と C-IMS 標品を HPLC で分析した結果 CI 標品には CI-7、CI-8、CI-9 のみ含まれ、C-IMS はほとんど混入していなかった。C-IMS 標品には CI は検出できず、ほぼ完全に CI および C-IMS を分離精製することができた。デキストランを基質とした場合は未反応基質を除去する有効な酵素分解法が無く、少量成分である C-IMS の回収は困難であったが、澱粉から酵素生産することにより、C-IMS 高濃度品の調製や高純度の C-IMS 標品を調製することが可能になった。本研究は、生研センターイノベーション創出事業および農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業の支援のもとで行われた。

cycloisomaltooligosaccharide, cycloisomaltomegalosaccharide, starch

講演番号：4E32a09
講演日時、会場：3 月 29 日 10:38～ E 校舎 32 会場

嫌気性細菌 *Clostridium paraputrificum* のファミリー18 キチナーゼ遺伝子の解析
Analysis of family 18 chitinase genes of *Clostridium paraputrificum*
西村 仁宏[1]、大島 健志朗[2]、服部 正平[2]、粟冠 真紀子[1]、○木村 哲哉[1]、粟冠 和郎[1] ([1]三重大院生資、[2]東大院新領域)
Kimihiro Nishimura[1], Kenshiro Oshima[2], Masahira Hattori[2], Makiko Sakka[1], ○ Tetsuya Kimura[1], Kazuo Sakka[1] ([1]Mie Univ., [2]Univ. Tokyo)

海浜土壌より単離された嫌気性細菌 *Clostridium paraputrificum* M21 株は海洋性の難分解性バイオマスであるキチンを炭素源として水素ガスを大量に生産するため、本菌を応用した水素ガスの効率的生産が期待される。本菌はキチンを数日で完全分解することから、キチンの分解メカニズムについて解析を行ってきた。今までの研究から、糖質分解酵素ファミリー18 に属するキチナーゼをコードする *chi18A, chi18B, chi18C* 遺伝子と、ファミリー3 とファミリー84 に属する N-acetylglucosaminidase をコードする *nag3A, nag84A* 遺伝子をそれぞれクローニングし、それらの酵素について報告している。今回、本菌の完全長ゲノム配列の結果から、ゲノム上にコードされるファミリー18 キチナーゼ遺伝子を網羅的に解析し、大腸菌で生産させた組換え酵素を用いてそれらの性質を検討することにした。

完全長ゲノム配列は 3,489,867bp であった。MiGAP (Microbial Genome Annotation Pipeline)によるタンパク質コード領域(ORF)の解析から、本菌のゲノム上には 3,426 個の ORF が存在した。これらには 9 個のリボソーム RNA クラスターと 77 個の tRNA コード領域が存在した。ファミリー18 のキチナーゼ遺伝子について解析を行った結果、*chi18A-chi18C* 以外に 7 個のキチナーゼ遺伝子が存在し、これらを *chi18D-chi18J* と命名した。*chi18E-chi18F-chi18G* はクラスターとして存在していたが、それ以外は染色体上に個別に存在していた。これらについて、モジュール構造を調べたところ、ファミリー18 触媒モジュールに加えて Chi18D には 2 つの CBM5 が存在し、Chi18E, Chi18F, Chi18J にはそれぞれ１つの CBM5 が存在した。一方、Chi18G, Chi18H は CBM をもたず、Chi18I は CBM2 を持っていた。また、CBM5 に属するタンパク質のみをコードする遺伝子(*CBM5*)が一つ存在した。これら遺伝子の発現について RT-PCR 法で予備的な解析をしたところ、すべての遺伝子が培地中のキチンによって発現が誘導されていたことから、これら遺伝子にコードされる酵素はキチン分解に関与することが示唆された。そこで、これらすべての ORF について PCR 法で遺伝子を増幅し、pET28a ベクターへ連結して大腸菌で組換え酵素を生産させ、酵素活性について検討を行った。Chi18D, Chi18E, Chi18F, Chi18G, Chi18I は人工基質である 4-MU-chitobioside を分解したが Chi18H と Chi18J はこれを分解しなかった。一方、天然基質のボールミルキチンを分解したのは Chi18E と Chi18I であった。さらに、これら組換え酵素がキトオリゴ糖を分解するかをしらべたところ、すべての酵素がキトオリゴ糖を分解したが、分解できるオリゴ糖の種類や分解産物には差がみられた。

chitinase, Clostridium, chitin

講演番号：4E32a10
講演日時、会場：3 月 29 日 10:49～ E 校舎 32 会場

Listeria 由来チナーゼの機能解析

Characterization of two chitinases from *Listeria innocua*

○本田 翔太郎、菅原 康里、小山 文隆、坂口 政吉（工学院大工）
○ shotaro HONDA, yasusato SUGAHARA, fumitaka OYAMA, masayoshi SAKAGUCHI (Kogakuin Univ)

キチナーゼ(EC 3.2.1.14)はキチンの β-1,4 グリコシド結合を加水分解する酵素である。我々は *Listeria innocua* 由来の二つの分子サイズの異なるキチナーゼ様遺伝子 (*lin1996* 遺伝子、*lin0153* 遺伝子) に注目し、これまで、その遺伝子産物がキチナーゼ活性を持つことがわかってきた。*lin1996* 遺伝子産物は触媒ドメインのみで構成され、推定分子サイズ 35 kDa のタンパク質である (LinChi35)。一方、*lin0153* 遺伝子は、触媒ドメインとキチン結合ドメインで構成された 78 kDa のタンパク質である (LinChi78)。そこで、この二つの分子サイズが異なるキチナーゼの機能解析を目的として、種々の基質に対する分解活性と多糖に対する結合能を調べた。

コロイダルキチンおよび *N*-アセチルグルコサミン(GlcNAc) の三量体から六量体を基質とし、その反応生産物を蛍光標識した後、PAGE 法で分離、検出し、評価した。また、結合能は多糖と混合し、沈殿物と上清に分離した。得られた上清は非吸着タンパク質とし、人工基質を用いたキチナーゼ活性測定を行った。また、沈殿物は SDS を含む緩衝液と混合し、上清と共に SDS-PAGE 法で吸着タンパク質、非吸着タンパク質レベルを評価した。

LinChi35、LinChi78 共にコロイダルキチンを加水分解した場合、$(GlcNAc)_2$ が主に生産された。GlcNAc の三量体から六量体をそれぞれ分解した場合、LinChi35 は四量体以下の基質に対する分解活性が減少した。一方、LinChi78 は三量体に対する基質で分解活性の減少が見られた。これらの結果から、多糖では判別出来なかった二つの酵素の基質認識の違いが示唆された。また、両酵素共にキチンビーズへの吸着が検出された。LinChi35 は CBD を保持していないにもかかわらず、キチンビーズに対して LinChi78 と同程度の結合能を示した。

Listeria innocua, chitinase, characterization

講演番号：4E32a11
講演日時、会場：3 月 29 日 11:10～ E 校舎 32 会場

GH19 キチナーゼとしては異常に高い分子量をもつ *Aeromonas* キチナーゼの構造と機能

Structual and functional study on a family19 chitinase from *Aeromonas* sp.No.10S-24

○河本 大毅[1]、西平 知世[2]、大沼 貴之[2]、上田 光宏[3]、深溝 慶[2] ([1]近畿大農、[2]近畿大院・農、[3]阪府大院生環科・応生科)

○Daiki Kawamoto[1], Tomoyo Nishihira[2], Takayuki Ohnuma[2], Mituhiro Ueda[3], Tamo Fukamizo[2] ([1]School of Agriculture Kinki Univ., [2]Graduate School of Agriculture Kinki Univ., [3]Graduate School of Life Science and Environment Osaka Prefecture Univ.)

【緒言】キチナーゼはキチンのβ-1,4 グリコシド結合を加水分解する酵素である．この酵素は，アミノ酸配列の相同性に基づく糖質加水分解酵素の分類（CAZy データベース）においてファミリーGH18 および GH19 に分類されている．GH18 キチナーゼは様々な生物種に分布しているのに対し，GH19 キチナーゼは植物と一部の細菌にのみ存在する．これまでの研究により，キチナーゼ全般において構造的および機能的多型が存在することが明らかにされているが，細菌由来 GH19 キチナーゼの構造と機能に関する知見は少ない．本研究では，土壌より分離されたグラム陰性桿菌である *Aeromonas* sp. No. 10S-24 の生産する GH19 キチナーゼ（AeroChi19，約 70 kDa）について，このキチナーゼの分子量が他の GH19 キチナーゼのものと比べ異常に高いことに注目し，その構造と機能を調べた．

【実験方法】AeroChi19 の触媒反応機構およびキチンオリゴ糖基質分解様式を調べるために，本酵素の触媒ドメイン（AeroChi19 CatD，46 kDa）を大腸菌の発現システムを用いて生産した．また，AeroChi19 CatD と基質との結合力を評価するために不活性変異体 AeroChi19 CatD-E393Q および -E393A を作製した．キチンオリゴ糖の分解様式の解析は，酵素反応産物の HPLC 分析により行った．キチンオリゴ糖との結合力の評価は CD スペクトルを用いた熱変性実験および ITC 測定により行った．

【結果】植物由来 GH19 キチナーゼのアミノ酸配列とのアラインメントに基づき，Glu393 がプロトンドナーであると推定できた．そこで E393Q および E393A 変異体を作製し，グリコールキチンに対するキチナーゼ活性を測定したところ，本活性が顕著に低下していた．よって，Glu393 がプロトンドナーであると結論できた．本酵素はキチンオリゴ糖 6 糖を主に非還元末端側の 2 糖と還元末端側の 4 糖に加水分解しており，植物由来 GH19 キチナーゼの分解様式（2 糖＋4 糖と 3 糖＋3 糖が同程度）とは明らかに異なることがわかった．このことから，AeroChi19 CatD における基質結合は，サブサイトのプラス側に優先的に起こることが示唆された．CD スペクトルを用いた熱変性実験では基質重合度依存的に ΔT_m 値が上昇した．他の GH19 キチナーゼに比べて T_m 値の変化量が大きいことから，AeroChi19 CatD の基質に対する高い親和性が示唆された．本発表ではキチンオリゴ糖を用いた ITC による結合実験の結果も併せて示す．

Aeromonas, Chitinase, family19

講演番号：4E32a12
講演日時、会場：3 月 29 日 11:21～ E 校舎 32 会場

ガジュマル（*Ficus microcarpa*）乳液由来キチナーゼ-B の抗真菌活性におけるキチン結合ドメインの役割

Roles of chitin-binding domain in antifungal activity of chitinase-B from *Ficus microcarpa* latex

○花城 清俊、平安名 一、伊藤 進、平良 東紀 (琉大農)
○Kiyotoshi Hanashiro, Hajime Henna, Susumu Ito, Toki Taira (Ryukyu Univ.)

[目的] 植物においてキチナーゼは、細胞壁にキチンを含む真菌に対しての自己防御タンパク質の 1 つであると考えられている。我々は熱帯地方に分布するクワ科イチジク属のガジュマル（*Ficus microcarpa*）の乳液中から高い抗真菌活性をもつキチナーゼ （Gazyumaru latex chitinase-B: GlxChi-B）およびその遺伝子を単離し，本タンパク質が糖質結合モジュール family 18 に属する chitin-binding domain (ChBD)と糖質加水分解酵素 family 19 に属する触媒ドメインから成っていることを明らかにしている。GlxChi-B の抗真菌活性における ChBD の役割を調べるために、ChBD を欠損させた変異体を作成し、そのキチン分解活性および抗真菌活性について野生型と比較した。

[方法] 宿主として大腸菌 Rosetta-gami(DE3)株，ベクターとして pET22b を用いて，野生型 GlxChi-B（Glu1-Gly289）と ChBD およびヒンジ領域を除いた触媒ドメイン（Asp45-Gly289）の変異体（Cat）を作成し，その酵素学的性質及び抗真菌活性を調べた。キチン分解活性の測定には基質としてグリコールキチンを用いた。抗真菌活性の測定には供試菌株として *Trichoderma viride* を，方法として菌糸再伸長阻害試験（Taira et al., *Biosci Biotechnol Biochem*, 66: 970-977, 2002）を用いた。走査性電顕による観察は以下のように行った。予め寒天プレート上で培養した *T. viride* 菌体にキチナーゼを添加，25℃で 5 分間反応させた後、2.5%グルタルアルデヒドで固定、乾燥、白金蒸着処理し，JSM-6510 (JEOL)を用いて高真空条件下で菌糸の様子を観察した。

[結果・考察] 野生型と Cat は同等の最適温度と最適 pH を有していた。水溶性基質であるグリコールキチンに対する分解活性においては，野生型よりも Cat の方が約 1.5 倍高い活性を示した。菌糸再伸長阻害試験において阻害値 IC_{50} は，野生型で 17 pmol，Cat では 40 pmol であり，野生型の方が 2 倍以上高い抗真菌活性を有することが分かった。光学および走査性電子顕微鏡における観察により，Cat と比較して野生型では菌糸の側壁により大きな損傷が見られたことから、野生型および Cat で真菌菌糸に対する作用が異なっていることが示唆された。これらの結果から、GlxChi-B の抗真菌活性の発揮には ChBD が大きく寄与していることが分かった。現在、GFP 融合タンパクを作成し、本酵素および変異体の真菌菌糸における結合部位について検討している。

chitinase, antifungal, latex

講演番号：4E32a13
講演日時、会場：3 月 29 日 11:32～ E 校舎 32 会場

植物由来ファミリーGH19 キチナーゼのループ構造の多様性と機能に関する研究

Role of the loop structure of family GH19 chitinase in the enzymatic activity

○高島 智也[1]、北奥 喜仁[1]、梅本 尚之[1]、大沼 貴之[1]、平良 東紀[2]、深溝 慶[1] ([1]近畿大農、[2]琉球大農)

○Tomoya TAKASHIMA[1], Yoshihito Kitaoku[1], Naoyuki Umemoto[1], Takayuki Ohnuma[1], Toki Taira[2], Tamo Fukamizo[1] ([1]Kinki Univ., [2]Ryukyu Univ.)

キチナーゼ（EC 3.2.1.14）は，*N*- アセチルグルコサミンがβ-1,4 結合で連なった多糖であるキチンを加水分解する酵素である．本酵素はアミノ酸配列の相同性に基づく糖質分解酵素ファミリーの分類（CAZy: Carbohydrate-Active Enzymes）において，GH18 と GH19 に分類されている．ファミリー GH18 キチナーゼは様々な動植物に見いだされるのに対し，GH19 キチナーゼは一部の細菌にも見出されているが，大部分は植物で見出されている．GH19 キチナーゼにはα–ヘリックスのみからなるコア構造に加え 6 つのループ構造をもつ 6-Loop 型の他，ループ構造を欠損した 1-Loop 型や 5-Loop 型がある [1)]．しかし，これら植物で機能している GH19 キチナーゼのループ構造が酵素の機能に与える影響についてはよくわかっていない．本研究ではループ数の異なるファミリーGH19 キチナーゼの構造と機能を調べ，ループ構造が各酵素の酵素活性，抗真菌活性および基質結合能に与える影響について調べた．

各酵素のキチンオリゴ糖分解活性を HPLC により解析した結果，鎖長の短いオリゴ糖は 5-Loop 型と 1-Loop 型 GH19 キチナーゼにより容易に分解されたのに対し，6-Loop 型にはほとんど分解されなかった．キチンオリゴ糖に対する親和性を ITC（等温滴定型熱量計）で調べた結果，ループ構造が少ないほどオリゴ糖に対する親和性が高くなる傾向が見られた．一方 *Trichoderma viride* に対する抗真菌活性を調べた結果，すべての酵素は菌糸の成長を阻害した．抗真菌活性の強さは 6-Loop 型が最も強く，以下 5-Loop 型，1-Loop 型の順であった．各酵素の立体構造をＸ線結晶構造解析により決定し比較したところ，GH19 キチナーゼにおけるループ構造の付加は基質結合クレフトを延長していることがわかった．このことからループ構造は鎖長の異なるオリゴ糖基質に対する親和性をモジュレートするものと考えられた [2,3)]．現在，三次元 NMR スペクトルにもとづく主鎖連続帰属および NMR による基質滴定実験を行い，各 GH19 キチナーゼの基質結合に関与するアミノ酸残基の決定を行っている．本発表ではその結果について報告する．

[1]Taira *et al.*, *Glycobiology*, 21, 644-54, 2011, [2]Ohnuma *et al.*, *FEBS Lett.*, 587, 2691-7, 2013, [3]Ohnuma *et al.*, *Biochim Biophys Acta*, 1844, 793-802, 2014

chitinase, chitin

講演番号：4E32a14
講演日時、会場：3 月 29 日 11:43～ E 校舎 32 会場

Serratia marcescens 2170 のキチン分解利用機構の解析：ChiD, Ctb の発現系構築と CBP21 欠損株の構築

Mechanism of chitin degradation and utilization by *Serratia marcescens* 2170：Construction of ChiD and Ctb expression system and CBP21 defective mutant

○今井 裕也[1]、五十嵐 瑞礎[1]、三浦 拓馬[1]、桜井 大地[1]、杉本 華幸[1,2]、鈴木 一史[1,2]、渡邉 剛志[1,2]（[1]新潟大院・自然科、[2]新潟大農・応生化）

○Yuya IMAI[1], Mizuki IKARASHI[1], Takuma MIURA[1], Daichi SAKURAI[1], Hayuki SUGIMOTO[1,2], Kazushi SUZUKI[1,2], Takeshi WATANABE[1,2] ([1]Grad. Sch. Sci. Technol., Niigata Univ., [2]Fac. Agri., Niigata Univ.)

【目的】*Serratia marcescens* はキチナーゼの高生産菌として知られており、そのキチン分解酵素系は多くの研究者の関心を集めてきた。我々は、自然界におけるキチン循環のキーステップを理解すべく、*S. macsescens* 2170 株をモデル細菌としてキチン分解利用機構の全体像の解明を目指している。*S. marcescens* 2170 は、キチンまたはキチンオリゴ糖を炭素源として培養すると 3 つのキチナーゼ（ChiA，ChiB，ChiC）と、AA ファミリー10 の LPMO であるキチン分解促進タンパク質 CBP21 を分泌する。そして最近、*S. marcescens* に *S. proteamaculans* の ChiD に類似した新規のキチナーゼ遺伝子が存在することが、ゲノム解析によって明らかとなった。

本研究では、*S. marcescens* 2170 のキチン分解利用機構解明の更なる理解のために、新規キチナーゼ ChiD とキトビアーゼの発現系構築と性質の解析を行うとともに、CBP21 の遺伝子（*cbp*）欠損株の取得を試みた。

【方法】ChiD およびキトビアーゼの発現系は、プラスミド pET22b（+）と大腸菌 BL21（DE3）を用いて、C 末端側に His タグが付加されたタンパク質として発現するように構築した。発現した ChiD およびキトビアーゼは、Ni-NTA アフィニティーカラムを用いて精製し、その性質を分析した。*cbp* 遺伝子欠損株は、接合伝達性プラスミド pKNG101 と大腸菌 *SM* 10λpir 株を用いて欠損遺伝子を *S. marcescens* 2170 に導入し、Alellic exchange によって染色体上の *cbp* 遺伝子を破壊して取得した。

【結果】ChiD およびキトビアーゼの発現に成功し、Ni-NTA アフィニティーカラムによる精製によって、電気泳動的に単一バンドの精製酵素が得られた。推定分子量はそれぞれ約 42,000 と 95,000 であった。ChiD は不溶性基質より水溶性基質に対する加水分解活性が高く、主な分解生成物は GlcNAc と $(GlcNAc)_2$ であった。現在、ChiD の存在意義を明らかにするため、ChiD の発現量を解析中であり、今後 ChiA，ChiB，ChiC との相乗効果を検討する。一方、キトビアーゼについては、3 糖以上のキチンオリゴ糖の利用への重要性が示唆されているため、分解特異性の解析が現在進行中である。また、*cbp* 遺伝子欠損株の構築にも成功し、CBP21 が本菌のキチンの分解利用において非常に重要な役割を果たしていることを初めて示すことが出来た。今回、発現精製および取得に成功した 2 つの酵素と *cbp* 遺伝子欠損株は、*S. marcescens* 2170 のキチン分解利用機構の新たな理解に大きく貢献することが期待される。

chitinase, chitobiase, CBP21

講演番号：4E32a15
講演日時、会場：3 月 29 日 11:54～ E 校舎 32 会場

LysM ドメインの構造と機能：Receptor 型 LysM と Carbohydrate-Binding Module 型 LysM との比較

Structure and function of LysM domain : Comparative study of Receptor-type LysM and Carbohydrate-Binding Module-type LysM

○北奥 喜仁[1]、平良 東紀[2]、沼田 倫征[3]、深溝 慶[1]、大沼 貴之[1] ([1]近大院・農、[2]琉大・亜熱生資、[3]産総研・バイオメディカル)
○Yoshihito KITAOKU[1], toki taira[2], tomoyuki numata[3], tamo fukamizo[1], takayuki ohnuma[1] ([1]Kinki Univ., [2]Ryukyu Univ., [3]AIST)

【目的】Lysin-Motif (LysM)はキチンおよびその誘導体の認識に関わっていることが知られている。近年、Tairaらによって植物キチナーゼにおいて糖質結合モジュール(Carbohydrate-Binding Module)として機能するLysM を見出した(*Glycobiology*, 2008, 18, 414-423)。同時にこのようなドメイン構造をもつキチナーゼは藻類においても見出されているが（Amon *et al., The Plant Cell,* 1998, 10, 781-789）、その構造と機能に関しては明らかにされてこなかった。本研究では、シダやスギナ、藻類に共通するLysMの構造と機能の比較を行うことを目的とする。
【方法】シダ（*Pteris ryukyuensis*）、スギナ（*Equisetum arvense*）およびボルボックス（*Volvox carteri*）がもつキチナーゼ（PrChiAとEaChiAおよびVcChiA）に含まれるLysM（PrChiA-LysM, PrChi-A LysM tandem, EaChiA LysM, VcChi-A LysM, VcChi-A LysM tandem）を精製し、結晶化を行った後、得られた結晶を用いて分子置換法によって立体構造を決定した。同時に安定同位体でラベル化を行ったタンパク質を使用し、核磁気共鳴分光装置（NMR）によるキチンオリゴ糖滴定実験を行った。キチンオリゴ糖滴定に伴うNMRスペクトルの変化から、タンパク質上のリガンド結合部位を同定し、立体構造上にマッピングした。得られた結果から結合部位近傍に存在する芳香族アミノ酸残基が結合に重要な寄与をしていることが明らかとなったため、この残基に変異を導入し、キチンオリゴ糖に対する結合力への影響を調べた。測定には等温滴定型熱量計（ITC）を用い、それぞれのタンパク質のリガンド結合における熱力学パラメータを決定した。
【結果】X線結晶構造解析の結果、PrChiAとEaChiAおよびVcChiAのLysMの立体構造を決定した。各LysMの主鎖構造は、他の機能をもつLysMのものとよく類似していたが、PrChi-AとEaChi-AがもつLysMにのみジスルフィド結合が存在することを見出した。得られたLysMの立体構造に、NMR滴定実験より推定された結合に関わると思われるアミノ酸残基をマッピングしたところ、LysMの分子表面のクレフト末端に存在する芳香族アミノ酸残基が結合に重要であることが示唆された。そこで、PrChiAがもつこのTyr残基に変異を導入し、キチンオリゴ糖との結合性を等温滴定型熱量計によって調べた。その結果、この変異によってキチンオリゴ糖に対する親和性は有意に減少し、Tyr残基のオリゴ糖結合に対する寄与が明らかとなった。現在VcChi-A LysMの立体構造の精密化および機能に関する研究を行っている。

LysM, CBM, Chitinase

講演番号：4E23a01
講演日時、会場：3 月 29 日 09:00～ E 校舎 23 会場

細菌のヒスチジンキナーゼの Hbox を標的とする新規抗生物質 waldiomycin
Waldiomycin targets the Hbox of bacterial histidine kinases
○犬飼 洋一[1]、江口 陽子[1]、清水 莉子[1]、岡島 俊英[2]、梅北 まや[3]、五十嵐 雅之[3]、内海 龍太郎[1]([1]近畿大院・農・バイオ、[2]阪大・産研、[3]微化研)
○Youichi INUKAI[1], Yoko EGUCHI[1], Riko SHIMIZU[1], Toshihide OKAJIMA[2], Maya UMEKITA[3], Masayuki IGARASHI[3], Ryutaro UTSUMI[1] ([1]Dept. of Biosci, Grad. Sch. of Agric. Kinki Univ., [2]Osaka Univ., [3]Institute of Microbial Chemistry (BIKAKEN))

[目的] *S. aureus*（黄色ブドウ球菌）、 *E. faecalis*（腸球菌）、 *B. subtilis*（枯草菌）、*S. mutans*（う蝕菌）等のグラム陽性菌の増殖に必須な二成分情報伝達システム WalK(histidine kinase、HK)/WalR (response regulator、RR)が知られている。WalK/WalR を標的とした阻害剤はメチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）やバンコマイシン耐性腸球菌（VRE）にも抗菌性を示すことが期待され、新規抗生物質開発の優れた分子標的剤の候補と考えられる。我々は放線菌抽出物からのスクリーニングを行い、WalK 阻害剤として、新規抗生物質 waldiomycin を単離、構造決定を行った（１）。waldiomycin は、*in vitro* にて、WalK 以外の様々な HK の自己リン酸化も阻害することから、HK 共通ドメインに作用することが期待された。本研究においては、大腸菌 HK である EnvZ と枯草菌 WalK の細胞質内領域に共通して存在する 2 量体化ドメイン（DHp, リン酸化 Hbox を含む）と ATP 結合（CA）ドメインに着目して、部位特異的変異法を用いて、waldiomicin の作用部位の特定を行った。

[方法と結果] 最初に、waldiomycin が CA ドメインの ATP 結合部位に結合するか調べるため、過剰量の ATP が、waldiomycin の自己リン酸化反応阻害作用（50%自己リン酸化阻害濃度、IC_{50}）に影響するのか細胞質領域断片 $EnvZ_{223-450}$ を用いて解析した。その結果、waldiomycin の IC_{50} は ATP 濃度にほとんど影響されないことが判明し、waldiomycin の阻害は ATP 結合部位への拮抗的な結合によるものでないことがわかった。次に $EnvZ_{223-450}$ において、DHp ドメイン内に存在する 30 個のアミノ酸残基のアラニン変異体を作製した。これらの EnvZ 変異体に対する waldiomycin の IC_{50} を測定した。その結果、DHp ドメインの自己リン酸化 His 残基を含む保存性領域 H-box の 4 種の変異体（S242A、D244A、T247A、P248A、R234A）に対して、waldiomycin の IC_{50} は野生型 EnvZ と比較して 15~60 倍耐性化した。さらに、枯草菌 WalK やう蝕菌の WalK(VicK)の DHp ドメイン変異体を 30 個作成し、同様の手順で IC_{50} を測定した結果、WalK の H-box 内の 3 重変異体の WalK は waldiomycin に対して、10 倍以上の耐性化を示した。これらの結果より、waldiomycin は、HK の細胞質内にある DHp ドメインの H-box に作用し、自己リン酸化を阻害する新しいタイプのヒスチヂンキナーゼ阻害剤であることを強く示唆した。

（１）Igarashi M., Watanabe T., Hashida T., Umekita M., Yanagida Y., Kino H., Kinoshita N., Sawa R., Nishimura Y., Utsumi R., Nomoto A. *J. Antibiot*. 66, 459-464 (2013)

histidine kinase inhibitor, antibiotics, two component system

講演番号：4E23a02
講演日時、会場：3 月 29 日 09:11～ E 校舎 23 会場

Waldiomycin と大腸菌ヒスチジンキナーゼ EnvZ の DHp ドメイン間の相互作用
Interaction between waldiomycin and DHp domain of histidine kinase, EnvZ of *Escherichia coli*

○清水 莉子[1]、江口 陽子[1]、犬飼 洋一[1]、栃尾 尚哉[2]、木川 隆則[3]、岡島 俊英[4]、新家 粧子[1]、深溝 慶[1]、梅北 まや[5]、五十嵐 雅之[5]、内海 龍太郎[1]([1]近畿大・院・農、[2]広島大学、[3]理研、[4]大阪大学、[5]微化研)
○Riko Shimizu[1], Yoko Eguchi[1], Yoichi Inukai[1], Naoya Tochio[2], Takanori Kigawa[3], Toshihide Okajima[4], Syoko Shinya[1], Tamo Fukamizo[1], Maya Umekita[5], Masayuki Igarasi[5], Ryutaro Utsumi[1] ([1]Dept.of Biosci.,Grad.Sch.of Agric,Kinki Univ.,, [2]Hiroshima Univ.,, [3]Riken, [4]Osaka Unv.,, [5]BIKAKEN)

[目的] 大腸菌ヒスチジンキナーゼ(HK)、EnvZ は細胞内ドメインとして、C 末端側 ATP 結合(CA)ドメインに続いて、EnvZ のホモ２量体化形成ドメイン(DHp)が存在している。EnvZ の DHp ドメインはヘリックス l とヘリックス ll が、ループ構造によって、結ばれている。EnvZ が自己リン酸化活性を示すためには、DHp ドメイン部で２量体を形成する４ヘリックスバンドル構造をとることが重要である。DHp ドメインにはリン酸化されるヒスチジン残基を含む H-box が存在する。EnvZ の自己リン酸化には、ATP が結合した CA ドメインがトランスに DHp ドメインに作用して、H-box 内の H243 のリン酸化を触媒する。waldiomycin はこのような H-box 阻害剤として、見出された最初のキナーゼ阻害剤である。本研究では、NMR 法を用いて、waldiomycin と EnvZ の DHp ドメインの H-box との相互作用の詳細を明らかにするとともに、waldiomycin の H-box 阻害剤として、新しいキナーゼ阻害作用を研究した。

[方法と結果] 最初に、 EnvZ DHp ドメインと waldiomycin の相互作用を明らかにするために NMR 滴定実験を行った。^{15}N-EnvZ DHp に waldiomycin を作用させると、ヘリックス l の自己リン酸化部位であるヒスチジン残基(H243)周辺の H-box の領域と、ヘリックスⅡの C 末端側の X-region の領域に明らかなシグナル強度の減弱が見られた。次に、犬飼等が見出した H-box 変異体をラベルした ^{15}N-EnvZ DHp 変異体 (S242A, D244A, T247A, P248A) と waldiomycin の相互作用解析を、NMR 滴定実験を用いて行った結果、これら H-box 内の４つの変異体においては、waldiomycin 存在下と非存在下においても顕著なシグナル強度の減弱が認められなかった。次に angucyclin と dioxolane 骨格を有する waldiomycin において、angucyclin 骨格のみを有する化合物 rabelomycin と ^{15}N-EnvZ DHp を用いて、NMR 滴定実験を行った。その結果、rabelomycin 添加しても、DHp ドメインに対して、シグナル強度の変化が見られなかった。これらの結果から、waldiomycin は angucyclin のみでなく、dioxolane の部分も相互作用に必要であると考えられた。最後に、EnvZ の細胞内ドメイン（CA+DHp)と DHp ドメインのヘテロ２量体において、waldiomycin によるリン酸化阻害実験を行った結果、waldiomycin は実際に CA ドメインによるトランスリン酸化反応を阻害した。これらの結果は、waldiomycin は特異的に DHp ドメインの H-box に相互作用して、CA ドメインによる H243 のトランスリン酸化反応を阻害するモデルを支持した。

histidine kinase, waldiomycin, DHp domain

講演番号：4E23a03
講演日時、会場：3 月 29 日 09:22～ E 校舎 23 会場

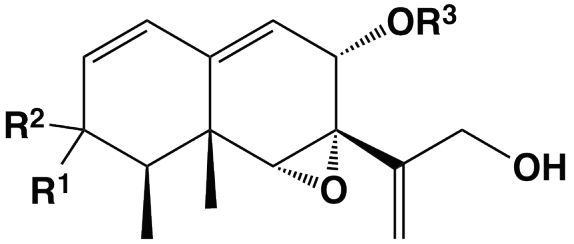
ナラ枯れ被害木より分離した糸状菌 TT-12 株の生産する物質について

Bioactive metabolites from fungal strain TT-12 isolated from Japanese oak wilt

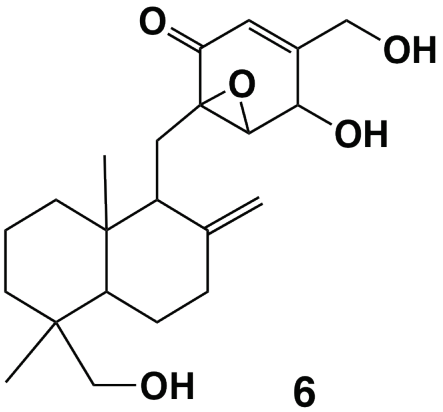
○塩野 義人、高野 智也、村山 哲也、小関 卓也、小山 浩正（山形大農）
○Yoshihito SHIONO, Tomoya TAKANO, Tetsuya MURAYAMA, Takuya KOSEKI, Hiromasa KOYAMA (Yamagata Univ.)

【目的】ナラ枯れはミズナラやコナラに対して、カシノナガキクイムシとナラ菌（*Raffaelea quercivora*）により引き起こされる樹木萎凋病である。これまでに、我々のグループは、ナラ菌への生育阻害活性を指標に糸状菌類を探索し、それらの代謝産物より、サイトカラシン類やサイトスポロン類を明らかにしてきた。本研究では、その過程で分離された糸状菌 TT-12 株の代謝産物について、報告する。

【方法および結果】ナラ枯れ被害木の内部より分離された糸状菌 TT-12 株の培養物について、活性試験と TLC 上での挙動を指標に各種カラムクロマトグラフィーにより精製し、化合物 1～6 を単離した。化合物 1 と 2 は、NMR を用いた構造解析の結果、既知のエレモフィラン型セスキテルペン類のホマデカリン C と D、3 と 4 は、先の 1 と 2 のモノアセチル誘導体であった。また、化合物 5 は、分子内にトリエノンを有するホマデカリンの新しい誘導体であった。一方、化合物 6 は、NMR スペクトルを中心とした解析により、エポキシシクロヘキセノールを有するセスキテルペン類のマクロフォリン誘導体であるミロセコル B と C と同一の平面構造を示した。それぞれのナラ菌に対する生育阻害活性ついては、解析中である。



1 : R^1 = O, R^2 = O, R^3 = H
2 : R^1 = H, R^2 = OH, R^3 = H
3 : R^1 = O, R^2 = O, R^3 = acetyl
4 : R^1 = H, R^2 = OH, R^3 = acetyl



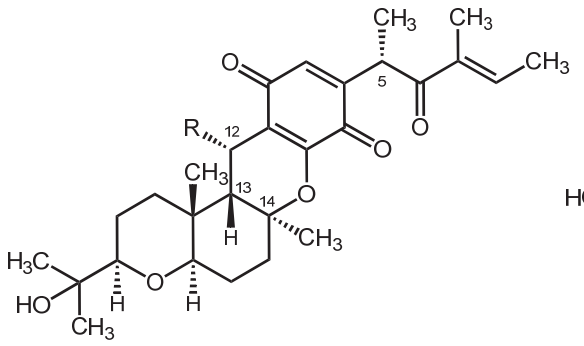
6

Japanese oak wilt, phomadecalins, myrothecols

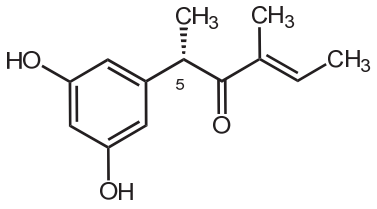
講演番号：4E23a04
講演日時、会場：3 月 29 日 09:33～ E 校舎 23 会場

新規 *epi*-cochlioquinone 誘導体とその生合成前駆体の単離と構造
Isolation and structure of novel *epi*-cochlioquinone derivatives and their biosynthetic precursor
○荒山 美紀[1]、田中 和明[1]、前多 隼人[1]、根平 達夫[2]、橋本 勝[1] ([1]弘前大農、[2]広島大院総合)
○Miki Arayama[1], Kazuaki Tanaka[1], Hayato Maeda[1], Tatsuo Nehira[2], Masaru Hashimoto[1] ([1]Hirosaki Univ., [2]Hiroshima Univ.)

本研究室が展開する微生物由来有用新規物質探索研究の過程で、イネゴマハガレ病菌(*Cochliobolus miyabeanus*)を用いたスクリーニングの結果、*Helminthosporium vertinum* TS28 の培養液に強い抗菌活性を見出した。本培養液酢酸エチル抽出物から、新規物質 *epi*-cochlioquinone D (**1**) と 12-hydroxy-*epi*-cochlioquinone D (**2**)、および、これらのポリケチド部分の構造をほぼ完全に有する生合成前駆体 Pre-cochlioquinol D を単離した。



epi-cochlioquinone D (**1**): R = H
12-hydroxy-epi-cochlioquinone D (**2**): R = OH



Pre-cochlioquinol D (**3**)

epi-cochlioquinone D (**1**)は既知物質 cochlioquinone D[1)]と NMR スペクトルが酷似していたが 13 位付近のシグナルパターンに相違がみられた。詳細な解析の結果、14 位メチル基に関する異性体であると判明した。旋光度（$[\alpha]_D^{24}$ +16）を、他の類縁体のものと比較して、側鎖部分は他のコクリオキノン類と同じ絶対配置であると推定した。5 位メチル基の立体化学について、ECD スペクトルから決定すべく検討中である。より高極性な 12-hydroxy-*epi*-cochlioquinone D (**2**, $[\alpha]_D^{24}$ +80)の ESIMS スペクトルにおける分子イオンは **1** に比べ 16 u 大きいものであった。^{1}H NMR スペクトルでは 12α-H に相当するシグナルが消失し、12β-H が 4.62 ppm に観測された。これらのことなどから、12 位にα-配置で水酸基を有する **1** の誘導体であると決定した。興味深いことに、*H. vertinum* TS28 の菌体抽出物には、**1**, **2** のポリケチド部分をほぼ完全に有する Pre-cochlioquinol D (**3**) が存在することを明らかにした。cochlioquinone は最初イネゴマハガレ病菌（*C. miyabeanus*）培養液から発見されたが[2)]、今回、同菌に対する抗菌活性を指標により構造類縁体 **1-3** が見いだされたことは興味深い。現在これらの生理活性について検討中である。

1) H. Tomoda, S. Omura, *et al.*, *J Antibiot.,* **2005**, *58*, 695.
2) J. R. Carruthers, *et al*, *Chem. Commun*, **1971**, 164-166

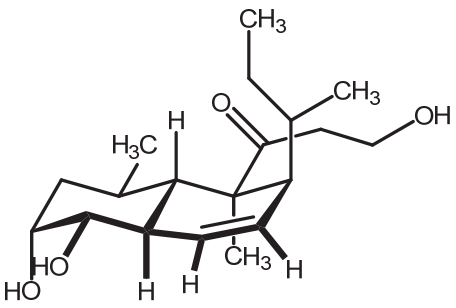
novel *epi*-cochlioquinones, biosynthetic precursor, meroterpenoid

講演番号：4E23a05
講演日時、会場：3 月 29 日 09:44～ E 校舎 23 会場

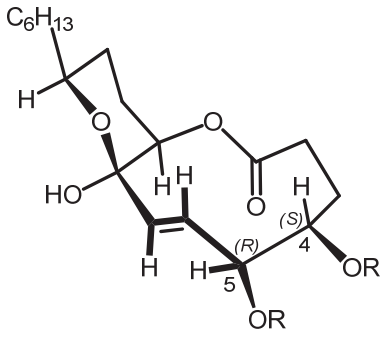
phomolide C の相対及び絶対配置の決定
stereochemistry of phomolide C
○伊藤 厚[1]、殿内 暁男[2]、前多 隼人[2]、橋本 勝[2] ([1]岩手大連合農、[2]弘前大農)
○Atsushi ITO[1], Akio TONOUCHI[2], Hayato MAEDA[2], Masaru HASHIMOTO[2] ([1]Iwate Univ., [2]Hirosaki Univ.)

【研究背景】津軽地域は僻地であるが、資源の視点では未開拓遺伝子資源が豊富とも言える。実際に我々は本地域微生物から多くの新規二次代謝物を見出してきた。さらに有用な新規二次代謝物を見出すべく探索研究を行った結果、弘前大学白神観察園に植生するヒメアオキの木から採取した子嚢菌 *Diaporthe* sp. 1308-05 培養液から、Eujavanicol A (**1**)及び Phomolide C (**2**)を単離した。 **2** は平面構造のみが知られていたが、本研究により絶対配置を含め全構造が明らかになった。

【方法・結果及び考察】子嚢菌 *Diaporthe* sp. 1308-05 の培養液（2.0 L）から **1** および **2** を単離した。化合物 **1** の物性データは文献のそれと完全に一致した[1]。スペクトル解析により **2** の平面構造を決定し、文献を調査したところ、2008 年に Xiao らによって *Phomopsis* sp. B27 から単離された phomolide C と一致することが判明した[2]。しかし、論文では立体構造について一切の記述がなかった。^{1}H NMR スペクトルにおける結合定数などにより、相対配置を下に示したように決定した。さらに NOESY スペクトルにおける相関から、推定した相対構造に矛盾がないことを確認した。絶対配置について、4,5-*O*-ジベンゾアート **3** に誘導して電子円二色性（ECD）スペクトルにより帰属することとした。反応は DMAP を塩基として用い 7 日間反応させることにより望む **3** を調製した。この時ケタール水酸基はベンゾイル化されなかった。また、シグナルパターンの比較から、**2** と比較して 10 員環部の立体配座に大きな変化がないことを確認した。**3** の ECD スペクトルはベンゾイル基の吸収波長で負のコットン効果を観測し、(4*S*,5*R*)-配置を決定した。



Eujavanicol A (**1**)



phomolide C (**2**): R = H
dibenzoate (**3**): R = Bz

1) N. shou et al., *J. Nat. Prod.* **2007,** 70, 1510-1512.
2) X. Lin et al., *Chin. J. Nat. Med.* **2008**, 6, 391.

phomolide C, stereochemistry, NOE

講演番号：4E23a06
講演日時、会場：3 月 29 日 10:05～ E 校舎 23 会場

新規ジュリマイシン類縁化合物の化学構造と生物活性
New members of julimycin from *Streptomycs* sp.
○菰田 俊一[1]、佐伯 奈央子[1]、小関 良卓[2] ([1]宮城大食産業、[2]東北大院)
○Toshikazu Komoda[1], Saeki Naoko[1], Yoshitaka Koseki[2] ([1]Miyagi Univ., [2]Tohoku Univ.)

[目的]
抗酸化関連化合物は食品の品質維持や生体組織の劣化抑制に利用され、様々な面から研究が進められている。このことから、我々は、抗酸化能を評価する手法として DPPH 試薬を用いたラジカル捕捉活性を指標に、天然由来の抗酸化関連化合物を見出す取り組みを進めてきた。これまでに、当研究室では仙台市内の土壌中から単離した放線菌 12T061 株より、活性物質 12T061A(**1**)を見出し、その平面構造について本学会等で報告を行っている。今回は **1** の立体化学および生物活性、さらに新たに見出した類縁化合物についても新たな知見が得られたのでこれについて報告する。

[方法および結果、考察]
DPPH ラジカル捕捉物質として単離された活性物質 12T061A($C_{19}H_{20}O_7$, **1**)の平面構造は各種 NMR スペクトルを測定することにより解析された、この結果、**1** は 3 つの連続した 6 員環を持つ化合物であり、既知の抗腫瘍活性物質 Julichrome 類、Julimycinn 類の類縁化合物であることが示された。立体化学は NOE 差スペクトル測定および ^{1}H-NMR における結合定数の解析により推定した。**1** と同じ培養液からは **1** の類縁化合物 12T061C($C_{20}H_{22}O_7$, **2**)も見出され、その化学構造も明らかにした。**1** および **2** の DPPH ラジカル捕捉活性を測定したところ、両化合物共にラジカル捕捉活性を示したが、**2** はより活性が強く対象としたα-トコフェノールと同様の活性を示した。**1** と **2** の化学構造とラジカル捕捉活性の関係を明らかにするため、**2** の TMS-ジアゾメタン処理化合物($C_{21}H_{24}O_7$, **3**)を得た。この結果、**1** のフェノール性 OH 基の一部は水素結合を形成し、これが活性に影響していると予想された。
1 および **2** は既知の抗腫瘍活性物質の類縁体であったため、細胞増殖抑制活性試験を行った。細胞株はヒト肝臓がん由来 HepG2 を使用し、試料添加 48 時間後の細胞生存率を WST-8 試験により評価した。その結果、12T061A(**1**)には、既存の抗がん活性物質 5-フルオロウラシルと同等の活性が認められたが、**2** および **3** には抑制活性が認められなかった。現在、放線菌 12T061 株の培養条件を検討することにより、別の類縁化合物がこの培養液の中に含まれていることが認められ、この化合物の精製および化学構造の解析を進めている。

Julimycin, *Streptomyces sp.*

講演番号：4E23a07
講演日時、会場：3 月 29 日 10:16～ E 校舎 23 会場

Akaemycin, a new macrolide isolated from marine Streptomyces

○Tao Zhou[1], Seizo Sato[2], Hisayuki Komaki[3], Yasuhiro Igarashi[1] ([1]Toyama Prefectural University, [2]Nippon Suisan K. K., [3]NBRC)

[Introduction] In the research of investigating secondary metabolites from *Streptomyces* sp. NPS554, a marine derived actinomycete collected from Miyazaki Harbor, a new macrolide named akaemycin was isolated. In this presentation, the isolation, structure determination and bioactivity of akaemycin was reported.

[Methods and Results] According to the dereplication based on UV database, a novel compound named akaemycin was detected with maximum absorption near 252 nm in the products of strain NPS554. The butanol extraction of the culture medium was evaporated and further purified by different chromatography methods to obtain akaemycin. The molecular formula was determined as $C_{36}H_{56}O_{10}$ by calculation of HR-ESITOFMS and NMR data. The planar structure was elucidated by 1D- and 2D-NMR as a macrolide backbone with a bicyclic spiro-*bis*-tetrahydropyran ketal moiety. The relative configuration was determined by NOESY observation. Akaemycin showed activity against *Kocuria rhizophila* with a MIC of 9.6 μM.

akaemycin, Streptomyces, antibiotic

講演番号：4E23a08
講演日時、会場：3 月 29 日 10:27～ E 校舎 23 会場

放線菌 *Planomonospora sphaerica* から得られた抗菌ペプチドの単離と構造決定
Isolation and structural determination of antibacterial peptide from *Planomonospora sphaerica*
○小谷 真也[1]、井上 雄斗[1]、逸見 光[2]、亀山 眞由美[2] ([1]静岡大農、[2]農研機構)
○Shinya KODANI[1], Yuhto INOUE[1], Hikaru HEMMI[2], mayumi KAMEYAMA[2] ([1]Shizuoka Univ., [2]NARO)

[目的]これまで放線菌は様々な生理活性物質の探索源として用いられてきた。多くは、*Streptomyces* 属放線菌から得られており、希少放線菌の生理活性物質の探索は比較的例が少ない。その中でも、放線菌 *Planomonospora alba* から、抗菌ペプチド planosporicin が得られており、その活性と生合成が注目されている。このような背景のもと、我々は *Planomonospora* 属放線菌のスクリーニングを行い、*P. sphaerica* JCM9374 株の抽出物から抗菌ペプチドを見出した。その単離と部分構造の決定に関して発表する。
[方法] *P. sphaerica* JCM9374 株を ISP2 寒天培地により 30℃で 7 日間培養を行った。培養寒天培地の表層の気菌糸形成部分のみをかき取り、アセトンで抽出を行った。アセトン抽出物を減圧濃縮後、疎水性樹脂 CHP20P を用いた溶媒分画に付し、10%、60%、100%MeOH で順次溶出した。HPLC 分析により、目的ペプチドが 100%MeOH 画分に含まれていることを確認した。さらに、100%MeOH 画分から ODS カラムを用いた HPLC 分取により、純粋な目的ペプチドを得た。
[結果と考察]目的ペプチドは、ESI-MS を用いた精密質量分析の結果から、分子量 2155 Da で分子式 $C_{110}H_{146}N_{24}O_{22}$ であることが推定された。この分子式から Scifinder を用いて化合物検索を行ったところ、一致する化合物は得られず、新規化合物であることが示唆された。本ペプチドを加水分解後、PITC を用いた誘導体化を行い、HPLC によるアミノ酸分析を行ったところ、Gly 3、Pro 3、Ile 3、Leu 1、Arg 1、Tyr 1、Phe 1、Ser 1、Glu 1 のモル比でアミノ酸を検出した。さらに重 DMSO を溶媒として各種 NMR スペクトルの解析を行ったところ、アミノ酸分析で検出できたアミノ酸全てに加えて、Trp が 3 モル含まれることが明らかとなった。検出された 18 の全てのアミノ酸が直鎖でつながっているとすると、実際の ESI-MS の測定値は 18 Da 分子量が小さく、また MS/MS の測定でフラグメントが得られにくいことを考えると、環状ペプチドであることが予測される。本物質を、ペーパーディスク法を用いた抗菌活性試験に付したところ、グラム陽性菌 *Micrococcus luteus* に対し、10 μg/disk で抗菌活性が見られた。現在、全化学構造の決定に向けて NMR および化学分解法を用いたアミノ酸の配列の解析を行っており、その結果を発表する予定である。

Planomonospora sphaerica , antibacterial, peptide

講演番号：4E23a09
講演日時、会場：3 月 29 日 10:38～ E 校舎 23 会場

糸状性硫黄酸化細菌 *Thiothrix fructosivorans* 由来のマイクロチューブ形成多糖の構造決定

Structural analysis of the microtube-forming polysaccharide secreted by a filamentous sulfur-oxidizing bacterium, *Thiothrix fructosivorans*

○河崎 雄太[1]、成塚 理絵[1]、遠藤 智友樹[1]、稲田 敦[1]、近藤 敬子[2]、片平 正人[2]、武田 穣[1]([1]横国大院・工、[2]京大・エネルギー理工研)

○Yuta KAWASAKI[1], Rie NARIZUKA[1], Tomoyuki ENDO[1], Atsushi INADA[1], Keiko KONDO[2], Masato KATAHIRA[2], Minoru TAKEDA[1] ([1]Yokohama National Univ., [2]Kyoto Univ.)

【背景・目的】*Thiothrix* 属は γ-プロテオバクテリア綱に属する糸状性の硫黄酸化細菌で、水圏に広く分布する。*T. fructosivorans* は細胞列の伸長に連動して細胞列を囲むマイクロチューブ状構造体（鞘）を形成する。また、鞘の末端は閉じているとともに付着性を有することが知られている。鞘は基本となる細胞外高分子物質が自発的かつ自律的に凝集することにより形成されると考えられる。鞘形成高分子の構造と秩序だった凝集の機作を解明できれば、水中で自発的に形態形成する機能性高分子の設計への展望が開けると期待される。*T. fructosivorans* の鞘形成高分子は複合多糖であり、β-1,4-グルコサミノグルカン（GG）を基本骨格すなわち主鎖とし、グルコース残基の 3 位にフコースとペロサミン（4-アミノラムノース）から成る 2 糖がグリコシド結合していることがわかっている。しかし、主鎖のグルコサミン残基および側鎖のペロサミン残基のアミノ基の置換については確たる情報が無いのが現状である。アミノ基の置換は多糖間の静電的反発力を弱め会合を促すと予想され、その実態を把握することは高分子の挙動を理解するために不可欠であることから、解明を目指すこととした。

【方法・結果】*T. fructosivorans* をリゾチーム・NaOH・SDS で順次処理し、残渣として鞘を得た。その固体 NMR (^{13}C-CP-MAS)スペクトルを測定したところ、アセチル基と思しきシグナルが検出された。その強度はフコースおよびペロサミン残基由来のメチル基シグナルのおよそ半分であり、鞘形成多糖中のおよそ 50%のアミノ基はアセチル化されていると推察された。鞘に濃塩酸を加え氷中で 45 min の加水分解を行った後、ethyl *p*-aminobenzoate (ABEE)による 還元アミノ化を施して HPLC に供したところ、フコースと側鎖由来の 2 糖の存在が確認された。一方、鞘に無水酢酸を作用させて *N*-アセチル化を施した後に同様の分析を行ったところ、検出された 2 糖の大半は *N*-アセチル化されたものだった。すなわち、側鎖はさほど *N*-アセチル化を受けていないと予想された。したがって、*N*-アセチル化は主鎖である GG に対して高度に施されていると考えられた。分析に用いた鞘はそもそもアミノ基から置換基を取り去るおそれのある NaOH 処理を経たものであり、実際の *N*-アセチル化度は 50%よりも高い可能性がある。置換基を温存するためリゾチーム・プロテアーゼ・SDS・熱クロロホルム処理を施して得た鞘の ^{13}C-CP-MAS スペクトルからはおよそ 75%の *N*-アセチル化度が推算された。ところが、低温での濃塩酸処理によって遊離した側鎖由来の ABEE 化 2 糖は脱アセチル化物でも *N*-アセチル化物でもなかった。これを回収して溶液 NMR 解析を行ったところ、CH_3-CH-の部分構造を持つカルボン酸がペロサミン残基のアミノ基に結合していることが示唆された。

Thiothrix fructosivorans, structural analysis, sheath

講演番号：4E23a10
講演日時、会場：3 月 29 日 10:49～ E 校舎 23 会場

未開拓薬物資源タテヤママリモからの新規抗生物質の探索

Chemical investigation into "Tateyama-marimo" as a drug discovery resource

○架田 貴美[1]、奥 直也[1]、朴木 英治[2]、五十嵐 康弘[1]([1]富山県大・生工・生工研セ、[2]富山市科学博物館)
○ Atsumi HASADA[1], Naoya OKU[1], Hideharu HONOKI[2], Yasuhiro IGARASHI[1] ([1]Toyama Prefectural University, [2]Toyama Science Museum)

マリモ類はアオサ藻綱シオグサ目シオグサ科に分類される糸状性の淡水緑藻である。マリモ類と近縁種の分類は未だ定まっていないが[1, 2]、球状化する種類は限られており、マリモ *Aegagropila linnaei* とタテヤママリモ *Aegagropilopsis* sp.*"Tateyama"*[3] の 2 種のみである。後者はその名のとおり、1987 年に富山県立山町の民家から発見されたマリモの一種である。[4] マリモ類に近縁の *Cladophora*（シオグサ）属からは 25 種の物質が報告されているが、マリモ自体からはカロテノイドの一種が報告されているに過ぎない。[5]

タテヤママリモは国内 8 箇所(富山県立山町、北海道カムイト沼、北海道ポン沼、栃木県佐野市、滋賀県牧野町、兵庫県上群町、福岡県古賀町)での生息が確認されているが、国内最大の生息地は富山県立山町である。今回、タテヤママリモが大量に入手できたため、未開拓資源の有効利用を目指し、抗微生物物質の探索を試みた。

藻体 21 kg を 70%EtOH で抽出後、溶媒分画を行い、*n*-hexane 層、90％MeOH 層、*n*-BuOH 層、水層の 4 画分を得た。これらをカビ 6 株、酵母 2 株、グラム陽性菌 4 株、グラム陰性菌 4 株からなる 16 種類の検定菌に対する生育阻害試験に供したところ、*n*-BuOH 画分 (16.4 g)が多くの株に対し生育阻害活性を示した。そこで本画分を、生育が早く検出感度の高い黄色ブドウ球菌 *Staphylococcus aureus* と糸状菌 *Penicillium chrysogenum* に対する生育阻害活性を指標に、Sephadex LH-20 ゲルろ過クロマトグラフィー、ODS カラムクロマトグラフィー、Sepabeads SP20SS カラムクロマトグラフィー、PRP-1 カラムを用いた HPLC 分取にて順次精製した結果、活性物質 A(4.3 mg)および B(10.3 mg)を得た。NMR および MS スペクトル解析の結果、いずれも新規のエーテル型グリセロ糖脂質であることが判明した。現在、立体構造を含めた詳細な構造研究を進めている。

1. Christian, B.; Charles, J. O.; Wim, S.; Frederick, L. *J. Phycol.* **2012**, *48,* 808-825.
2. マリモ保護管理計画 2012 年 2 月阿寒湖のマリモ保護対策検討委員会
3. 立山マリモ生息状況調査報告書 1995 年 3 月 31 日
   立山マリモ生息状況調査実行委員会　立山町教育委員会
4. Kanda,F. *J. Phycol.* **1991**, *39*, 27-30.
5. Yoshii, Y.; Hanyuda, T.; Wakana, I.; Miyaji, K.; Arai, S.; Ueda, K.; Inouye, I. *J. Phycol.* **2004**, *40*, 1170-1177

Tateyama-marimo, ether lipid, *Aegagropilopsis* sp.

講演番号：4E23a11
講演日時、会場：3 月 29 日 11:10～ E 校舎 23 会場

希少食用ラン藻スイゼンジノリ由来新規 sacrolide 類縁体の発見

Discovery of sacrolide analogs from an edible cyanobacterium *Aphanothece sacrum*

○端 紗也加[1]、松本 京[1]、奥 直也[1]、丹生 慶次郎[2]、五十嵐 康弘[1]（[1]富山県大生工・生工研セ、[2]水前寺のり本舗　丹誠堂）
○ Sayaka HANA[1], Miyako MATSUMOTO[1], Naoya OKU[1], Keijiroh TANSEI[2], Yasuhiro IGARASHI[1] ([1]Biotech Res Center Toyama Pref Univ., [2]Suizenjinori Hompo Tanseido.)

前年度の大会にて福岡県黄金川にのみ生息する希少食用ラン藻スイゼンジノリ（*Aphanothece sacrum*）より、新規抗微生物性 14 員環マクロライド sacrolide A[1] を報告した。さらなる活性物質の探索を行った結果、新規類縁体を発見した。

藻体 5 kg をエタノールで抽出後、溶媒分画を行い、ヘキサン層、90%メタノール層、60%メタノール層を得た。*Penicillium chrysogenum* に対して抗真菌活性を示したヘキサン層と 90%メタノール層を、ODS カラムクロマトグラフィー、Sephadex LH-20 ゲルろ過クロマトグラフィー、シリカゲルクロマトグラフィー、逆相 HPLC を用いて精製した結果、2 つの sacrolide 類縁体を得た。NMR および MS スペクトル解析の結果、類縁体の 1 つは sacrolide A の立体異性体であり、もう 1 つは側鎖のオレフィンが水素化されたものと推定された。これらの収量が微量であったことから、生物活性の評価のため、新たに抽出・分画を進めている。

sacrolide A はα-リノレン酸からアレンオキシドを介して生合成されると推定されるが、今回その立体異性体が取得できたことから、本物質は他のオキシリピン同様、ストレス応答物質であり、少なくともアレンオキシドからγ-ケトールの生成は非酵素的に進むことが明らかとなった。

〈参考文献〉

1. Oku, N.; Matsumoto, M.; Tansei, K.; Igarashi, Y. *Beilstein. J. Org. Chem.* **2014**, *10*, 1808-1816.

sacrolide A, cyanobacterium, *Aphanothece sacrum*

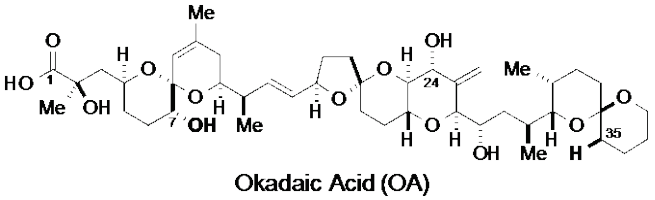
講演番号：4E23a12
講演日時、会場：3 月 29 日 11:21～ E 校舎 23 会場

クロイソカイメンに共生する微生物の純化および二次代謝産物の構造研究

Isolation of the secondary metabolite from the symbiotic bacteria of the marine sponge Halichondria okadai

○岡田 華弥、長 由扶子、山下 まり、此木 敬一 (東北大院農)
○Kayo Okada, Yuko Cho, Mari Yotsu-Yamashita, Keiichi Konoki (Tohoku Univ.)

【背景】



クロイソカイメン（*Halichondria okadai*）より単離されたオカダ酸（okadaic acid, OA）は、タンパク質脱リン酸化酵素（protein phosphatase, PP）PP1、PP2A を特異的に阻害し強力な発癌プロモーターとして働くことが知られている。軟体動物のクロイソカイメンは、海水からプランクトンを濾しとり、栄養源とするフィルターフィーダーであり、体内に無数の共生菌が存在する。そのため OA をはじめとする有毒二次代謝産物はクロイソカイメン共生菌の生産物、あるいは蓄積物であると推定されている。しかし、共生菌の大半は難培養性であることもあり、未だその生産生物は同定されていない。そこで本研究では OA を含む生理活性物質生産菌をクロイソカイメン中から探索することを目的とし、クロイソカイメン共生菌の純化・培養および菌体抽出液を用いた生理活性成分の抽出・分離・精製を行ったので報告する。

【方法・結果】

神奈川県三浦半島で採取した新鮮なクロイソカイメンを細断し、EDTA を含む CMSFASW (Calcium-, Magnesium-Free Artificial Sea Water) 中に浸漬することで共生菌の懸濁液を得た。この懸濁液をナイロンメッシュで分画した後、濾液を寒天培地に播種した。濃度、温度、培地、酸素、培養方法の各種条件を組み合わせ、共生菌の成育を観察し、純化・培養を行った。得られた各共生菌は 16S rDNA 領域の塩基配列に基づいて菌種の解析を進め、合計 48 種類の菌株を同定した。続いて液体培養を行い、2-3 週間培養後、菌体より酢酸エチル可溶性画分を抽出した。抽出物について細胞毒性試験、溶血活性試験、ブラインシュリンプ致死活性試験を行った。その結果、10 株においていずれかの活性が認められた。そのうちの 1 株について、シリカゲルオープンカラムで分画したのち、UV 吸収を指標として HPLC を用いて活性成分を分取した。分取した活性画分は、高分解能質量分析および NMR 分析に供し、構造解析を行うことでその平面構造を推定した。

secondary metabolites, symbiosis bacteria, Halichondria okadai

講演番号：4E23a13
講演日時、会場：3 月 29 日 11:32～ E 校舎 23 会場

Aspergillus ustus 由来新規イソキノリンアルカロイド
Novel isoquinoline alkaloid from *Aspergillus ustus*
○齊藤 太樹、仁戸田 照彦、神崎 浩 (岡山大院・環境生命)
○Taiki SAITO, Teruhiko NITODA, Hiroshi KANZAKI (Okayama Univ.)

【目的】2 種類の微生物を組み合わせる培養法により，単独微生物では生産されない新規生理活性物質が生産されることが知られている。我々は*Aspergillus ustus* NSC-F038 株と *Penicillium aurantiogriseum* IAM-13793 株の組み合わせ培養を行ったところ, 各々の単独培養では見出されない化合物 (TS-1)の生産を確認した [1]。また *A. ustus* NSC-F038 株の代謝産物中に，組み合わせ培養によって培養液中の量が減少する化合物 (TS-2)がみられ，UV 吸収スペクトルの類似性から TS-2 は TS-1 の類縁体であると示唆された。TS-2 は構造解析により新規イソキノリンアルカロイドと判明したことから, 今回報告する。
【方法・結果】*A. ustus* NSC-F038 株の 9 日間液体静置培養 (培地量 126 mL)で得られた培養液上清の酢酸エチル抽出物を分取 HPLC に供すことにより，TS-2 を 2.64 mg 単離した。*A. ustus* が生産する化合物の文献検索を行ったところ，イソキノリンアルカロイド TMC-120 類についての報告があり [2]，UV 吸収スペクトルの類似性から, TS-2 はそれらの類縁化合物と考えられた。TS-2 の質量分析の結果，positive ion mode で *m/z* 258 に$[M+H]^+$，*m/z* 280 に$[M+Na]^+$イオンが検出され，また高分解能 MS 測定結果から分子式を $C_{15}H_{15}NO_3$ と決定した。次に TS-2 と同じ分子式の TMC-120C と ^{1}H-NMR スペクトルを比較したところ酷似していた。両者の相違点として，TMC-120C ではイソプロピル基の 2 つのメチル基のシグナルがダブレットであるのに対し，TS-2 では低磁場シフトし，かつシングレットで観測された。また TMC-120C ではイソプロピル基のメチンプロトンが δ 2.42 にマルチプレットで，ヒドロキシプロトンが δ 7.75 に観測されるのに対し，TS-2 では δ 2.42，δ 7.75 のシグナルは存在せず，替わりに δ 3.49，δ 4.64 にシングレットが観測された。さらに HSQC 測定において TS-2 は δ 3.49 と 11 位の炭素の相関がなく，δ 4.64 と 2 位の炭素の相関があった。以上の結果から TS-2 は TMC-120C のイソプロピル基のメチンプロトンが OH 基に, 2 位の OH 基が H に置換された 2-(1-hydroxy-1-methylethyl)-7-methylfuro[3,2-*h*]isoquinoline-3(2*H*)-one と決定した(図)。今後は TS-2 が *P. aurantiogriseum* により TS-1 に変換されるか検討する。

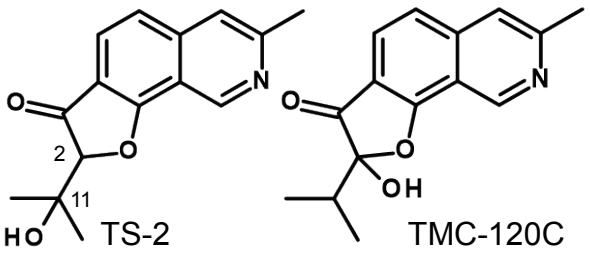


図　TS-2 と TMC-120C の構造

[1] 齊藤,小坂,仁戸田,神崎, 2013 年度日本農芸化学会関西・中四国・西日本支部合同大会講演要旨集, p 50
[2] J. Kohno *et al.*, *Tetrahedron*, **55**, 11247-11252 (1999)

Aspergillus ustus, *Penicillium aurantiogriseum*, isoquinoline

講演番号：4E23a14
講演日時、会場：3 月 29 日 11:43～ E 校舎 23 会場

β-*N*-acetylglucosaminidase 阻害物質 TMG-chitotriomycin の新規類縁体の単離，構造解析

Isolation and structural analysis of novel analogs of the β-*N*-acetylglucosaminidase inhibitor TMG-chitotriomycin

○淺尾 昂平、神崎 浩、仁戸田 照彦（岡山大院・環境生命）
○Kohei ASAO, Hiroshi KANZAKI, Teruhiko NITODA (Okayama Univ.)

【目的】キチン分解酵素に対する阻害物質は昆虫成長制御物質や抗菌剤への応用が期待されている。我々は，微生物産物中からキチン分解酵素である β-*N*-acetylglucosaminidase (GlcNAcase)の阻害物質の探索を行い，その結果，放線菌 *Streptomyces anulatus* NBRC13369 株が生産する GlcNAcase 阻害物質 TMG-chitotriomycin (HU-1)を見出した[1)]。また，HU-1 の特徴的なプロダクトイオン (*m/z* 348)に注目した LC-MS/MS によって，本菌株培養液から GlcNAc 残基数が異なる HU-1 類縁体を単離した[2)]。さらに，HU-1 が陽イオン性であることを利用した前処理と，特徴的なプロダクトイオン (*m/z* 348)の生成を指標とした LC-MS/MS を組み合わせることにより, 新たな HU-1 類縁体 KA-1, 2 を検出した[3)]。KA-1 は HU-1 (*m/z* 832)より 84 Da 大きい分子量関連イオンピーク (*m/z* 916)を, KA-2 は 42 Da 大きい分子量関連イオンピーク (*m/z* 874)を示した。HU-1 はユニークな阻害特異性を示すことから，KA-1, 2 の構造と活性に関心が持たれる。そこで，本研究では KA-1, 2 の単離，構造解析を目的とした。

【方法・結果】HU-1 の精製法を参考に，GlcNAcase 阻害活性および LC-MS 結果を指標に KA-1, 2 の精製を行った。本菌株培養液を，活性炭カラム，陽イオン交換カラム，脱塩のための活性炭カラムに供し順次精製を行い, GlcNAcase 阻害活性の高い画分を得た。この画分には LC-MS より KA-1, 2, HU-1 が含まれていることが確認された。この画分を陽イオン交換カラムによる分取 HPLC およびグラファイトカーボンカラムによる分取 HPLC に供することで, KA-1, 2 を単離した。単離した KA-2 を ^{1}H-NMR に供し，HU-1 の ^{1}H-NMR スペクトルと比較した。その結果，KA-2 は HU-1 よりアセチル基の数が 1 つ多いことが明らかとなった。これは，MS において KA-2 が HU-1 より 42 Da 大きい分子量関連イオンピークを示すことに一致する。また，1 つの GlcNAc 残基の 5 位と 6 位のプロトンが低磁場にシフトしていることがわかり，KA-2 は HU-1 の 3 つの GlcNAc 残基のうち 1 つの残基の 6 位の水酸基がアセチル化された構造であることが示唆された。また, KA-2 はハスモンヨトウ蛹 GlcNAcase に対し HU-1 と同程度の阻害活性を示した。一方，KA-1 は単離後すぐに KA-2, HU-1 へ変化し始め，非常に不安定であることが明らかとなった。KA-1, 2 混合物は KA-2 や HU-1 とほぼ同程度の阻害活性を示し，KA-1 も阻害活性を有する可能性が示唆された。KA-1 は KA-2 にアセチル基がさらに 1 つ付加した構造と考えられ，本菌株はアセチル基の数が異なる複数の HU-1 類縁体を生産することが示唆された。

1) *J. Am. Chem. Soc.*, **130**, 4146-4152 (2008)　2) *Org. Biomol. Chem.*, **9**, 2943-2951 (2011)
3) 淺尾,神崎,仁戸田, 2013 年度日本農芸化学会中四国支部第 36 回講演会 講演要旨集, p29

β-*N*-acetylglucosaminidase inhibitor, *Streptomyces anulatus*, lc-ms/ms

講演番号：4D23a01
講演日時、会場：3 月 29 日 09:00～ D 校舎 23 会場

ヘテロ接合性喪失による無性生殖するカンキツの遺伝的分化

Genetic diversification of asexually reproducing *Citrus* species by loss of heterozygosity

○永野 幸生[1]、PENJOR Tshering[2]、三村 高史[2]、松本 亮司[2]、山本 雅史[3]([1]佐賀大総合分析セ、[2]佐賀大農、[3]鹿児島大農)
○Yukio NAGANO[1], Tshering PENJOR[2], Takashi MIMURA[2], Ryoji MATSUMOTO[2], Masashi YAMAMOTO[3] ([1]Anal. Res. Center, Saga Univ., [2]Fac. Agri., Saga Univ., [3]Fac. Agri., Kagoshima Univ.)

カンキツの多くは無性的に繁殖する。それにも関わらず遺伝的分化がおこるため様々な栽培品種が存在する。我々は無性生殖するカンキツの遺伝的分化の様相に興味をもって研究をした。今回の研究に用いたのは、カンキツの一種ライム(*Citrus aurantifolia*)であり、無性的に繁殖する。このライムの系統間の遺伝子型の差異を解析した。

具体的にインドネシアから佐賀大学に 1988 年に導入されたライム 3 系統、及び、2009 年のブータンにおける調査で見つけたライム 5 系統について、次世代シーケンサーを用いて解析した。次世代シーケンサーによる解析では Restriction site-associated DNA sequencing (RAD-seq)という部分ゲノム解読法用いた。

その結果、遺伝的分化がおこる際のメカニズムとして、ヘテロザイガスな遺伝子座がホモザイガスな遺伝子座に変わる現象であるヘテロ接合性喪失(Loss of Heterozygosity; LOH)が主たる役割を果たしていることがわかった。

LOH は、変異したがん抑制遺伝子と対立する正常型がん抑制遺伝子を失い、変異したがん抑制遺伝子のみになる機構として、研究が盛んに行われてきた。また、iPS 細胞の品質管理という面でも注目されている。この機構がライムの遺伝的分化においても重要な役割を果たしていたのである。しかし、がん細胞で観察される LOH と異なる点もあった。がん細胞では、染色体のごく一部だけでおこる LOH と、染色体の大きな領域または染色体一本全部でおこる LOH が知られている。一方、我々がライムで観察したものは前者だけであった。ライムでも大規模な LOH がおこるけれども、その結果、植物の形質が大きく変化してしまうため、そのような植物は人が利用しない、つまり人が介在する淘汰がおこっていると我々は考えている。

また、LOH を利用した、カンキツの育種や品質管理を進めるための戦略についても議論する。

Tshering Penjor, Mimura, T., Matsumoto, R., Yamamoto, M. & Nagano, Y. Characterization of limes (*Citrus aurantifolia*) grown in Bhutan and Indonesia using high-throughput sequencing. Sci. Rep. 4, 4853; DOI:10.1038/srep04853 (2014).

loss of heterozygosity, citrus, genome

講演番号：4D23a02
講演日時、会場：3 月 29 日 09:11～ D 校舎 23 会場

シロイヌナズナにおける IAN family 遺伝子の分子生物学的および形態学的解析

Molecular biological and morphological analyses of IAN family genes in *Arabidopsis thaliana*

○久場 遥[1]、上野 可南子[1]、塩田 真友[2]、玉栄 空輝[1]、藤山 加奈子[1]、田代 淳[1]、市原 直巳[1]、高坂 智之[2]、内海 俊彦[1,2]、山田 守[1,2] ([1]山口大学大学院　医学系研究科　応用分子生命科学系専攻、[2]山口大学大学　農学部　生物機能科学科)

○Haruka KUBA[1], Kanako UENO[1], Mayu SHIOTA[2], Takaki TAMAEI[1], Kanako FUJIYAMA[1], JUN TASHIRO[1], Naomi ICHIHARA[1], Tomoyuki KOSAKA[2], Toshihiko UTSUMI[1,2], Mamoru YAMADA[1,2] ([1]Yamaguchi University Graduate School of Medicine Applied Molecular Bioscience, [2]Yamaguchi University)

[目的]

IAN family は機能的にほとんど特徴付けられていない GTP 結合タンパク質であり、マウスでは *IAN1* や *IAN4*、*IAN5* が差次的に発現し、T リンパ球の分化や生存選択において重大な役割を担う。一方、シロイヌナズナでは細菌への植物抵抗性に関与する *AIG1* や *AIG2* が確認されている。IAN タンパク質のさらなる機能解明を求め様々な植物を対象に配列相同性検索を行ったところ、シロイヌナズナにおいて *AIG1* を含む 14 個の遺伝子が IAN family 遺伝子（*AIG1-1*～*14*）として確認された。そこで本実験では、*GUS*-プロモーター活性分析や欠損株の表現型観察から 14 遺伝子の機能解明を試みた。

[方法・結果]

遺伝子配列の上流 2000 bp のプロモーター領域と GUS 遺伝子を融合したものを植物体に組み込み 13 遺伝子の発現パターンを分析した結果、発芽後から種子を形成するまでの様々な時期や組織で発現が検出された。その中で、*AIG1-2* と *AIG1-14* はどの時期においても一貫して発現していた。欠損株の表現型でも、*AIG1-14* ホモ欠損株において発芽後の著しい生育不良が観察されたことから、*AIG1-14* は植物の生育に必要であることが示唆された。一方、発芽後 10 日以内の植物体で 13 遺伝子中 10 遺伝子の発現が根において検出されたため、根の生育に大きく関与していることも示唆された。特に、発芽後 10 日以内の根毛で特異的な発現が検出された *AIG1-7* と *AIG1-11* のホモ欠損株では、野生株に比べて根毛の長さが短くなっていた。これらの結果から、シロイヌナズナに存在する IAN family 遺伝子は生育や発生を制御する因子であることが示唆された。また、アミノ酸配列に対する脂質修飾解析の結果、14 遺伝子中 11 遺伝子には細胞膜に存在する GTP 結合タンパク質に特徴的な脂質修飾配列が存在していたことから、機能解明の手掛かりとして脂質修飾を解析中である。

Ian family, *Arabidopsis thaliana*, GUS-promoter activity

講演番号：4D23a03
講演日時、会場：3 月 29 日 09:22～ D 校舎 23 会場

チューリップの花弁特異的 *TgMYB1* プロモーターにおけるシスエレメントの同定と花色改変への応用

Identification of *cis*-element for tulip petal-specific *TgMYB1* promoter and its application for modifying a flower color

○荘司 和明（富山県農総技セ・農研）
○Kazuaki Shoji (Toyama pref. agric.for.and fish. res. ctr.)

【目的】チューリップ（*Tulipa gesneriana*）の花底部で見られる青色発現には、鉄イオンが必須であり、液胞型鉄イオントランスポーター遺伝子（*TgVit1*）の発現が関与していることを明らかにしている（Shoji et al., 2007, 2010）。

TgVit1 を花弁全体で発現させた「青いチューリップ」を実現するため、花弁特異的に発現している *R2R3-MYB* 遺伝子（*TgMYB1*）をクローン化し、そのプロモーター領域（1.2 kbp）の単離と花弁特異的に遺伝子発現を誘導するシスエレメント配列の同定を行った。さらに、本プロモーターを *TgVit1* に繋ぎ花弁全体での発現を誘導したチューリップの組換え体を作出したので報告する。

【方法】*TgMYB1*プロモーターと*TgVit1*を繋いだ遺伝子導入用ベクターをパーティクルガン法で‘紫水晶’花弁の紫色細胞に遺伝子導入すると、形質転換細胞は青色に変化する。この性質を利用することによりプロモーター活性の有無を生細胞で評価することが可能である。今回、inverse PCR法にて1 bp 単位で詳細にプロモーター活性を評価し、シスエレメント配列を同定した。さらに、*TgMYB1*プロモーターに*TgVit1*遺伝子を繋いだ遺伝子発現ベクターをチューリップ品種‘夢の紫’の花茎カルスにパーティクルガン法にて遺伝子導入を行った。遺伝子導入細胞をビアラホス10 mg/Lで選抜後、再分化誘導し遺伝子導入個体を得た。

【結果】Inverse PCR 法により欠失変異を導入した結果、プロモーター活性が低下する配列を特定した。その結果、TCAT の 3 つのタンデム配列が *TgMYB1* プロモーターにおいて花弁特異性を決めるシスエレメントであることが示唆された。また、本プロモーターに *TgVit1* を繋ぎビアラホス耐性遺伝子(Bar)をもつベクターを構築した。このベクターを花茎カルス約 2,000 個に遺伝子導入後、ビアラホスによる細胞選抜および再分化誘導により 21 個体の組換え体を得た。約 5 年間球根の育成を続けた結果、1 個体で花器官の分化が見られたので、花色改変の効果について報告する。

tulip, transporter, promoter

講演番号：4D23a04
講演日時、会場：3 月 29 日 09:33～ D 校舎 23 会場

イネのサクラネチン生合成酵素遺伝子 *OsNOMT* の転写を制御する因子の探索

Transcription factors regulating the *OsNOMT* expression, a flavonoid phytoalexin-biosynthetic gene in rice

○小川 哲史[1]、宮本 皓司[2]、山根 久和[2]、野尻 秀昭[1]、岡田 憲典[1] ([1]東大・生物工学セ、[2]帝京大・バイオ)
○ Satoshi OGAWA[1], Koji MIYAMOTO[2], Hisakazu YAMANE[2], Hideaki NOJIRI[1], Kazunori OKADA[1] ([1]The Univ. of Tokyo, [2]Teikyo Univ.)

【背景と目的】イネのフラボノイド型化合物であるサクラネチンは、病原菌感染時にイネ葉身に蓄積し抗菌活性を発揮する主要なファイトアレキシンの一つと考えられている。サクラネチン生合成において、naringenin 7-*O*-methyltransferase (NOMT) が最終段階を担うことが示されていたが、最近我々は NOMT をコードする遺伝子 *OsNOMT* をイネから単離した [1)]。また、*OsNOMT* の発現を RNAi 法により抑制するとサクラネチンの誘導的な生産が抑えられることから、*OsNOMT* がサクラネチン生合成を担う必須遺伝子であることも判明した。我々はこれまでに、サクラネチンの生産誘導は植物ホルモンであるジャスモン酸（JA）を起点としたシグナル伝達に依存することを明らかにしていたが [2)]、昨年度本大会において *OsNOMT* の発現誘導も JA シグナルに依存することを報告した。しかし、*OsNOMT* の発現機構の詳細については明らかになっていない。そこで本研究では、*OsNOMT* の JA 依存的な発現制御機構の解明に向け、*OsNOMT* 5'上流域を用いたプロモーター解析により *OsNOMT* の転写を制御する因子を探索した。

【結果】JA 生合成変異株 *cpm2* においては塩化銅処理時に JA シグナルがはたらかなくなり、サクラネチンの生産誘導も起こらなくなる。その条件下では *OsNOMT* の発現を制御する転写制御因子の発現も抑制されると考え、野生型イネと *cpm2* の葉身に水または塩化銅水溶液を処理しトランスクリプトーム解析を行った。その結果、*OsNOMT* に先立ち JA 依存的に誘導される遺伝子として *OsMYC2* やフラボノイド生合成において重要な役割を有すると考えられる *MYB* 様転写因子が複数選抜された。これらの遺伝子について *OsNOMT* の発現制御への関与を調べるため、*OsNOMT* の転写開始点上流 5 kb をルシフェラーゼ遺伝子に連結し、イネ葉身を用いてレポータージーンアッセイを行う際のエフェクターとした。はじめに OsMYC2 をエフェクターとして用いた試行の結果、OsMYC2 によりレポーター活性に明らかな上昇が見られた。さらに、デリーションシリーズを用いた試行の結果、活性化に必要な領域は転写開始点上流 50 bp 以内に存在することが分かった。この領域には MYB 結合配列が存在することから、現在トランスクリプトーム解析で選抜された MYB 転写因子を含む他のエフェクターを用いた解析を行っており、*OsNOMT* の転写を活性化したものについてプロモーター領域への結合を解析することで、*OsNOMT* の発現を直接制御する転写制御因子の同定を試みている。

1) Shimizu *et al*., *J. Biol. Chem*., 287(23): 19315-25 (2012)
2) Shimizu *et al*., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 77(7): 1556-64 (2013)

rice, flavonoid phytoalexin, jasmonic acid

講演番号：4D23a05
講演日時、会場：3 月 29 日 09:44～ D 校舎 23 会場

イネのジテルペン型ファイトアレキシン生産に関与する bZIP 型転写因子 OsTGAP1 の根における機能

Participation of the bZIP transcription factor OsTGAP1 in the production of diterpenoid phytoalexins in rice roots

○吉田 悠里[1]、宮本 皓司[2]、山根 久和[2]、野尻 秀昭[1]、岡田 憲典[1] ([1] 東大・生物工学セ、[2] 帝京大・バイオ)
○ Yuri YOSHIDA[1], Koji MIYAMOTO[2], Hisakazu YAMANE[2], Hideaki NOJIRI[1], Kazunori OKADA[1] ([1]The Univ. of Tokyo, [2]Teikyo Univ.)

イネは病原菌感染や重金属および紫外線への暴露などの環境ストレスに応答し、抗菌性の二次代謝化合物（Specialized metabolite）として、テルペノイド型とフラボノイド型のファイトアレキシンを誘導的に生産する。主要なテルペノイド型のファイトアレキシンとしては、ジテルペンのモミラクトン類とファイトカサン類が同定されており、これらはメチルエリスリトールリン酸 (MEP) 経路由来のゲラニルゲラニル２リン酸（GGDP）を共通の前駆体として生合成される。モミラクトンおよびファイトカサンの生合成酵素遺伝子は、イネの染色体上においてそれぞれ遺伝子クラスターを形成する一方で、MEP 経路の遺伝子群は染色体上に散らばって存在するが、これらのジテルペン型ファイトアレキシン生合成に関わる一連の遺伝子は、ストレスに応答して同調的な発現誘導を受けることが知られている。また、このような遺伝子レベル、化合物レベルでの応答は、イネ培養細胞にキチンエリシターを処理した場合においても再現される。我々はこれまでに、イネ培養細胞を用いた解析から、キチンエリシター応答性 bZIP 型転写因子 OsTGAP1 が、エリシター誘導的な全てのジテルペン型ファイトアレキシン生合成関連遺伝子の発現誘導に関与し、その過剰発現によりジテルペン型ファイトアレキシンの生産が劇的に増加することを示した（Okada et al. 2009）。さらに、OsTGAP1 のゲノム上の結合領域の同定から、MEP 経路のデオキシキシルロースリン酸合成酵素遺伝子 *OsDXS3* は OsTGAP1 により直接的に制御を受けるが、クラスター内の生合成遺伝子群については、プロモーター付近への OsTGAP1 の結合によって同調的な誘導が引き起こされるわけではないことを報告した（Miyamoto et al. 2014）。

これまでイネ培養細胞を用いて解析を進めてきたが、本年度はイネ植物体における OsTGAP1 の機能について検討した。まず、植物体における発現解析から、根での発現量が地上部と比較して顕著に高いことが明らかとなった。さらに、この根での OsTGAP1 の発現は、ジャスモン酸による浸漬処理を行うことで誘導されることもわかった。そこで、OsTGAP1 の発現量が低下した Tos17 挿入変異体を用いて、ジャスモン酸誘導性のジテルペン型ファイトアレキシン生産量の変化を解析した。その結果、野生型植物で見られたジャスモン酸誘導性のファイトアレキシン蓄積量の増加は、変異体の根において抑制される傾向が示された。ジテルペン型ファイトアレキシンは根で合成され根圏に滲出することも知られていることから、OsTGAP1 が根におけるジテルペン型ファイトアレキシン生産の制御に関与している可能性が示唆された。現在、根でのエリシター誘導的なジテルペン型ファイトアレキシン生合成遺伝子の発現解析を進めるとともに、 OsTGAP1 過剰発現体植物を用いてジテルペン型ファイトアレキシン生産性の変化の解析および生合成遺伝子の発現解析を行っている。

Okada A et al. J. Biol. Chem. 284(39):26510-26518 (2009)
Miyamoto K et al. PLOS ONE 9(8):e105823 (2014)

Phytoalexin, root specificity, Rice

講演番号：4D23a06
講演日時、会場：3 月 29 日 10:05～ D 校舎 23 会場

一酸化窒素による AtNAS1 遺伝子の発現調節機構の解析
Regulatory mechanisms of *AtNAS1* expression by nitric oxide
○打田 拓也、小原 達矢、矢野 俊介、土井 萌子、宇野 知秀、金丸 研吾、山形 裕士（神大院農・生機科）
○Takuya UCHIDA, Tatsuya OHARA, Syunsuke YANO, Moeko DOI, Toshihide UNO, Kengo KANAMARU, Hiroshi YAMAGATA (Grad. School Agr. Sci., Kobe Univ)

［目的］一酸化窒素（NO）は植物において根の伸長や鉄の吸収、開花、花粉管伸長、気孔の閉口、各種植物ホルモンのシグナル伝達、病原菌の感染や非生物的ストレスに対する応答等の様々な生理的過程に関与する重要な細胞内シグナル分子である。動物では、NO の作用機構や cGMP を介するシグナル伝達機構などがよく知られているが、植物における NO のシグナル伝達や遺伝子発現調節機構には不明な点が多い。本研究では、NO による植物の遺伝子発現調節機構を転写レベルで明らかにすることを目的とした。

［方法・結果］シロイヌナズナの光独立栄養培養細胞（T87 細胞）を用いた DNA マイクロアレイ解析により、NO によって発現が強く誘導される遺伝子の一つとしてニコチアナミン合成酵素遺伝子（*AtNAS1*）が見出された。定量的 RT-PCR により、*AtNAS1* の発現が NO により強く誘導されることを確認した。また、5’末端から様々な長さに削り込んだ *AtNAS1* プロモーターの部分配列とβ-グルクロニダーゼ（GUS）レポーター遺伝子の融合遺伝子を T87 細胞のプロトプラストに PEG 法で導入し、100 μM ニトロプルシドナトリウム（SNP, NO 発生剤）で 3 時間処理後、細胞抽出液中の GUS 活性を測定する機能欠失型の一過的発現解析より、*AtNAS1* の翻訳開始コドンの上流-94～-82 塩基の配列（GCGAGGGTTAAAG）が *AtNAS1* の NO 応答に必要であることを明らかにした。さらに、この配列と GUS の融合遺伝子を用いた機能獲得型の一過的発現解析より、この配列が *AtNAS1* の NO 応答に必要かつ十分な配列（NO-responsive element, NORE）であることを示した。NORE は転写因子 GT-1 の標的配列を含んでいたので、AtGT-1 を大腸菌で発現・精製し、組換え AtGT-1 が NORE に強く結合することを EMSA で示した。さらに、NORE に変異を導入したコンピティターを用い、結合には GGTTAA 配列が重要であることを示した。以上より、AtGT-1 または近縁の trihelix ファミリーの転写因子が NO による *AtNAS1* の発現誘導に関与していることが示唆された。一方、近年転写因子の S-ニトロシル化による標的配列への結合能の変化が報告されている。そこで 5 mM SNP で処理した組換え AtGT-1 の NORE への結合を EMSA で調べたが、結合能の増加は認められなかったことから、S-ニトロシル化の関与の可能性は低いと考えられた。

Arabidopsis thaliana, nicotianamine synthase, nitric oxide

講演番号：4D23a07
講演日時、会場：3 月 29 日 10:16～ D 校舎 23 会場

青色光/UV-A シグナルによるダイズ ELIP 遺伝子の転写調節機構

Regulatory mechanisms of GmELIP expression by blue-light/UV-A signaling

○北條 昭弘[1]、桑本 知[1]、岸本 光菜[2]、宇野 知秀[1]、金丸 研吾[1]、山形 裕士[1]([1]神大院農・生機科、[2]神大農・生機科)
○Akihiro HOJO[1], Satoru KUWAMOTO[1], Mitsuna KISHIMOTO[2], Tomohide UNO[1], Kengo KANAMARU[1], Hiroshi YAMAGATA[1] ([1]Grad. School Agr. Sci., Kobe Univ., [2]Fac. Agr., Kobe Univ.)

[目的]　ダイズ ELIP (early light-inducible protein) 遺伝子 *(GmELIP)* の発現は青色光/UV-A 照射により特異的に誘導される。*GmELIP* プロモーター中の GT-1-like box と G box の隣接する 2 つのシスエレメントが青色光/UV-A 応答に必要かつ十分な制御配列である。転写因子 GmGT-1 はこれら両シスエレメントに結合するが、両シスエレメントのどちらか一方にしか同時に結合できないことを報告した。一方、G-box は bZIP 型転写因子の標的配列でもある。そこで、今回は青色光/UV-A による *GmELIP* の発現誘導に関与する bZIP 型転写因子を探索した。また、*GmELIP* の青色光/UV-A シグナルにおける GmGT-1 のリン酸化の関与を調べた。

[方法・結果]　5 日間暗所適応したダイズ光独立栄養培養細胞（SB-P 細胞）に、UV-A を 3 時間照射すると *GmELIP* mRNA 量は 10 倍に増加した。*GmELIP* の UV-A による発現誘導は 300 μM のシクロヘキシミドによってほぼ完全に阻害されたことから、この過程には新たなタンパク質合成が必要であることが示唆された。そこで、SB-P 細胞を用いた DNA マイクロアレイ分析により、UV-A 照射によって発現が誘導される遺伝子を網羅的に調べた。*GmELIP* は UV-A によって最も強く誘導される遺伝子の一つであった。また、N 末端側に RING finger ドメイン、C 末端側に HY5 と相同性の高い bZIP ドメインを有する bZIP 型転写因子、GmbZIP36 が UV-A で強く誘導される遺伝子として見出された。*GmELIP* の mRNA 量は UV-A 照射 3 時間後から増加するが、*GmbZIP36* の UV-A による発現誘導はそれに先行していた。これらの結果、GmbZIP36 が UV-A による *GmELIP* 発現誘導に関与している可能性が示唆された。現在、大腸菌で発現、精製した組換え GmbZIP36 の DNA 結合特性等を解析中である。一方、シロイヌナズナ GT-1 (AtGT-1)分子中の Thr133 は赤色光/遠赤色光シグナルによりリン酸化され、*rbcS-3A* プロモーター中の GT-1 box への結合が強くなることが報告されているが、それに対応する GmGT-1 の Thr112 に擬似リン酸化変異を導入した組換え GmGT-1 の上記の両シスエレメントへの結合能は変化しなかったことから、青色光/UV-A と赤色光/遠赤色光シグナル伝達における GmGT-1 と AtGT-1 の機能は異なることが示唆された。

ELIP, early light-inducible protein, GT-1, bZIP, Glycine max, blue-light/UV-A signaling, HY5

講演番号：4D23a08
講演日時、会場：3 月 29 日 10:27～ D 校舎 23 会場

ククミシン遺伝子の果実特異的発現機構 - 転写因子と形質転換トマトにおける発現の解析 -

Mechanisms of fruit-specific expression of *cucumisin* - Analyses of transcription factors and expression of *cucumisin* promoter in transgenic tomatoes -

○岡田 香[1]、河野 美貴[1]、古川 温子[1]、家藤 愛梨[2]、宇野 知秀[1]、金丸 研吾[1]、山形 裕士[1] ([1]神戸大院農、[2]神戸大農)

○Kaori OKADA[1], Miki KONO[1], Atsuko FURUKAWA[1], Airi IEFUJI[2], Tomohide UNO[1], Kengo KANAMARU[1], Hiroshi YAMAGATA[1] ([1]Grad. School Agr. Sci., Kobe Univ., [2]Fac. Agr., Kobe Univ.)

【目的】メロン果実のセリンプロテアーゼ、ククミシンは果実の全可溶性タンパク質の 10%以上を占める主要タンパク質で、受粉後 10 日前後の若い果実の果芯部にのみ発現する。我々は、ククミシン遺伝子のプロモーター中に存在する G-box を含む 20 塩基の配列がククミシンの果実特異的な発現を制御するエンハンサーとして機能していることを報告し、さらにその配列に結合する転写因子候補として CmbZIP1 と CmbZIP2 を得た。本研究では、CmbZIP1 と CmbZIP2 の果実内動態と転写因子としての特性を調べた。また、形質転換トマトにおけるククミシン遺伝子プロモーターの機能を解析した。
【方法と結果】受粉後 5−30 日の種々のメロン果実の果芯部から核タンパク質を抽出した。ククミシンエンハンサーに結合する DNA 結合タンパク質は 10−15 日に多いことが EMSA により示唆された。また、CmbZIP1 と CmbZIP2 に対するウサギ抗体を用いた Western blotting により、受粉後 5−10 日の果芯部組織の核タンパク質中に CmbZIP1 が検出された。CmbZIP1-GFP および CmbZIP2-GFP 融合遺伝子をタマネギ表皮細胞にパーティクルガンで導入し、両者の核局在を観察した。また、*CaMV35S::CmbZIP1* あるいは *CaMV35S::CmbZIP2* とククミシンプロモーター(1.2 kb)*::GUS* を受粉後 10−15 日のメロン果実切片にパーティクルガンで共導入したところ、CmbZIP1 および CmbZIP2 は GUS 活性をそれぞれ 3 倍、1.9 倍に増加させたことから、両者とも転写活性化因子であることが示唆された。*CmbZIP1* および *CmbZIP2* の上流領域を IPCR で増幅し塩基配列を決定したところ、*CmbZIP1* の上流領域には G-box に似た Z-box が、*CmbZIP2* の上流領域には T/G-box がそれぞれ見出された。CmbZIP1 は Z-box と T/G-box の双方に結合したことから、転写因子のオートレギュレーションが示唆された。また、ククミシンプロモーター*::GUS* 融合遺伝子をアグロバクテリウム法でトマト（Micro-Tom）に導入し形質転換体を多数得た。トマトの各成長・成熟段階の果実と葉における GUS 発現を調べたところ、GUS はメロンにおけるククミシンと同様に成熟前期の種子周辺の組織（胎座）で発現した。この結果から、ククミシンプロモーターの果実特異的発現機構はトマトにおいても保存されていることが示唆された。また、形質転換トマトをアブシジン酸とエチレンで処理すると果実中の GUS 活性が有意に増加したことから、ククミシンプロモーターの発現は植物ホルモンによって調節されていることが示唆された。

gene expression, cucumisin, transcription factor

講演番号：4D23a09
講演日時、会場：3 月 29 日 10:38～ D 校舎 23 会場

小麦粒登熟過程における PDI 発現量解析

Analysis of wheat PDI expression in ripening process

○徳本 脩[1]、野口 治子[3]、野口 智弘[2]、高野 克己[3] ([1]東京農大院農・農化、[2]東京農大応生・食加技セ、[3]東京農大応生・化学)
○osamu tokumoto[1], Haruko Noguchi[3], Tomohiro Noguchi[2], Katumi Takano[3] ([1]Agrichem., Agr., Grad. Sch., Tokyo Univ. Agric, [2]Fac. Biosci., FPC, Tokyo Univ. Agric, [3]Dept. Appl. Biol. Chem., Fac. Biosci. Tokyo Univ. Agric)

【目的】
小麦粉生地独特の粘弾性には、小麦貯蔵タンパク質間のジスルフィド結合（S-S 結合）が重要とされ、S-S 結合形成を触媒する酵素としてプロテインジスルフィドイソメラーゼ（PDI）が知られている。PDI は小麦中にも存在しており、小麦 PDI には 9 種類のアイソザイム（PDI ファミリー）が確認されている。PDI ファミリーは小麦粉生地形成に影響していると考えられ、これまでに、製パン加工特性（小麦生地加工特性）が良い小麦粉は、タンパク質量だけでなく PDI 活性も高い傾向を示すことを報告している。しかし、小麦粉中の PDI が蓄積されている小麦粒登熟過程での発現量の違いは、品種間において未だ確認されていない。そこで、本研究では小麦粒登熟過程における PDI ファミリーの発現挙動を品種別で測定し、比較解析することを目的とした。
【方法】
小麦試料には、中力品種である「農林 61 号」「さとのそら」、強力品種である「ゆめかおり」、超強力品種である「ハナマンテン」を用いた。小麦の開花日を 0 日目とし、穂を 5 日間隔で 0~30 日間採取、液体窒素にて瞬間冷凍したものを試料とした。各生育段階における mRNA 発現量の比較は、RNA を抽出しリアルタイム RT-PCR に供した。また、PDI 発現量は、小麦粒 10 粒から抽出した PDI 抽出液をウェスタンブロットに供し、化学発光の濃淡を観測し発現量を比較した。同時に、抽出液中の PDI 活性量をインスリンを基質に用いた還元活性法にて測定し比較した。
【結果】
PDI の mRNA 発現量は、品種間で同様の挙動を示し、ファミリー毎の発現量割合は PDIL1-1 が最も高く、PDIL1-1 は小麦粒が成熟するにつれ徐々に増加し、粒が急激に成熟する開花後およそ 10 日目でピークを示し、その後減少した。その他の PDI ファミリーでは、成熟につれ発現量は徐々に減少する傾向がみられた。また、PDI タンパク質の発現量および活性量も、いずれの品種においても同様の挙動を示し、登熟が進むにつれ徐々に増加した。登熟直前期である 30 日目の PDI 活性を比較したところ、「ゆめかおり」が最も高く、最も低い「農林 61 号」の約 2 倍の活性量を示した。

Wheat, Ripening Process, Protein Disulfide Isomerase

講演番号：4D23a10
講演日時、会場：3 月 29 日 10:49～ D 校舎 23 会場

Important roles of stress-responsive NAC transcription factors SNAC-A in leaf senescence.

○ Hironori TAKASAKI[1], Kyonoshin Maruyama[2], Miki Fujita[1], Takuya Yoshida[3], Kazuo Nakashima[2], Fumiyoshi Myouga[1], Kiminori Toyooka[1], Fuminori Takahashi[1], Kazuko Yamaguchi-Shinozaki[3], Kazuo Shinozaki[1] ([1]RIKEN Center for Sustainable Resource Science, [2]Japan International Research Center for Agricultural Sciences (JIRCAS), [3]Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo)

Leaf senescence is occurred by various stimuli as well as natural aging in plants. Senescence is regulated at molecular level through transcriptional regulation of many genes with various functions. Several transcription factors including NAC have been identified to function in gene expression during senescence. NAC transcription factors have important functions not only in growth and development but also in stress response and tolerance. Among them, we analyzed roles of a subfamily of NAC transcription factors in senescence and stress response. To analyze roles of stress related NAC transcription factors (SNAC), we analyzed one of the 3 subfamilies of NAC transcription factors (SNAC-A), in stress responsive gene expression. For functional analysis of SNAC-A subfamily genes, we isolated genes for 7 SNAC-A subfamily genes, *ANAC055*, *ANAC019*, *ANAC072/RD26*, *ANAC002/ATAF1*, *ANAC081/ATAF2*, *ANAC102* and *ANAC032*. Gene expression analysis showed that these seven genes are not only induced by abscisic acid (ABA) treatment but also up-regulated by natural senescence or aging. We isolated *septuple* mutant of these 7 genes for further analysis of phenotypes. The SNAC-A *septuple* mutant plant showed not only delayed leaf senescence but also delayed loss of chlorophyll during ABA treatment. Microarray analysis revealed that ABA and senescence inducible genes are down regulated in the *septuple* mutant plant. The downstream genes are different from typical ABA responsive genes that are regulated by the AREB/ABF transcription factors. We discuss important roles of seven NAC genes in SNAC-A subfamily in transcriptional control of senescence as well as ABA response.

NAC transcription factor, leaf senescence, abscisic acid (ABA)

講演番号：4D23a11
講演日時、会場：3 月 29 日 11:10～ D 校舎 23 会場

シロイヌナズナ VTC2 遺伝子破壊株の機能解析

Functional analysis of VTC2-knock out mutant in Arabidopsis thaliana

○竹内 崇[1]、丸田 隆典[1]、吉村 和也[2]、澤 嘉弘[1]、重岡 成[3]、石川 孝博[1] ([1]島根大・生物資源・生命工、[2]中部大・応生・食栄、[3]近畿大・農・バイオ)
○Takashi TAKEUCHI[1], Takanori MARUTA[1], Kazuya YOSHIMURA[2], Yoshihiro SAWA[1], Shigeru SHIGEOKA[3], Takahiro ISHIKAWA[1] ([1]Dept. Appl. Biosci. and Biotech., Fac. Life and Environ. Sci., Shimane Univ., [2]Coll. Biosci. Biotech., Chubu Univ., [3]Dept. Adv. Biosci., Fac. Agr., Kinki Univ.)

維管束植物のアスコルビン酸は、D-フルクトース-6P から全 8 段階の触媒過程を経る D-マンノース/L-ガラクトース(D-Man/L-Gal)経路により生合成されており、mM オーダーの高濃度で保持されることで、細胞内レドックスバッファーとしてさまざまな生理作用に関与している。シロイヌナズナのアスコルビン酸欠乏 *vtc2* 変異体は、D-Man/L-Gal 経路の構成酵素 GDP-L-ガラクトースホスホリラーゼを原因遺伝子とする変異体であり、その葉中アスコルビン酸量は野生株と比較して約 20%にまで低下していること、*VTC2* のパラログ *VTC5* との二重破壊株は致死的表現型を示すこと、エストロゲンによる一過的誘導発現実験において *VTC2* を発現誘導した場合にのみアスコルビン酸の増加が認められること、などの事実から、*VTC2* が植物アスコルビン酸生合成調節の中心的役割を担っていることがすでに証明されている。本研究では、未解明のアスコルビン酸生理作用の解明を最終目的として、植物シロイヌナズナ *VTC2* 遺伝子破壊（VTC2-KO）株における種々の生理的パラメーター等を測定し野生株および *vtc2* 変異体と比較した。

TAIR より入手した VTC2-KO 株のアスコルビン酸量を測定した結果、約 1 μmol/g FW であり、*vtc2* 変異体とほぼ同じレベルであることを確認した。*vtc2* 変異体は生育過程で矮性の表現型を示すのに対し、VTC2-KO 株の生育は野生株との顕著な違いは認められなかった。クロロフィル蛍光パラメーターを測定した結果、VTC2-KO 株は *vtc2* 変異体同様、非光化学的消光（NPQ）値の低下が観察されたが、10 mM アスコルビン酸 Na 添加により NPQ 値は回復した。野生株および VTC2-KO 株から葉緑体を単離し、シリコンレイヤー法により 14C 標識アスコルビン酸の取込み活性を評価したところ、両者で取込み活性の有意な違いは認められなかった。現在、次世代シーケンサーによる包括的発現遺伝子解析およびタンパク質の解析を進めており、その結果についても報告する。

Arabidopsis, ascorbic acid, biosynthesis

講演番号：4D23a12
講演日時、会場：3 月 29 日 11:21～ D 校舎 23 会場

シロイヌナズナのアスコルビン酸生合成調節因子 VTC2 の機能解析
Functional analysis of VTC2, an ascorbate biosynthesis regulatory protein, in Arabidopsis
○種子田 隼人[1]、丸田 隆典[1]、吉村 和也[2]、澤 嘉弘[1]、重岡 成[3]、石川 孝博[1]([1]島根大・生物資源・生命工、[2]中部大・応生・食栄、[3]近畿大・農・バイオ)
○Hayato TANEDA[1], Takanori MARUTA[1], Kazuya YOSHIMURA[2], Yoshihiro SAWA[1], Shigeru SHIGEOKA[3], Takahiro ISHIKAWA[1] ([1]Dept. Appl. Biosci. and Biotech., Fac. Life and Environ. Sci., Shimane Univ., [2]Coll. Biosci. Biotech., Chubu Univ., [3]Dept. Adv. Biosci., Fac. Agr., Kinki Univ.)

アスコルビン酸は植物に最も豊富に存在する水溶性酸化還元物質であり、抗酸化のみならずレドックスバッファーとしてさまざまな生理作用に関与する多機能性分子である。植物のアスコルビン酸は、D-マンノース/L-ガラクトース(D-Man/L-Gal)経路を主要経路として合成されており、葉におけるアスコルビン酸レベルは光をトリガーとした日周変動性を示す。これまでの我々の研究から、このアスコルビン酸レベルの光制御には、D-Man/L-Gal 経路構成酵素のひとつ GDP-L-ガラクトースホスホリラーゼ（VTC2）が中心的役割を担っていることが明らかになっているが、その分子機構については不明な点が多い。そこで本研究では、VTC2 によるアスコルビン酸生合成制御機構の解明を目的に VTC2 タンパク質を中心に機能解析を進めた。

CaMV35S プロモーターの制御下、VTC2 タンパク質配列上に存在する推定核移行シグナルを Ala 残基に置換した変異 VTC2（mutNLS）と GFP との融合タンパク質発現用コンストラクトを作製し、シロイヌナズナおよびシロイヌナズナ懸濁培養細胞に形質転換した。共焦点レーザー顕微鏡による局在解析により、VTC2 タンパク質は細胞質以外に核にも局在することが確認された。また、GFP 抗体を用いてプルダウンした VTC2::GFP タンパク質は、Pro-Q ダイヤモンドにより蛍光染色されることから、VTC2 はリン酸化修飾を受けることが強く示唆された。現在リン酸化とホスホリラーゼ活性との関連について検証を進めている。また、VTC2 との相互作用タンパク質を調べるため、プルダウンにより得られたタンパク質について nanoLC-ToF/MS による分析も進めている。

Arabidopsis, ascorbic acid, VTC2

講演番号：4D23a13
講演日時、会場：3 月 29 日 11:32～ D 校舎 23 会場

ヒメツリガネゴケにおけるアスコルビン酸生合成主要経路の検証

Evaluation of major ascorbate biosynthesis pathway in *Physcomitrella patens*

○袖山 翼[1]、丸田 隆典[1]、澤 嘉弘[1]、重岡 成[2]、石川 孝博[1]([1]島根大・生物資源・生命工、[2]近畿大・農・バイオ)
○Tsubasa SODEYAMA[1], Takanori MARUTA[1], Yoshihiro SAWA[1], Shigeru SHIGEOKA[2], Takahiro ISHIKAWA[1] ([1]Dept. Appl. Biosci. and Biotech., Fac. Life and Environ. Sci., Shimane Univ., [2]Dept. Adv. Biosci., Fac. Agr., Kinki Univ.)

維管束植物は mM オーダーの高濃度でアスコルビン酸を蓄積しており、その生合成は、D-マンノースと L-ガラクトースの誘導体を代謝中間体とする D-マンノース/L-ガラクトース(D-Man/L-Gal)経路を主要経路としている。また我々は、緑藻ユーグレナのアスコルビン酸生合成は、植物とは異なり D-ガラクツロン酸を代謝中間体とする経路が主要であることを報告している。最近、蘚類ヒメツリガネゴケには、遺伝子レベルで D-Man/L-Gal 経路および D-ガラクツロン酸経路の両方の存在が示唆されたことから、植物アスコルビン酸生合成解明のための新たなモデルとして着目している。本研究ではヒメツリガネゴケにおけるアスコルビン酸生合成関連酵素遺伝子の解析を通じて、2 つのアスコルビン酸生合成経路を有することの生物学的意義について考察した。
ヒメツリガネゴケゲノムには、新奇 *VTC3* 遺伝子に加え、D-Man/L-Gal 経路構成酵素遺伝子全てのオルソログおよび D-ガラクツロン酸経路の構成酵素アルドノラクトナーゼ(*ALase*)遺伝子が存在していた。アスコルビン酸生合成に関与する全ての遺伝子について定量的 PCR を行ったところ、ほとんど全ての遺伝子発現に光応答性が認められた。特に、ヒメツリガネゴケに存在する 3 つの *VTC2* パラログのうち、*VTC2-1* および *VTC2-2* 遺伝子の発現が他のアスコルビン酸生合成遺伝子に比べ、顕著に高い発現を示した。さらに、光合成電子伝達阻害剤である DCMU 処理により、*VTC2-1* および *VTC2-2* 遺伝子発現の抑制に相関して、アスコルビン酸レベルの低下が認められた。相同組換えにより *ALase-1* 遺伝子破壊株(*Δa1-1*)を作製したところ、光条件におけるアスコルビン酸レベルが野生株の約 1.6 倍に増加していた。これらの結果から、ヒメツリガネゴケは VTC2 を介した D-Man/L-Gal 経路がアスコルビン酸生合成の主要経路であることが示唆された。現在、*VTC2* 遺伝子破壊株を作製し、アスコルビン酸レベルに及ぼす影響について検討を進めている。

Physcomitrella patens, ascorbic acid, biosynthesis

講演番号：4D23a14
講演日時、会場：3 月 29 日 11:43～ D 校舎 23 会場

トマトのアスコルビン酸生合成におけるガラクツロン酸レダクターゼの発現機構と生理機能

Gene expression mechanism and physiological function of galacturonic acid reductase for ascorbic acid biosynthesis in tomato

○末川 麻里奈、藤川 愉吉、江坂 宗春（広島大院生物圏）
○Marina SUEKAWA, Yukichi FUJIKAWA, Muneharu ESAKA (Hiroshima Univ.)

【目的】

アスコルビン酸は代表的な抗酸化物質で、酸化的ストレスによって植物体内に生じた活性酸素種を除去する機能を果たす。植物では、複数のアスコルビン酸生合成経路が存在し、種や、組織、生育段階に応じて、アスコルビン酸の生合成が調節されていると考えられている。イチゴにおいて、ガラクツロン酸レダクターゼ（GalUAR）の分子生物学的解析から、細胞壁成分ペクチンからガラクツロン酸を経由して、アスコルビン酸が生合成される経路の存在が示唆された。トマトでは、複数の GalUAR アイソザイムの存在が示唆されている。これまでに、イチゴ GalUAR の一次構造と最も相同性が高いトマト GalUAR 遺伝子をクローニングし、その発現解析を行った。その結果、トマト葉の老化や種々のストレスに応答して遺伝子発現が増加した。さらにトマト GalUAR 遺伝子のプロモーター解析を行ったところ、植物において恒常的に高発現するカリフラワーモザイクウイルス（CaMV）35S プロモーターと同程度の活性を示すことが明らかになった。そこで、本研究では、GalUAR 遺伝子発現調節機構を転写レベルで明らかにするとともに、トマトにおいて、GalUAR がアスコルビン酸生合成酵素として機能しているかどうかを明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】

これまでに、トマト GalUAR 遺伝子の開始コドンから上流域 2300bp に着目し、ルシフェラーゼをレポーター遺伝子としたプロモーター解析を行い、トマト GalUAR 遺伝子の上流域 1400bp までに CaMV 35S プロモーターと同程度のプロモーター活性を示す転写調節シス因子が存在する可能性を明らかにした。そこで、転写調節シス因子の存在が示唆された領域について、さらに詳細なプロモーター解析を行ったところ、トマト GalUAR 遺伝子の上流域 500bp から 600bp の間に、高発現に関与する転写調節シス因子が存在することが示唆された。

次に、トマト GalUAR がアスコルビン酸生合成に関与しているかを評価するため、CaMV 35S プロモーターを用いてトマト GalUAR を恒常的に高発現させる植物発現ベクターをアグロバクテリウム法によってタバコに遺伝子導入し、トマト GalUAR 過剰発現遺伝子組換えタバコを作出した。得られた組換えタバコを用いてトマト GalUAR の遺伝子発現をウエスタンブロッティングにより確認したところ、トマト GalUAR の発現が確認された。現在、トマト GalUAR 過剰発現遺伝子組換えタバコにおいて、アスコルビン酸量が増加するか等の解析を行っている。

Galacturonic acid reductase, Ascorbic acid, Tomato

講演番号：4D23a15
講演日時、会場：3 月 29 日 11:54～ D 校舎 23 会場

オオムギ由来酸化ヌクレオチド加水分解 Nudix hydrolase (HvNUDX12) の構造と機能解析
Structure and function of oxidized nucleotide pyrophosphatase (HvNUDX12) in barley

○田中 小百合[1]、木原 誠[2]、杉本 学[1] ([1]岡山大学・植物研、[2]サッポロビール・バイオ研究開発部)
○Sayuri TANAKA[1], Makoto KIHARA[2], Manabu SUGIMOTO[1] ([1]IPSR, [2]BRDD, Sappro Brew. Ltd.)

【背景・目的】

太陽光は植物の生育と発達を調節する環境シグナルであり、エネルギー源としても極めて重要である。そのうち紫外線は波長により、UV-A(320-400nm)、UV-B(290-320nm)、UV-C(100-290nm)に区分され、UV-A と UV-B はオゾン層を通過する。地表に到達する紫外線の 99%は UV-A であるが、環境悪化によるオゾン層の破壊が今後続けば、地上における UV-B や UV-C の影響が無視できなくなる。これまで、UV-B は生理学的レベルあるいは DNA レベルで植物の生育過程に障害を及ぼすことが報告されてきた。しかし、植物における UV-C に対する応答・防御メカニズムは明らかではない。Nudix hydrolase は植物のシグナル分子や毒性成分の代謝制御に関する酵素であり、環境ストレス下の植物で重要な役割を担う。我々はこれまでに、オオムギから 14 種類の Nudix hydrolase 遺伝子を単離し、UV-A、-B、-C による応答性が異なることを明らかにした。このうち UV-C で遺伝子が有意に誘導される HvNUDX12 は酸化ヌクレオチド及び ADP-ribose 加水分解活性を示し、*in vivo* で翻訳エラーを抑制した。一方、HvNUDX12 と 66%の相同性を示す AtNUDX26 は、酸化ヌクレオチドに加水分解活性を示すが ADP-ribose に対する活性や翻訳エラー抑制を示さないことが報告されている。本研究では HvNUDX12 の構造と機能について検討した。

【方法・結果】

HvNUDX12 の ADP-ribose pyrophosphatase で保存されている 81 番目プロリン残基がアラニン残基となる変異遺伝子を部位特異的変異導入法により作製して大腸菌で発現させ、得られた可溶性タンパク質を精製した。加水分解活性を測定した結果、変異 HvNUDX12 は ADP-ribose への加水分解活性は 1.82 nmol/min/mg を示し、HvNUDX12 と同等であった。一方、AtNUDX26 が高い活性を示す ppGpp に対する変異 HvNUDX12 の加水分解活性は 25.66 nmol/min/mg を示し、HvNUDX12 に比べ約 2 倍高い活性を示した。本結果から HvNUDX12 の 81 番目プロリン残基は ADP-ribose 加水分解活性に重要ではないが、ppGpp 加水分解活性に関与していることが示唆された。

Nudix, function, barley

講演番号：4D23p01
講演日時、会場：3 月 29 日 14:00～ D 校舎 23 会場

シロイヌナズナ F_1 雑種での non-coding RNA による劣性遺伝子の発現制御
Suppression of the expression of recessive gene by non-coding RNA in *Arabidopsis thaliana* F_1 hybrid

○志村 卓哉[1]、中川原 真澄[2]、鈴木 穣[3]、矢野 健太郎[4]、高山 誠司[5]、柴 博史[2]（[1]茨大・理、[2]筑波大・生命環境系、[3]東大・新領域、[4]明大・農、[5]奈良先端大・バイオサイエンス）
○ Takuya SHIMURA[1], Masumi NAKAGAWARA[2], Yutaka SUZUKI[3], Kentaro YANO[4], Seiji TAKAYAMA[5], Hiroshi SHIBA[2] ([1]Faculty of Science, Ibaraki University, [2]Graduate School of Life and Environmental Sciences, The University of Tsukuba, [3]Department of Medical Genome Sciences, The University of Tokyo, [4]Faculty of Agriculture, Meiji University, [5]Graduate School of Biological Sciences, Nara Institute of Science and Technology)

[目的]
有性生殖によって産み出される子孫は両親の持つ性質のいずれか一方のみを受け継ぐ場合が多く知られている。これは「優性の法則」として古くから知られる遺伝現象である。近年、優性アレル由来の non-coding RNA が劣性アレルのプロモーター領域をメチル化し、当該遺伝子の発現を抑えるものがあることがアブラナ科植物の自家不和合性に関わる *SP11* 遺伝子で明らかになっている。特筆すべき点は、この時にいずれの対立遺伝子も機能的に正常だということである。本研究では、このような non-coding RNA を介した優性アレル特異的な遺伝子発現制御の実態をシロイヌナズナの異なる 2 系統株を交配して得た F_1 雑種を用いてゲノムワイドに明らかにすることにした。

[方法・結果]
先行研究として、Col 株、C24 株、F_1 雑種の網羅的トランスクリプトーム解析により、143 個の遺伝子が上記のような優劣発現を示すと示唆された。それに引き続き、私は small RNAome によって先ほどの遺伝子の中で優性アレル特異的かつ、劣性遺伝子のプロモーター領域により高い相同性を持つトランス因子が存在するものを発見した。その後、その遺伝子に関して定量 PCR によっていくつかの遺伝子に関しては優劣発現の確認がとれた。現在は、non-coding RNA がどのような機構で劣性遺伝子の発現を抑制しているかを明らかにするべく解析を進めている。

expression control, non-coding RNA, epigenetics

講演番号：4D23p02
講演日時、会場：3 月 29 日 14:11～ D 校舎 23 会場

シロイヌナズナの種内雑種（F_1 雑種）で観察される雑種強勢に関与するノンコーディング RNA の探索

Analyses of *de novo* activated noncoding RNAs in F_1 hybrids of *Arabidopsis thaliana* strains

○垰野 裕[1]、中川原 真澄[2]、鈴木 穣[3]、矢野 健太郎[4]、高山 誠司[5]、柴 博史[2]（[1]茨大・理、[2]筑波大・生命環境系、[3]東大・新領域、[4]明大・農、[5]奈良先端大・バイオサイエンス）

○Yutaka Taono[1], Masumi Nakagawara[2], Yutaka Suzuki[3], Kentaro Yano[4], Seiji Takayama[5], Hiroshi Shiba[2] ([1]Faculty of Science, Ibaraki University, [2]Graduate School of Life and Environmental Sciences, The University of Tsukuba, [3]Department of Medical Genome Sciences, The University of Tokyo, [4]Faculty of Agriculture, Meiji University, [5]Graduate School of Biological Sciences, Nara Institute of Science and Technology)

【目的】F_1 雑種（雑種第一代）で見られる形質は、しばしばその両親よりも優れた形質を示す事が知られている。この現象は雑種強勢と呼ばれ、多くの動植物で観察される現象である。雑種強勢の分子メカニズムに関しては幅広く研究がなされているが、いまだにその機構は明らかになっていない。当研究室ではシロイヌナズナ種内系統間の交配により得られた顕著な雑種強勢を示す F_1 雑種、およびその親系統の網羅的トランスクリプトーム解析を通じて、F_1 雑種になると新規に発現が亢進する遺伝子を複数明らかにし、さらに、その中に複数種のノンコーディング RNA が含まれていることを明らかにしてきた。そこで雑種強勢とノンコーディング RNA との関係を明らかにするため、本研究では形質転換の手法を用いて雑種強勢への関与の有無を明らかにする事にした。

【方法と結果】構成的な発現を示す CaMV 35S-プロモーターの下流に、F_1 雑種で新規に発現が見られたノンコーディング RNA をつなげたコンストラクトを作成し、アグロバクテリウム法により、両親系統に導入した。得られた 14 種類の形質転換種子について RT-PCR による外来遺伝子の発現および表現型の変化を観察している。またノンコーディング RNA の配列から標的遺伝子を推定し、その発現制御メカニズムについても解析を進めている。本講演では上記結果から考えられる雑種強勢のモデルを議論したい。

Heterosis, non-coding RNA, epigenetics

講演番号：4D23p03
講演日時、会場：3 月 29 日 14:22～ D 校舎 23 会場

短鎖 RNA による高等植物スプライシングへの干渉作用

Small-interfering RNA-mediated splicing alteration in higher plants

○中川原 咲恵、申 美來、児玉 浩明 (千葉大学)
○Sakie NAKAGAWARA, Mirae SHIN, Hiroaki KODAMA (Chiba Univ.)

（目的）

RNA サイレンシングは短鎖 RNA(siRNA)に起因する遺伝子発現抑制機構である。中でも Sense-transgene induced post-transcriptional gene silencing(S-PTGS)は、過剰発現を目的として遺伝子を導入した植物の中に観察される、導入遺伝子および塩基配列が相同な内在性遺伝子の発現が同時に抑制される RNA サイレンシングである。α - リノレン酸合成酵素遺伝子(NtFAD3)の S-PTGS では、内在性 NtFAD3 遺伝子のスプライシング異常が起きている(Shin et al.,2014)。そこで、今回、NtFAD3 遺伝子のイントロンを標的とした RNA サイレンシング株を作出し、これらの siRNA がスプライシングに与える影響について調べた。

（方法と結果）

NtFAD3 遺伝子の、イントロン 1、エキソン 2、イントロン 2 の配列を標的とした RNAi 植物を作出し、それぞれ、TPIR-in1、TPIR-ex2、TPIR-in2 株とした。TPIR-ex2 株では、NtFAD3 遺伝子の発現が抑制され、α-リノレン酸含量が減少したが、TPIR-in1、TPIR-in2 株では、α-リノレン酸含量は野生株と同じであった。スプライシング効率を調べるために、内在性 NtFAD3 遺伝子のエキソン 1～3 を含むゲノム配列と GUS レポーター遺伝子配列を転写するコンストラクト(pF3-EX-1-3)を作成した。この pF3-EX-1-3 をパーティクルガンでタバコに導入し、転写産物のスプライシング効率を調べた(Mitsui et al.,2003)。その結果、野生株へ導入した場合とは異なり、pF3-EX-1-3 を TPIR-in1 株、および TPIR-in2 へ導入すると、スプライシングされない産物、エキソン 2 がスキップされた産物および正常にスプライシングされた産物が検出された。これらの結果は、siRNA が高等植物のスプライシングに干渉する可能性を示していると考えられる。

Mitsui et al.,(2003) Plant Mol.Biol.Rep.21:21-30
Shin et al.,(2014) PLoS ONE 9:e87869

RNA silencing, splicing, siRNA

講演番号：4D23p04
講演日時、会場：3 月 29 日 14:33～ D 校舎 23 会場

ポティウイルス感染性 cDNA クローンの転写産物の 3'末端構造の推定
Estimation of 3' terminal structure of transcripts from potyvirus infectious cDNA clones
○木村 貴志[1]、瀧尾 進[2]、齋藤 彰[1] ([1]農研機構・九沖農研、[2]熊本大・沿岸域セ)
○Takashi KIMURA[1], Susumu TAKIO[2], Akira SAITO[1] ([1]Kyushu Okinawa Agric. Res. Cent., NARO, [2]Center for Mar. Env. Stud., Kumamoto Univ.)

ポティウイルス属に含まれるウイルスは 1 本鎖 RNA をゲノムに持ち、そのゲノム RNA の複製は RNA 依存的 RNA 合成によって行われる。ポティウイルスゲノムの完全長 cDNA を *in vivo* で一過的に発現させることにより感染を成立させることが可能であり、そのような発現ベクターは感染性 cDNA クローン（以下 cDNA クローン）とよばれる。cDNA クローンは一般的に転写産物の 3'末端プロセシングおよび転写終結のために NOS ターミネーターが付加されているが、外来のターミネーターを持たないタイプも複数の種において構築されている。これらの cDNA クローンに由来する転写産物の 3'末端構造については明らかとなっていない。

サツマイモ斑紋モザイクウイルス強毒系統（SPFMV-S）はポティウイルス属に分類されるサツマイモ帯状粗皮病の原因ウイルスである。演者らは SPFMV-S ゲノム cDNA の 3'末端領域（CP 遺伝子＋3'非翻訳領域)の発現系を用いた cDNA クローン転写産物の 3'末端生成に関するモデル実験を行っている。これまでに、外来のターミネーターを持たないコンストラクトに由来する転写産物の解析により、SPFMV-S ゲノム配列の 3'末端領域にクリプティックなポリ A シグナルが存在することをみいだしている。このシグナルの存在により 3'末端領域発現カセットに由来する転写産物の 3'末端プロセシングが可能となる。また、主要なクリプティックなポリ A 部位は 3'非翻訳領域の 5'側に位置する[1)]。SPFMV-S ゲノムの 3'非翻訳領域は U リッチな配列となっており、このことがクリプティックなシグナルを生じさせる要因の一つとして考えられる。

本研究では NOS ターミネーターを保有するタイプの cDNA クローンについてのモデル実験を行った。上記の発現系において、NOS ターミネーターを付加させたコンストラクトで形質転換したタバコ植物について転写産物の解析を行った結果、転写産物のポリ A 部位は 3'非翻訳領域と NOS ターミネーターの両方に存在した。NOS ターミネーターについては正規のポリ A 部位に加えて 5'側のクリプティックなポリ A 部位において転写産物のポリ A 化が起こっていた。下流の NOS ターミネーター配列上でみられるポリ A 化は、上流に位置する SPFMV-S 配列上のクリプティックなポリ A シグナルの効率が最大限ではないことを示唆する。これらのモデル実験から、ポティウイルス cDNA クローンに由来する転写産物は、複数の部位でのポリ A 化によって構造的にヘテロな集団となっており、複製の過程において RNA 集団は種に固有の構造に収斂すると推測される。

1) Kimura et al., Biosci. Biotechnol. Biochem., 69, 2005-2008 (2005)

potyvirus, cDNA clone, polyadenylation

講演番号：4D23p05
講演日時、会場：3 月 29 日 14:44～ D 校舎 23 会場

アピオス塊茎由来ポリガラクツロナーゼインヒビター（PGIP）の分離精製、性質と cDNA クローニング

Purification, characterization and cDNA cloning of polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP) from *Apios americana* tubers.

○劉 佳、米倉 政実、上妻 由章（茨城大院農）
○Jia LIU, Masami YONEKURA, Yoshiaki KOUZUMA (Ibaraki Univ)

【目的】アピオス（Apios americana Medikus）は、北アメリカ原産の多年性マメ科植物で、その地下塊茎部分（イモ）が食用とされている。アピオスはジャガイモやサツマイモなど他のイモ類と比較してタンパク質や脂質の成分を多く含み、健康食品素材としても知られている。我々はアピオスの生理活性タンパク質の探索を目的に、アピオス抽出タンパク質の SDS-PAGE による分離と、主要タンパク質の N 末端アミノ酸配列解析により、アピオスから約 10 種類のタンパク質の存在を確認した。さらに、そのなかで、アピオスのレクチン、アミラーゼや BBI 型トリプシンインヒビターを単離して、特徴付けや cDNA クローニングを行い、本学会で報告した。そこで、今回、アピオスのプロテオーム解析研究の一環として、その中に存在が示唆されているポリガラクツロナーゼインヒビター（Polygalacturonase-inhibiting protein:PGIP）について、アピオス塊茎から分離精製を行い、その特徴付けと cDNA クローニングを行った。
【方法・結果】アピオス塊茎から粗タンパク質を抽出し、その分子量（SDS-PAGE で 34kDa）を指標にして、DEAE-cellulofine A-500 column 及び Butyl-cellulofine column を用いて、PGIP と考えられるタンパク質を分離精製した。収量としては、アピオス塊茎 150g より、34.5mg の PGIP が得られた。次に、 ポリガラクツロナーゼ(PG)に対する阻害能を検討するため、2 種類のカビ由来 PG を使用して阻害活性測定を行ったが、その阻害活性は非常に弱く、Ki の決定はできなかった。現在、その他の PG 等に関して阻害能を検討中である。一方、アミノ酸配列の面から PGIP として同定するために、その cDNA クローニングを行うこととした。まず、PGIP の部分アミノ酸配列決定を目的として、リシルエンドペプチダーゼ消化を行い、YMC-Pack pro C18 カラムを用いた逆相 HPLC によって 11 個のペプチド断片を得た。それらのアミノ酸配列を決定し、それを基に設計した PCR プライマーを用いて RT-PCR を行い、約 450bp の PCR 産物を得て、その塩基配列を明らかにした。次に、3’-RACE 及び 5’-RACE を行い、約 650pb 及び 350bp の PCR 産物を得て、PGIP cDNA の塩基配列を決定した。その結果、PGIP cDNA は 1219bp であり、339 アミノ酸残基からなるタンパク質をコードしていることが明らかとなった。また、このアミノ酸配列を、植物由来 PGIP のアミノ基配列を比較したとこと、43～59%のアミノ酸が同一であり、このタンパク質が PGIP の１種であることが推察できた。現在、部分的にアミノ酸配列が異なるイソインヒビターの cDNA の存在が示唆されているので、その検討を行っている。

PGIP, *Apios americana*, cDNA cloning

講演番号：4D23p06
講演日時、会場：3 月 29 日 15:05～ D 校舎 23 会場

リンゴ果実が生産するプロシアニジン重合体の生合成研究

Biosynthetic research of procyanidin polymers produced in apple fruit

○小山 愛美[1]、常盤野 哲生[1]、川井 悟[2]、吉澤 結子[1] ([1]秋田県立大院生資科、[2]東京電機大理工)
○Manami OYAMA[1], Tetsuo TOKIWANO[1], Satoru KAWAII[2], Yuko YOSHIZAWA[1] ([1]Akita Pre Univ., [2]Tokyo Denki Univ.)

【緒言】

リンゴ果実由来のプロシアニジン類には、脂肪蓄積の抑制作用、抗酸化作用等の様々な生理活性の報告がある。プロシアニジンの含量は、リンゴの品種系統によって大きく異なるため、プロシアニジン豊富な品種系統の作出には生合成過程の理解が重要である。プロシアニジン生合成は、原料となるカテキンあるいはエピカテキンまでの生合成経路は明らかになっているものの、プロシアニジン類に至る生合成メカニズムは明らかになっていない。本研究では、プロシアニジン類の生合成経路の解明と、生合成に関わる酵素や酵素遺伝子の特定を目的とし、リンゴ未生等を用いた実験系の構築を検討した。

【実験方法】

リンゴ植物体の実験材料として、リンゴ未生や果実を用いた。リンゴ未生は、無菌状態で生育させた培養植物（品種：Starking delicious）を用いた。約 1 ヵ月間培養し、成長したリンゴ未生を薬剤添加した培地に移し、エリシター処理を施した。これを一定期間培養後、植物体と培地を回収し、コントロールと比較して、エリシター処理した植物体あるいは培地中に含まれる成分について調査した。

【結果】

リンゴ果実については切断後、薬剤処理して、未処理区との間で成分の比較を行った。まず、実験条件を制御しやすい無菌未生や果実で条件検討を行った。エリシター処理を施したリンゴ未生について、約 0.5cm 程度の大きさになるようハサミで切り、メタノールにて抽出した。残りの培地は、酢酸エチル、水で液-液分配を行い、酢酸エチル画分を回収した。得られたメタノール抽出物と酢酸エチル画分について、プロシアニジン類、もしくは、プロシアニジンの原料となるカテキン、あるいはエピカテキンが含まれているかを調査した。検討した条件やその結果について報告する。

Procyanidin, Biosynthesis, apple

講演番号：4D23p07
講演日時、会場：3 月 29 日 15:16～ D 校舎 23 会場

NMR メタボリックプロファイリングを利用した農作物の特性解析
Application of NMR-based metabolic profiling for characterization of agricultural crop
○冨田 理[1]、池田 成志[2]、津田 昌吾[2]、染谷 信孝[2]、浅野 賢治[2]、小野 裕嗣[1]、菊地 淳[3,4,5]、関山 恭代[1,3] ([1]農研機構・食総研、[2]農研機構・北農研、[3]理研 PSC、[4]横市大院・生命ナノ、[5]名大院・生命農)
○Satoru TOMITA[1], Seishi IKEDA[2], Shogo TSUDA[2], Nobutaka SOMEYA[2], Kenji ASANO[2], Hiroshi ONO[1], Jun KIKUCHI[3,4,5], Yasuyo SEKIYAMA[1,3] ([1]NARO Nat. Food Res. Inst., [2]NARO Hokkaido Agric. Res. Center, [3]RIKEN PSC, [4]Grad. Sch. Nanobiosci., Yokohama City Univ., [5]Grad. Sch. Bioagri. Sci., Nagoya Univ.)

【目的】NMR メタボリックプロファイリング法は, 試料の NMR スペクトルを混合系のまま測定し, 多変量解析によって網羅的にマーカー探索する手法である．NMR 装置に依存しない再現性の高さ, ダイナミックレンジの広さ，試料調製の簡便さといった利点により，試料の状態や品質に関する情報を迅速に得ることができる．本研究では，疫病菌 *Phytophthora infestans* によって引き起こされる重要病害である，ジャガイモ疫病に対する抵抗性マーカーの候補を本手法により探索した．ジャガイモ疫病に対する抵抗性には，疫病菌のレースに特異的な「真性抵抗性」と，レース非特異的な「圃場抵抗性」が知られている．真性抵抗性は強力ではあるが，ひとたび新たなレースが出現するとすぐに崩壊してしまう．そのため近年では疫病菌の分化と変遷に対応できる可能性のある，圃場抵抗性を利用した育種が進められている．しかし栽培現場においては，実験室や温室条件下での抵抗性が圃場で必ずしも再現できないことや，広大な汚染圃場と検定期間を要することから，迅速かつ簡便に抵抗性を判定する手法が望まれている．我々はこれまでの研究で，病害発生前の葉中 L-リンゴ酸含量が疫病抵抗性品種に高く，マーカー成分として有用である可能性を示した．そこで本研究では，異なる時期に採取された試料を用いて，抵抗性判定に適切なサンプリング時期について検討を行った．
【方法と結果】 病害抵抗性の異なるジャガイモ品種について，病徴のない健全な複葉を 1) 発病前（2010 年 7 月 6 日）と，2) 病害初発期（同年 7 月 18 日）にサンプリングした．複葉の凍結乾燥粉末をリン酸緩衝液またはメタノール/HEPES 緩衝液で加熱抽出し，その ^{1}H-NMR スペクトルからデータセットを作成して多変量解析を実施した. また 2D NMR 解析によって代謝物シグナルの同定を行った. 主成分分析の結果，初発期に採取した試料では抵抗性の違いを反映したクラス形成が見られ， L-リンゴ酸含量の重要性が高いことが確認された．その一方で発病前に採取した試料では L-リンゴ酸含量と抵抗性の程度との相関は見られず，抵抗性の判別には適さなかった．主成分分析で両試料の違いについて検討したところ，発病前にはフルクトースが，初発期にはスクロースとクロロゲン酸が相対的に多いことが示された．しかし L-リンゴ酸の相対量はサンプリング時期との相関性を示さなかった．以上の結果から, L-リンゴ酸含量は発病へ向かうに従って増加あるいは減少傾向へ分かれたと考えられ, 抵抗性の判別のためには適切な時期にサンプリングを行う必要があることが示された．病害初発期の健全葉において植物の代表的な防御物質であるクロロゲン酸が増加していることから，疫病菌の潜在的な感染に対する応答に伴い，L-リンゴ酸の含量に差が生じた可能性が考えられる．

NMR-based metabolic profiling, Late blight resistance, potato

講演番号：4D23p08
講演日時、会場：3 月 29 日 15:27～ D 校舎 23 会場

Variation in antioxidant capacity and antioxidant composition of seri (Oenanthe javanica) grown over multiple seasons in different regions in Japan

○Rosaly MANAOIS[1], Tomoyuki OKI[2], Manabu WAKAGI[1], Yuko TAKANO-ISHIKAWA[1], Jun WATANABE[1] ([1]National Food Research Institute, NARO, [2]Kyushu Okinawa Agricultural Research Center, NARO)

Introduction *Seri* or Japanese parsley (*Oenanthe javanica*) is a widely consumed plant in Japan recently shown to possess high antioxidant capacity, and therefore a potential functional food resource. This study was conducted to identify and characterize the major antioxidants in *seri* and examine their levels as affected by planting season and location.

Methods Twenty-two *seri* samples cultivated in three regions from October 2012 to December 2013 were purchased from a fresh market in Ibaraki prefecture. Edible part of *seri* was lyophilized and pulverized, and lipophilic and hydrophilic components were sequentially extracted with *n*-hexane:dichloromethane and methanol:water:acetic acid, respectively, using an accelerated solvent extraction system. Their antioxidant capacities were evaluated by the oxygen radical absorbance capacity (ORAC) method, and the major antioxidants were identified and quantified by high performance liquid chromatography-mass spectrometry.

Results and Discussion ORAC values of the hydrophilic fractions (H-ORAC) ranged 1,338-5,052 μmol Trolox equivalents (TE)/100g fresh weight (FW), while those of the lipophilic extracts (L-ORAC) were 280-954 μmol TE/100g FW. Chlorogenic acid (CGA) and quercetin glycosides, namely, rutin (quercetin-3-*O*-rutinoside), quercetin-3-*O*-glucoside, hyperoside (quercetin-3-*O*-galactoside), and quercetin-3-*O*-rhamnosyl-galactoside, were identified as major contributors to the H-ORAC. Contribution of CGA was the highest among these antioxidants, while quercetin glycosides positively influenced antioxidant capacity at a lower extent. α-Tocopherol showed very low contribution to the L-ORAC values, suggesting the presence of other lipophilic antioxidants. Production location affected H-ORAC values and CGA content, while no significant differences in total quercetin glycoside levels were observed. Month of cultivation did not induce apparent trend in antioxidant capacities. These results provide information on *seri* bioactive compounds and the conditions favorable for cultivation of *seri* possessing higher antioxidant capacity.

hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity, water dropwort (Oenanthe javanica), location and season effects

講演番号：4D23p09
講演日時、会場：3 月 29 日 15:38～ D 校舎 23 会場

青汁専用大麦若葉「むぎおう」の栄養成分および乳酸菌増殖能に関する研究

Young barley grass for aojiru "MUGIOH" - The research of nutrition and lactic acid bacterium proliferation capacity-

○神谷 智康、鍔田 仁人、青木 幸久、永瀧 達大、山口 五太郎（株式会社大地の力研究所）
○Tomoyasu KAMIYA, Masahito TSUBATA, Yukihisa AOKI, Tatsuhiro NAGATAKI, Gotaro YAMAGUCHI (Energy of Ground (Daichi-no-chikara) Laboratory Co.,Ltd.)

大麦若葉末はイネ科オオムギ属のオオムギ（*Hordeum vulgare* L.）の出穂前の若葉部を刈り取った後、洗浄、乾燥、粉砕など複数の工程を経て製造される淡緑～濃緑色の粉末で、主に青汁に配合されている。しかし、その品種はオオムギ種子の収穫を目的として栽培環境や病害に強くするなど改良されたものである。そのため、我々は青汁に適した品種を選定し、その大麦若葉を「むぎおう」と名付け、その含有する成分と機能性についての研究を行っている。本研究は、「むぎおう」の栄養成分を、九州地区の奨励品種である「ニシノホシ」と比較してその特徴を検討した。

まず、「むぎおう」および「ニシノホシ」をプランターにて栽培して、成分分析を行った。次に熊本県阿蘇市の農地にて栽培して実際に大麦若葉末を作製し、成分分析を行った。その結果、「むぎおう」が「ニシノホシ」と比較してアミノ酸量、クロロフィル量、ポリフェノール量が高かった。特に、総アミノ酸量およびポリフェノールの中でもサポナリン量が 2 倍ほどであった。また、機能性として SOD 様活性および乳酸菌増殖能を測定した。その結果、「むぎおう」が「ニシノホシ」と比較して SOD 様活性が高く、乳酸菌増殖能も高いことが示された。

また、「むぎおう」は「ニシノホシ」と比較して濃緑色を示しているため、大麦若葉末の成分と色との関連性を検討した。その結果、アミノ酸量、クロロフィル量およびサポナリン量は、明度および彩度との相関性が高かった。そのため、大麦若葉に含まれる成分が大麦若葉末の濃緑色に影響を与えることが考えられた。

Young barley grass, Amino acid, Polyphenol

講演番号：4D23p10
講演日時、会場：3 月 29 日 15:49～ D 校舎 23 会場

農耕地土壌におけるミネラル成分と微生物数の関係

Analysis of secondary macronutrients and micronutrients in agricultural soils: relationship to bacterial biomass.

○中辻 貴広、樋口 空生、向 真樹、ADHIKARI Dinesh、荒木 希和子、久保 幹（立命館大）
○Takahiro NAKATSUJI, Akio HIGUCHI, Masaki MUKAI, Dinesh ADHIKARI, Kiwako ARAKI, Motoki KUBO (Ritsumeikan Univ.)

[目的]

これまで、SOFIX（土壌肥沃度指標）に基づき、日本の農耕地土壌の炭素、窒素、リン、カリウムと微生物の活性について調査してきた。一方で、マグネシウムや鉄といったミネラル成分は炭素、窒素、リン、カリウムと同様に植物の生長に必要であるが、これまで調査していなかった。そのため農地土壌における、これらミネラル成分に関する知見は重要である。本研究では、様々な土壌中のミネラルと、微生物数の定量を行い、これらの関係について解析を行った。

[方法・結果]

日本各地の多様な農耕地から土壌サンプルを取得し、土壌中の総細菌数を slow-stirring method から得られた eDNA 量より算出した。また土壌サンプルの全分解を行い、ミネラル抽出液を作製した。さらに土壌サンプルを遠心管にいれ、蒸留水を加えて振盪し水溶性ミネラルの抽出液を作製した。これら２種類のミネラル抽出液を、原子吸光光度分析に供し、各ミネラル（Mg、Fe、Mn）の全量、及び水溶性ミネラル量の測定を行った。

その結果、各ミネラルの全量は、Mg が約 1500 mg/kg、Fe が約 10,000 mg/kg、Mn が約 400 mg/kg、となった。水溶性ミネラルは、 Mg が約 13 mg/kg、 Fe が約 20 mg/kg、 Mn が約 0.3 mg/kg、となった。このことから植物が利用できる水溶性ミネラル量が少ないことが分かった。この結果をもとに炭素、窒素、リン、カリウム、微生物数を考慮し、ミネラル量との関係について解析を行った。

secondary macronutrients, micronutrients, agricultural

講演番号：4F11a01
講演日時、会場：3 月 29 日 09:00～ F 校舎 11 会場

ラッパウニ毒素タンパク質 Contractin A の cDNA クローニングと大腸菌による発現
cDNA cloning and expression of the venom protein Contractin A from the sea urchin *Toxopneustes pileolus*

○畠山 智充[1]、東 絵梨花[1]、海野 英昭[1]、郷田 秀一郎[1]、中川 秀幸[2]([1]長崎大院工、[2]徳島大院 SAS 研究部)
○Tomomitsu HATAKEYAMA[1], Erika HIGASHI[1], Hideaki UNNO[1], Shuichiro GODA[1], Hideyuki NAKAGAWA[2] ([1]Nagasaki Univ., [2]Univ. of Tokushima)

【目的】ラッパウニ(*Toxopneustes pileolus*)の体表には，小型、中型，及び大型の 3 種類の叉棘が存在し，さまざまな生理活性タンパク質を含む毒液を分泌する毒器官として機能している。このうち，中型叉棘からは、平滑筋収縮作用を示す Contractin A と名付けられたタンパク質が見出されている。Contractin A は平滑筋収縮作用の他にホスホリパーゼ C 様作用も示すが，その N-末端アミノ酸配列から，ヘビ毒素中のホスホリパーゼ A_2 との相同性が示唆されていた。そこで本研究では，Contractin A の N-末端アミノ酸配列をもとに，ラッパウニ叉棘からの cDNA クローニングを行うとともに，Contractin A の大腸菌での発現ならびにその性質について検討することを目的とした。
【方法・結果】ラッパウニ体表の叉棘を含む殻の部分から抽出した mRNA をもとに cDNA を調製し，Contractin A の N-末端 37 残基の配列をもとに作製した 2 種類の縮重プライマーを用いて PCR を行った。得られた DNA 断片の配列をもとに 5'-RACE 及び 3'-RACE を行って全塩基配列の決定を行った結果，Contractin A（166 残基）ならびに Contractin A に類似したより短いタンパク質（147 残基）の配列が決定された。後者に関しては，成熟タンパク質 N-末端の 21 番目のアミノ酸残基の違いから，UT841 と名付けられたタンパク質であることが分かった。これらの配列に基づいて相同性検索を行ったところ，両タンパク質はホスホリパーゼ A_2 との相同性を有することが明らかになった。ContractinA については，その翻訳領域を pET-3a ベクターに挿入後，大腸菌 BL21(DE3)pLysS を用いて発現した結果，インクルージョンボディーとして不溶性画分から回収された。そこで，これを変性剤で可溶化後，リフォールディングを行い可溶性タンパク質を得た。得られた組換え Contractin A がホスホリパーゼ活性を有するかを，蛍光物質である carboxyfluorescein (CF) 封入リポソームを用いて調べたところ，Ca^{2+} 存在下でリポソームからの CF 漏出に伴う蛍光強度の上昇がみられたことから，Ca^{2+}依存的な脂質分解活性を有することが示唆された。以上の結果から，Contractin A はホスホリパーゼ A_2 活性を有しており，その活性により筋肉収縮やその他の生理活性を細胞に引き起こす可能性が考えられた。

toxin, sea urchin, phospholipase

講演番号：4F11a02
講演日時、会場：3 月 29 日 09:11～ F 校舎 11 会場

トランスクリプトームから予想される超深海性ヨコエビの視覚の可能性

The possibility of the deep-sea amphipods' vision expected from transcriptome

○小林 英城[1]、針山 孝彦[2]、高見 英人[1]、荒井 渉[1]、高久 康春[2]、山濱 由美[2]、外山 美奈[2]([1]海洋機構、[2]浜松医大医)
○Hideki KOBAYASHI[1], Takahiko HARIYAMA[2], Hideto TAKAMI[1], Wataru ARAI[1], Yasuharu TAKAKU[2], Yumi YAMAHAMA[2], Mina TOYAMA[2] ([1]JAMSTEC, [2]Hamamatsu Univ.)

【緒言】我々はこれまで、世界最深部（深度約 10,000 m）に生息する超深海性ヨコエビ（カイコウオオソコエビ）の生態について研究してきた。カイコウオオソコエビは、セルラーゼを始めとした植物性多糖を分解する新規酵素群を利用し、流木等を分解・栄養源としていることを明らかにした(1)。しかしその生態は、まだ未解明な部分が多く残っている。カイコウオオソコエビ採取の際、寄せ餌として魚の切身を用いるが、暗黒で広大な超深海環境において、なぜ寄せ餌を感知できるのか不明である。そこで我々は、カイコウオオソコエビの感覚器関連蛋白質の発現プロファイルを検討する事で、彼らの感覚器に関する知見が得られると考えた。本研究ではカイコウオオソコエビ RNA の塩基配列決定を行い、感覚器蛋白質発現を精査し、特に超深海における視覚能の可能性について検討した。
【実験方法】伊豆小笠原海溝(深度 9,450 m)の海底にサバの切り身を寄せ餌に用いたベイトトラップを用いて、超深海性ヨコエビ類を採取し、凍結保存を行った。また、マリアナ海溝チャレンジャー海淵（深度約 10,900 m）からもカイコウオオソコエビを採取し、電子顕微鏡観察用にサンプルを船上にて固定した。RNeasy Lipid tissue kit (QIAGEN)にて抽出した RNA 試料よりライブラリーを作製し、Hiseq2000(Illumina 社)にて塩基配列決定を行った。アセンブル実行後、各コンティグについて相同性解析を行い、感覚器関連遺伝子の検索を行った。形態観察には通常の透過型電子顕微鏡法を用い、HPLC にて視物質発色団の光照射による異性化を解析した。
【結果と考察】形態的・遺伝的な特徴から、採取した超深海性ヨコエビはカイコウオオソコエビと同じ *Hirondellea gigas* であった。液体窒素保存した 7 個体（約 300 個体中）から、RNA の安定的な抽出に成功し、6,982 本の mRNA 塩基配列を決定した。相同性解析を行った結果、Opsin 等の視覚に関する遺伝子が発現していることがわかった。Opsin 遺伝子の系統解析を行った結果、洞窟に生息するヨコエビの長波長 Opsin 遺伝子と近縁であった。一方、視覚以外の感覚器に関連する蛋白質の発現は検出できなかった。カイコウオオソコエビの感覚器の中で、眼が機能する可能性が示唆された。そこで、電子顕微鏡観察にて頭部前方の構造を観察した所、レンズ系を欠落し光受容部であるラブドームが肥大した形態を示し高次神経が脳に投射していた。また、視物質を抽出し光照射実験を行った所、526 nm 付近の波長で発色団の高い光異性化が観察できた。これは水中透過性が最も高い波長（515 nm）と近接していた。カイコウオオソコエビの光感受性の高い可能性が示され、今後さらに検討する。
(1) H. Kobayashi, et al. (2012) PLoS ONE 7(8): e42727.

deep-sea animal, eye, opsin

講演番号：4F11a03
講演日時、会場：3 月 29 日 09:22～ F 校舎 11 会場

ミズクラゲの刺激性化合物による麻酔効果と TRPM チャネル関与の可能性

Anesthetic Effects of Pungent Compounds on Moon Jelly Fish (*Aurelia aurita*) and Molecular Cloning of the TRPM channels

○稲垣 英利[1]、久保 泰[1]、山本 俊政[2]、大塚 隆尚[2] ([1]産総研バイオメディカル、[2]岡山理大工)
○Hidetoshi Inagaki[1], Tai Kubo[1], Toshimasa Yamamoto[2], Takanao Otsuka[2] ([1]AIST, Biomedical Res. Inst., [2]Okayama Univ. of Sci. Fac. of Eng.)

近年の環境汚染と地球温暖化にともなうクラゲの局所的な大発生は、漁業等に深刻な被害を与えている。そのため、クラゲ個体数を制御する技術の確立が喫緊の課題となっているが、その前提となるような、クラゲの外部刺激（温度刺激、生理活性物質など）に対する応答性など、基本的な生理機能の解析はあまり進んでいない。

我々はミズクラゲ(*Aurelia aurita*)が、メンソール、カプサイシンなどの生理活性物質により、カサの開閉による遊泳運動を停止し、沈降する現象を見出した。これらの物質は哺乳類において TRP チャネルとよばれる一群のイオンチャネルを活性化することが知られている。我々はミズクラゲのこの現象にも TRP チャネルが関与していると考えて、ミズクラゲのゲノム DNA および cDNA を鋳型とした PCR により、２種類の CDS を含むミズクラゲ TRPM チャネル cDNA（5161 bp, 5431 bp）を単離することに成功した。これらミズクラゲ TRPM チャネルはアミノ酸配列で近縁のイソギンチャクのオーソログと 30%程度の相同性しか示さなかったものの、この内の１種類は C 末端側に ADP リボース・ホスホヒドロラーゼと類似する領域（NUDIX ドメイン）を持ち、TRPM2 のクラゲ・オーソログであることが明らかとなった。もう１種類のクラゲ TRPM チャネルは C 末端側の細胞内ドメインに既知の TRPM とは異なる特徴的なアミノ酸配列を持ち、そのチャネルの特性に興味が持たれた。

現在、これらの cDNA をアフリカツメガエル卵母細胞（pSD65）と動物培養細胞の発現ベクター(pcDNA3)にサブクローニングし、温度変化と各種の生理活性物質がクラゲ TRPM チャネルの活性に及ぼす影響を調べている。

Moon Jelly Fish, TRPM channel, Pungent Compound

講演番号：4F11a04
講演日時、会場：3 月 29 日 09:33～ F 校舎 11 会場

ミズクラゲ幼生に対する変態誘導物質 indomethacin の構造活性相関
A structure-activity relationship study of metamorphosis-inducing substance, indomethacin, for the moon jellyfish, *Aurelia aurita*.
○国吉 久人[1]、黒田 理絵[1]、辻田 菜摘[1]、中谷 みなみ[1]、小路 淳[1]、荒川 賢治[2] ([1]広島大院・生物圏、[2]広島大院・先端研)
○Hisato KUNIYOSHI[1], Rie KURODA[1], Natsumi TSUJITA[1], Minami NAKATANI[1], Jun SHOJI[1], Kenji ARAKAWA[2] ([1]Grad. Sch. Biosphere Sci. Hiroshima Univ., [2]Grad. Sch. AdSM Hiroshima Univ.)

【目的】刺胞動物ミズクラゲ(*Aurelia aurita*)のライフサイクルは、無性世代(ポリプ世代)と有性世代(クラゲ世代)を繰り返す。ポリプは出芽や分裂によって無性的に増殖し、冬期に海水温が低下すると、有性世代の前段階であるストロビラ幼生になる。ストロビラは胴体部に複数の節を持ち、１つ１つの節が盤へと形態変化する。さらに盤は一枚ずつ遊離してエフィラ幼生となり、成長して成体のクラゲとなる。ポリプからストロビラを経てエフィラに至る変態過程はストロビレーションと呼ばれ、無性世代から有性世代への転換期に位置づけられる。演者らはこれまでに、ストロビレーション誘導物質としてindole化合物の一種Indomethacin (IM)を見出している[*Biosci. Biotech. Biochem.*, **76**: 1397-1400 (2012)]。さらに、ストロビレーションの分子機構を解明するための分子プローブとして利用するために、IMをリード化合物として各種indole化合物のストロビレーション誘導活性を調べた。同時に、アンタゴニストの獲得も視野に入れてストロビレーション抑制活性も調べた。
【方法】ストロビレーション誘導活性は生物検定法(A)を用いて、抑制活性は生物検定法(B)と(C)を用いて評価した。(A)研究室内でポリプを25℃で飼育した場合、ストロビレーションは決して起こらず、ポリプとして無性増殖を続ける。25℃で培養したポリプ3～5匹を、試料物質を含む海水1 mL中25℃で培養し、ストロビレーションが誘導されるか観察した。(B)25℃で飼育したポリプを10℃のインキュベータに移すと、約5週間でストロビレーションが開始し、約6週間でストロビラになる。ストロビレーションへの運命決定が起こる前の4週間目にポリプ3～5匹を24穴プレートに移して、試料物質を含む海水1 mL中で、引き続き10℃で培養する。その後、ストロビレーションが阻害されるかどうか観察した。(C)通常25℃ではストロビレーションは起こらないが、IMを投与することによりストロビレーションを人工的に誘導できる。50 μM IMを投与すると5～6日目でストロビレーションが開始し、10～12日目にエフィラが遊離する。25℃で培養したポリプ3～5匹を、50 μM IMと試料物質を含む海水1 mL中25℃で培養し、IMによるストロビレーションの誘導が阻害されるか観察した。
【結果】IM は、indole 環の 1 位に *N*-(4-chlorobenzoyl)基、2 位に methyl 基、3 位に carboxymethyl 基、5 位に methoxy 基が置換された構造をとる。(A)の結果、2 位の methyl 基は誘導活性の発現に必須であること、活性を示す最小物質は 2-methylindole であること、5-methoxy-2-methylindole が最も強い活性(IM の 16000 倍)を示すことが明らかとなった。一方、2-methylindole-3-acetic acid、5-methoxyindole、indole-3-acetic acid が(B)と(C)の両方で抑制活性を示し、アンタゴニストの可能性が示唆された。

jellyfish, metamorphosis, indole

講演番号：4F11a05
講演日時、会場：3 月 29 日 09:44～ F 校舎 11 会場

ミズクラゲ幼生の変態に伴って発現上昇する遺伝子の解析
Molecular analysis of genes that are increased during metamorphosis of *Aurelia aurita* larvae.
○辻田 菜摘[1]、桑原 宏行[1]、今井 つかさ[1]、矢中 規之[1]、小路 淳[1]、荒川 賢治[2]、国吉 久人[1]([1]広島大院・生物圏、[2]広島大院・先端研)
○Natsumi TSUJITA[1], Hiroyuki KUWAHARA[1], Tsukasa IMAI[1], Noriyuki YANAKA[1], Jun SHOJI[1], Kenji ARAKAWA[2], Hisato KUNIYOSHI[1] ([1]Grad. Sch. Biosphere Sci. Hiroshima Univ., [2]AdSM Hiroshima Univ.)

【目的】刺胞動物ミズクラゲ (*Aurelia aurita*) の生活史は、無性世代であるポリプ世代と有性世代であるクラゲ世代を繰り返す。ポリプ世代からクラゲ世代への転換期には、ストロビレーションとよばれる特徴的な変態がおきる。ストロビレーションは、ポリプの胴部に複数の節が生じてストロビラ幼生となる分節形成期と、ストロビラの節の一つ一つがそれぞれエフィラ幼生に変態する形態形成期から成る。エフィラはその後、一枚ずつ遊離し、成体のクラゲへと成長する。ストロビレーションはミズクラゲの生活史において世代交代の鍵となるステップであるとともに、成体クラゲの個体数を決める重要な過程である。本研究では、ストロビレーションの分子メカニズムの解明を目指し、ストロビレーションに伴って発現量が変動する遺伝子群(DEG; Differentially-expressed Gene)を探索した。さらに、得られた DEG のうち、ストロビラ特異的遺伝子 *S2* について、詳細な解析を進めた。
【方法】ストロビレーション過程における DEG を得るために、ポリプと分節形成期ストロビラのそれぞれから Proteinase K 法(Schroth *et* al., 2004)により total RNA を調製し、Differential display 法(Yanaka *et* al., 2003)によるスクリーニングをおこなった。得られた候補遺伝子について、RT-PCR 法と real-time RT-PCR 法による解析をおこない、発現変動が定量的に確認できた遺伝子を DEG とした。
【結果】本研究のスクリーニングにより、ポリプ特異的遺伝子 1 個とストロビラ特異的遺伝子 4 個を同定した。このうち、ストロビラ特異的遺伝子 *S2* について解析を進めた。RT-PCR により各変態ステージでの *S2* の発現量を調べた結果、ポリプでは発現量が低く、ストロビレーションに伴って増加し、形態形成期ストロビラでピークに達した後、エフィラでは減少した。このことから、形態形成期で特に重要な機能を担っている可能性が示唆される。現在、*S2* の発現細胞を同定するために *in situ* hybridization を進めている。*S2* の ORF は、リソソーム酵素の一種 aspartylglucosaminidase (AGA)と高い相同性を示した。AGA はリソソーム酵素の一種であり、N 結合型糖鎖が付加したアスパラギンをアミノ糖とアスパラギン酸に加水分解する反応を触媒する。このことから、*S2* がストロビレーションに際して、リソソームによる糖タンパク質構成成分のリサイクルに関与する可能性が考えられた。そこで、リソソーム機能阻害物質(chloroquine, bafilomycin A1)をストロビレーション中の各変態ステージのストロビラに投与した結果、形態形成期ストロビラの形態異常が観察された。この表現型が AGA の機能阻害に起因するものかどうかは確認できていないが、リソソームの活動がストロビレーションに関与することを強く示唆する結果である。

lysosome, jellyfish, metamorphosis

講演番号：4F11a06
講演日時、会場：3 月 29 日 10:05～ F 校舎 11 会場

RNA-sequencing 解析によるフタホシコオロギ *Gryllus bimaculatus* の脳神経系ペプチドの同定
Identification of neuropeptides by RNA-sequencing from the two-spotted cricket, *Gryllus bimaculatus*

○永田 晋治[1]、塚本 悠介[1]、鈴木 穣[2] ([1]東大院・新領域・先端生命、[2]東大院・新領域・メディカル情報)
○Shinji NAGATA[1], Yusuke TSUKAMOTO[1], Yutaka SUZUKI[2] ([1]Univ of Tokyo, Frontier Science, Integrate Biological Science, [2]Univ of Tokyo, Frontier Science, Computational Biology)

【目的】昆虫の摂食行動は、脳神経系を中心とした局所脳神経系ネットワークにより調節されることをこれまで明らかにしてきた。実際には、脳神経系の摂食中枢と考えられる脳–食道下神経節–前額神経球が作る局所神経回路で、いわゆる脳神経ペプチドホルモンが、摂食行動のモチベーションを調節していることと考えられる。昆虫における、摂食行動を調節するペプチド性因子群は、これまでにモデル昆虫であるカイコ *Bombyx mori* を用いて同定してきた。ところが、カイコは単食性昆虫であるため、本能的な栄養分依存性の探餌行動(Self-selection)を研究するには、実験の実践上で不都合が生じる。そこで、私たちは、これまでに雑食性であるフタホシコオロギ *Gryllus bimaculatus* を用いて、摂食行動に関わる生理学的な行動実験や、それを評価するための自動行動観察系をはじめ、RNA 干渉法などの分子生物学的手法を用いた分子生物学的手法など、非モデル生物を用いて摂食行動研究を実践するためのインフラを整備してきた。ここでは、局所脳神経系ネットワークの解析を進めるため、フタホシコオロギの脳および食道下神経節の Transcriptome 解析を、次世代シーケンサーを用いた RNA-sequencing により解析し、脳神経系に発現している脳神経ペプチドホルモンをはじめとするペプチド性因子を同定することを目的とした。

【方法・結果】フタホシコオロギの成虫雌から、脳および食道下神経節から RNA を抽出し、次世代シーケンサーillumina Hiseq2000 を用いて RNA-sequencing 解析を行った。非モデル生物であるため、Trinity にて *de novo* assembly し、約 8062 万リードから約 9.2 万の Contig を得た。各 Contig のアノテーションには、BLAST2GO により全 Contig を blastx 解析した。その結果、摂食行動の調節に重要であると考えられるペプチド性因子群の転写物を明らかにすることができた。興味深いのは他の昆虫種では複数種あるインスリン様ペプチドを有する Contig は、1 コピーしか見い出すことができなかった。また、一つの遺伝子に複数のペプチドのサブタイプを有する short neuropeptide F に関しても、一つのサブタイプしか見い出すことができなかった。これらは、昆虫のペプチド性因子の進化的多様性を考えるうえで重要な情報であるとともに、今後、摂食行動の脳神経系におけるペプチド性因子のネットワーク解析を行う上で有用な情報が得られた。

Insect, RNA-sequencing, peptide

講演番号：4F11a07
講演日時、会場：3 月 29 日 10:16～ F 校舎 11 会場

フタホシコオロギ *Gryllus bimaculatus* におけるアラトスタチン B タイプによる摂食行動の制御機構の解明

Elucidation of the mechanism regulating feeding behavior by the allatostatin B in the two-spotted cricket, *Gryllus bimaculatus*

○塚本 悠介、永田 晋治（東大院・新領域・先端生命科学）
○Yusuke TSUKAMOTO, Shinji NAGATA (Graduate School of Frontier Sciences, the University of Tokyo)

【目的】昆虫の摂食行動を制御する因子として、脳神経系に存在する神経ペプチドがある。これまで、多くの昆虫種で、摂食行動を正および負に制御する様々な神経ペプチドが同定されてきた。私たちは、フタホシコオロギ *Gryllus bimaculatus* において、摂食行動のモチベーション変化や選好性変化など、行動が修飾される現象に関し、内分泌系に着目して研究してきた。前年度の本大会において、フタホシコオロギを用いて、絶食条件下における成虫の脳および食道下神経節内で認められる一連のペプチド群の量的な変動を MALDI-TOF MS によって測定した結果を報告した。その際、他の昆虫種でも摂食行動を制御することが報告されているアラトスタチン B タイプ(ASTB)が、絶食により顕著に変動することを見い出した。ASTB は、カイコなどでは脳腸ペプチドとして知られており、多くの末梢神経が付随する組織で発現していることが知られている。つまり、このペプチドが生体内で多くの役割を担いながら摂食行動を調節していることが予想できる。そこで本研究では、生体内の各組織における ASTB のペプチドとしての存在およびその転写レベルの変動、さらには ASTB 受容体(ASTBR)の発現解析から、ASTB が制御する摂食行動の分子機構を明らかにすることを目的とした。
【方法・結果】フタホシコオロギの成虫の各組織由来の 0.1%トリフルオロ酢酸を含む 60%アセトニトリルにより粗抽出液を調製し、逆相カートリッジで粗精製後に MALDI-TOF MS を用いて ASTB に相当するイオンピークが観測されるかを確認した。その結果、脳や食道下神経節、胸部神経節などの脳神経系由来の粗精製画分と腸管由来の粗精製画分に ASTB に相当するイオンピークが確認された。また、先行研究で明らかにされている ASTB をコードする cDNA の部分配列を用いて、RT-PCR により組織別発現様式を確認したところ、MALDI-TOF MS により観測された組織と同様の組織での発現が確認された。続いて、ASTBR を同定するため、次世代シーケンサーを用いた RNA-sequencing 解析により、成虫の食道下神経節内の転写産物を網羅的に解析した。その結果、他の昆虫種で既に同定されている ASTBR と塩基配列上で相同性の高い部分配列と考えられる Contig を得た。この ASTBR の部分配列を含む Contig の塩基配列を用いて組織別発現を解析したところ、成虫の個体では、脳神経系および腸管に限らず全身に広く発現していた。このことからも、ASTB が脳腸ペプチドとして生体内に万遍なく作用して、摂食行動モチベーションを調節している可能性が示唆された。また、栄養分の不足する絶食時の行動修飾のみならず、その他の摂食行動が修飾されるイベント時に、ASTB がどのように量的に変動しているかを検討することが今後の課題である。

feeding behavior, Gryllus bimaculatus, neuropeptide

講演番号：4F11a08
講演日時、会場：3 月 29 日 10:27～ F 校舎 11 会場

フタホシコオロギ *Gryllus bimaculatus* における自然免疫に関わる転写因子 dorsal の同定
Identification of dorsal crucial for the innate immune system in the two-spotted cricket, *Gryllus bimaculatus*
○伊藤 尚子、永田 晋治（東大院・新領域・先端生命科学）
○Naoko ITOH, Shinji NAGATA (Grad. Sch.Fro. Sci., Univ. of Tokyo)

【目的】生物は、体外から栄養分を取り込むことにより生命を維持する。この栄養分の取り込みや行動レベルまでの制御、すなわち摂食行動の制御は、内分泌系で維持されていることが知られている。そのため、昆虫においても同様に、摂食行動は、厳密に内分泌系で制御されていると考えられる。私たちは、これまでフタホシコオロギ(*Gryllus bimaculatus*)を用いて、摂食行動の分子メカニズムを明らかにすることを目指し研究してきた。ここでは、個体の健康状態の変化と連動し、摂食行動のモチベーションが変動するような行動修飾の現象に着目することとした。昆虫は、他の生物と同様に、細菌などに感染すると摂食行動の活性が減衰することが観察される。そこで、本研究では、昆虫の自然免疫が摂食行動のモチベーションをどのようなメカニズムで変化するかを明らかにすることを目指し、その予備的な知見を得ることを目的とした。実際には、先ず、細菌に感染後のフタホシコオロギの摂食行動の変化を観察し、次に、自然免疫系において中心的な役割を担う転写因子 NF-κB の相同遺伝子を同定することとした。
【方法・結果】先ず、フタホシコオロギが菌感染により摂食量が変動するかを検討した。グラム陽性菌である *Enterococcus faecalis* を注射した場合、摂食量が減少する傾向が見られ、その後多くの個体は死亡した。この現象を分子レベルで明らかにするため、フタホシコオロギの自然免疫に関わる転写因子 NF-κB ファミリーのタンパク質を同定することを試みた。既にキイロショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* などの先行研究によると、NF-κB 様タンパク質として、*dorsal*、*relish*、*dif* の 3 種があるため、それぞれに対して、Harvard 大学の C. Extavour 博士らのグループが構築したフタホシコオロギ embryo の RNA-sequencing によるデータベース ASGARD、および私たちが構築している脳神経系および腸管由来の RNA-sequencing データベースを検索した。その結果、各データベースの配列中から、Relish 様タンパク質および Dorsal 様タンパク質をコードすると演繹される Contig が数種類見い出された。そこで、*dorsal* に相同性を有する Contig に対するプライマーを設計し、抗菌ペプチドなどが発現している脂肪体の cDNA を鋳型 DNA とし、PCR にて増幅を試みた。その結果、5 種類の Contig のうち、2 種の Contig について cDNA の増幅が認められた。これらの、Contig は *Drosophila* の *dorsal* の Rel homology domain を有しており、それぞれ 77%、63%の同一性を有していた。

NF-kappa B, *Gryllus bimaculatus*, dorsal

講演番号：4F11a09
講演日時、会場：3 月 29 日 10:38～ F 校舎 11 会場

フタホシコオロギ *Gryllus bimaculatus* の脂肪酸不飽和化酵素 *Δ*9-および *Δ*12-desaturase の発現変動解析

Expression analysis of *Δ*9- and *Δ*12-desaturases in the two-spotted cricket, *Gryllus bimaculatus*.

○福村 圭介[1]、小沼 貴裕[2]、永田 晋治[1]([1]東大院・新領域・先端生命科学、[2]東大院・農生科・応生化)

○Keisuke FUKUMURA[1], Takahiro KONUMA[2], Shinji NAGATA[1] ([1]Grad. Sch. of Fro. Sci., the Univ. of Tokyo, [2]Grad. Sch. Agric. Life Sci., the Univ. of Tokyo)

【目的】昨年度の本大会にて私たちは、フタホシコオロギ(*Gryllus bimaculatus*)における脂肪酸不飽和化酵素 *Δ*9-desaturase (*Δ*9)、*Δ*12-desaturase (*Δ*12)を同定したことを報告した。これらの酵素は、脳神経系、腸管および脂肪体で主に発現していた。発現部位を解析している際に、各酵素の発現レベルが食餌、あるいは栄養状態で変動することを見い出した。そこで、本研究では *Δ*9、*Δ*12 の各酵素の発現レベルがどのように摂食行動と関連して変動するかを明らかにすることを最終目標とした。本発表では、その第一段階として、フタホシコオロギの *Δ*9、*Δ*12 の発現変動を各摂食状態で詳細に分析し、それぞれの発現レベルに影響を及ぼす栄養分を餌の中から見い出すことを目的とした。

【方法・結果】*Δ*9、*Δ*12 の発現レベルが栄養状態により変動するかを確認するため、通常摂食および絶食状態のフタホシコオロギ成虫の各組織の発現レベルを定量的 RT-PCR により測定した。その結果、絶食させた個体から摘出した脂肪体では、*Δ*9 および *Δ*12 の発現レベルが顕著に減少した。一方、48 時間の絶食により、減少した脂肪体の *Δ*9 および *Δ*12 の発現レベルは、12 時間の再給餌により、それぞれ約 70 倍、150 倍にまで回復した。そこで、餌に含まれている *Δ*9 および *Δ*12 の発現レベルを調節する栄養分を特定するため、先ずは、アセトン抽出により脂質成分を除去した餌を、絶食させた個体に与えた。その結果、セルロース粉末にアセトン抽出液を添加した餌を与えた対照群では、*Δ*9 および *Δ*12 の発現レベルが低いレベルを保ち変動しなかったのに対し、アセトンにより脱脂した餌を与えた個体の脂肪体における *Δ*9 および *Δ*12 の発現レベルは、通常摂食の個体の発現レベルまで回復した。次に、アセトン抽出後の残渣を、水でさらに抽出し、その残渣をフタホシコオロギに与えた。その結果、脂肪体内の *Δ*9 および *Δ*12 の発現レベルは、通常摂食の個体のレベルまで回復した。しかし、水抽出液をセルロース粉末に添加して調製した餌を与えた場合においても、*Δ*9 および *Δ*12 の発現レベルは、通常摂食の個体のレベルまで回復した。これらのことから、脂肪体における *Δ*9 および *Δ*12 の発現レベルを調節している栄養分は、アセトンに不溶性で、かつ水溶性、あるいは水に難溶性の成分であることが分かった。つまり、*Δ*9 および *Δ*12 それぞれの酵素の基質となるパルミチン酸、ステアリン酸やオレイン酸ではない、ということが示唆された。

Gryllus bimaculatus, Feeding behavior, *Δ*9-, *Δ*12-desaturases

講演番号：4F11a10
講演日時、会場：3 月 29 日 10:49～ F 校舎 11 会場

昆虫前胸腺刺激ホルモンのレセプターTorso はジスルフィド結合を介して二量化している

Disulfide-bond-mediated dimerization of Torso, a receptor for insect prothoracicotropic hormone.

○此上 祥史、楊 易文、荻原 麻理、引場 樹里、片岡 宏誌、齋藤 一樹（東大院・新領域・先端生命）
○Tadafumi Konogami, Yiwen Yang, Mari H. Ogihara, Juri Hikiba, Hiroshi Kataoka, Kazuki Saito (Univ. Tokyo)

昆虫は脱皮・変態という特徴的な発育過程を有し、その過程は前胸腺刺激ホルモン（PTTH）などの神経ペプチドによって厳密に制御されている。PTTH は前胸腺に作用して脱皮ホルモンの生合成・分泌を促進するが、そのレセプターは長い間明らかにされてこなかった。2009 年、ショウジョウバエを用いた研究から、PTTH は、『Torso』と呼ばれるチロシンキナーゼ型レセプター（RTK）を介して細胞内のシグナル制御キナーゼ（ERK）のリン酸化を促進することが報告された。そこで私たちは、PTTH による Torso 活性化の分子機構を解明するために Torso の分子的性状を調べることにした。

多くの RTK に見られる「リガンド刺激による二量化と、その結果起こる自己リン酸化」といったレセプター活性化の過程が Torso にも見られるかを調べるために、*Drosophila* S2 培養細胞にカイコガ Torso を発現させ、リコンビナントのカイコガ PTTH による刺激の有無で、Torso の二量化や自己リン酸化を比較した。架橋剤 BSOCOES を用いて調べたところ、Torso では、リガンド刺激がなくても二量体が検出されることがわかった。そこで、架橋剤処理なしで同様の実験を繰り返したところ、還元条件下の SDS-PAGE では単量体しか観察されないのに対して、非還元条件下の SDS-PAGE では Torso のほとんどが二量体として観察されることが明らかになった。これらの結果から、Torso は、リガンド刺激の有無にかかわらず、ジスルフィド結合により二量化しているものと考えられる。さらに、カイコガ Torso の細胞外領域のみを分泌発現させたものでは単量体しか観察されないこと、スルホン酸が付加された BSOCOES の親水性アナログ架橋剤では架橋効率が著しく低下したことなどから、Torso の二量化に関わる分子間ジスルフィド結合は細胞膜貫通領域近傍に存在しているものと推測された。カイコガ Torso には膜貫通領域に 3 つのシステイン残基が含まれているが、Torso の二量化におけるそれらのシステイン残基の関与を明らかにするために、現在、膜貫通領域のシステイン残基を他のアミノ酸に置換した変異体を作製している。

他の RTK と同様に PTTH 刺激依存的な Torso の自己リン酸化が確認されていることから、リガンド刺激の有無にかかわらず二量化している Torso は、PTTH の結合によって大きな立体構造変化が生じて活性化しているのではないかと考えられる。リガンド刺激前から多量化している例はインスリンレセプターなどにも見られるが、膜貫通領域でジスルフィド結合を形成している RTK の例は Torso が初めてである。このような特徴的な二量体構造が PTTH による Torso の活性化機構に深く関わっていると考えられる。

disulfide bond, PTTH, membrane receptor

講演番号：4F11a11
講演日時、会場：3 月 29 日 11:10～ F 校舎 11 会場

ボンビコール産生メカニズムにおけるリパーゼの活性化機構
Activation mechanism of lipase in the bombykol biosynthetic pathway
○大西 敦[1,2]、松本 正吾[2] ([1]帝京平成大薬、[2]理研分子昆虫)
○Atsushi OHNISHI[1,2], Shogo MATSUMOTO[2] ([1]Teikyo-Heisei Univ., [2]RIKEN)

【目的】カイコガ性フェロモン（ボンビコール）は、その合成・分泌に特化した器官であるフェロモン腺（PG）で*de novo*に生合成される。その産生は、食道下神経節で合成されるペプチドホルモンPBAN（pheromone biosynthesis activating neuropeptide）により調節されている。PBANとPG細胞膜上のPBAN受容体との結合は、下流のシグナル伝達経路を活性化し脂肪滴内に貯蔵されたトリアシルグリセロール(TAG)の分解を誘導する。この脂肪滴TAGリポリシスにより、TAGからボンビコール前駆体が遊離し、最終的に前駆体がpgFARによる還元を受けボンビコールが産生する。これまでに、我々は脂肪滴TAGリポリシスに関与するリパーゼ（Bmpglipase-3）を同定した。しかしながら、ボンビコール産生において、Bmpglipase-3の活性がPBANによってどのように調節されているのかは分かっていない。今回、抗体を作製し、それを利用してPBANによるBmpglipase-3の活性調節について解析した。
【方法】抗Bmpglipase-3抗体を作製し以下の実験を行った。(1)抗Bmpglipase-3抗体を用いてPG細胞の免疫染色、細胞抽出物のWestern blottingを行い、PG細胞におけるBmpglipase-3の局在を調べた。(2)PBAN注射、未注射のメスのカイコガからPGを摘出した後、脂肪滴画分を調製し、抗Bmpglipase-3抗体を用いて免疫沈降を行った。さらに3種類の抗リン酸化アミノ酸抗体(Ser, Thr, Tyr)を用いて免疫沈降物のWestern blottingを行うことにより、PBANの刺激はBmpglipase-3のリン酸化を引き起こすのかどうかを確認した。(3)脂肪滴に局在する機能分子の1つBmLsd1との相互作用を調べるために、脂肪滴画分を抗BmLsd1抗体で免疫沈降した後、抗Bmpglipase-3抗体を用いたWestern blottingを行うことにより、PG細胞内でBmpglipase-3はBmLsd1と相互作用するのかどうかを確認した。
【結果】(1) 抗Bmpglipase-3抗体、Nile Redを用いたPG細胞の組織染色、およびPG細胞抽出物のWestern blottingの結果、Bmpglipase-3はPG細胞内の脂肪滴に局在することを確認した。(2) 脂肪滴画分と抗Bmpglipase-3抗体の免疫沈降物を抗リン酸化アミノ酸抗体で検出した結果、PBANの刺激によってSer残基がリン酸化を受けることが分かった。(3)脂肪滴画分を抗Bmpglipase-3抗体により免疫沈降し、抗BmLsd1抗体で検出した結果、BmLsd1とBmpglipase-3はPG細胞の脂肪滴で複合体を形成していることが示された。以上の結果から、Bmpglipase-3はPG細胞内の脂肪滴でBmLsd1と相互作用しており、PBANシグナルを受けるとBmpglipase-3、BmLsd1は共にリン酸化を受ける。このリン酸化シグナルが脂肪滴TAGリポリシスを誘導し、さらにはボンビコールの産生を促進させることが示唆された。

pheromone, lipase, Bombyx mori

講演番号：4F11a12
講演日時、会場：3 月 29 日 11:21～ F 校舎 11 会場

アブラムシ口針に存在する構造タンパク質の探索

Proteomics approach for the search of a structural protein in the aphid stylets

○大中 悠斗[1]、深尾 陽一朗[2]、青木 考[1] ([1]大阪府大、[2]奈良先端大)
○Yuto ONAKA[1], Yoichiro Fukao[2], Koh Aoki[1] ([1]Osaka Prefecture Univ., [2]Nara Institute of Science and Technology)

【目的】アブラムシは口針を篩管に刺し込むことで篩管液を摂取する。口針は篩管に向かって直線的に挿入されるのではなく、細胞を迂回して挿入される。このような挿入経路を実現するために、口針には硬さと柔軟性が同時に要求される。口針は表皮の一部であり、昆虫の表皮はキチンや脂質、タンパク質で構成されている。表皮の物理特性はこれらの比率により決定され、一般に硬い表皮ではタンパク質の占める割合が高いとされる。表皮の構成成分の分析は唾液腺や消化管、頭など昆虫の様々な部分に関して行われている。しかしながら、口針の構成成分は未だ明らかにされていない。そこで本研究では口針の物理特性に寄与するタンパク質の同定を目的として、質量分析法を用いたエンドウヒゲナガアブラムシ(*Acyrthoiphon pisum*)　口針中のタンパク質の検出を試みた。
【方法・結果】アブラムシ 150 頭から単離した口針を SDS-PAGE サンプルバッファーで抽出し、SDS-PAGE、ゲル内消化を行った。この試料中のペプチドを質量分析計（Thermo Scientific LTQ-Orbitrap XL）を用いて分析した。その結果 38 個のタンパク質が同定された。このうち ACYPI001625-PA は歯の象牙質の形成や石灰化に関与する象牙質シアロリンタンパク質との相同性が示唆された。現在我々は ACYPI001625-PA を口針の物理特性に寄与する候補タンパク質とし、対応する遺伝子のクローニングを行っている。

Dentin sialophosphoprotein, aphid, stylets

講演番号：4F11a13
講演日時、会場：3 月 29 日 11:32～ F 校舎 11 会場

線虫 *C. elegans* における新たなインスリン様シグナル制御機構
A new regulatory mechanism of insulin-like signaling in *C. elegans*
○河野 強[1]、松永 洋平[1,3]、本田 陽子[2]、本田 修二[2]、岩崎 崇[1]、門田 裕志[3]、Benian Guy[3] ([1]鳥取大院・連農、[2]都・健康長寿医療センター、[3]エモリー大・病理)
○ Tsuyoshi KAWANO[1], Yohei MATSUNAGA[1,3], Yoko HONDA[2], Shuji HONDA[2], Takashi IWASAKI[1], Hiroshi QADOTA[3], Guy Benian[3] ([1]Tottori Univ., [2]Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology, [3]Emory Univ.)

線虫 *C. elegans* のインスリン様シグナルは幼虫休眠ならびに寿命などを制御する。現在、線虫のインスリン様分子は 40 種存在すると予想されており、S-S 結合の個数・様式により 3 種に分類されている。演者らは一昨年の本大会において、哺乳動物のインスリン族ペプチド（3 対の S-S 結合）と異なる S-S 結合様式を有する INS-35（Type-α）が主に腸で産生され体腔に分泌されることにより、アゴニストとして休眠・寿命を制御することを報告した。

本大会では、通常生育時には体腔側に分泌される INS-35 は休眠時において腸管内に分泌され（分泌極性の変動）、経時的に分解されることを報告する。併せて、他のインスリン様分子 INS-7（Type-β：4 対の S-S 結合）も、同様に休眠時において腸管内に分泌され（分泌極性の変動）、経時的に分解されることを報告する。この発見はペプチドホルモンの新たな制御機構を提示するものである。

参考文献
Honda Y, et al. Scientific Reports, 2:487 (2012).

Caenorhabditis elegans, insulin, seretion polarity

講演番号：4F11a14
講演日時、会場：3 月 29 日 11:43～ F 校舎 11 会場

サツマイモネコブセンチュウの忌避/誘引物質
Repellents / attractants of *Meloidogyne incognita*
○井藤 恭仁子、中島 清実、岩崎 崇、一柳 剛、河野 強（鳥取大院・農・生命資源科学）
○Kuniko ITO, Kiyomi NAKASHIMA, Takashi IWASAKI, Tsuyoshi ICHIYANAGI, Tsuyoshi KAWANO (Tottori Univ.)

【研究背景と目的】
植物寄生性線虫であるネコブセンチュウは甚大な農業被害をもたらし、全世界での年間被害総額は約 4 兆円と推計される。なかでもサツマイモネコブセンチュウ(*Meloidogyne incognita*)は幅広い農作物に寄生し、収量への直接的な影響が大きいことから、最も警戒すべき種であるといえる。現在施用されている有効なネコブセンチュウ防除法として土壌薫壌があるが、コスト・労力・労働衛生・環境汚染の面で問題となっており、施用中止が検討されている。そこで本研究では、土壌薫壌に代わり得る安全かつ環境に優しいネコブセンチュウ防除法の開発を目指した。生態系への影響と人体への安全性を考えて、殺虫剤ではなく忌避・誘引効果による *M. incognita* 防除を指向した。まず、忌避物質の探索資源としてイチゴに着目した。イチゴはサツマイモネコブセンチュウによる被害を受けないことが知られている。イチゴの根粗抽出物が、*M. incognita* に対して忌避活性を示すことを確認した後、忌避物質の精製を試みた。一方、発表者らは、自活性土壌線虫(*Caenorhabditis elegans*)の休眠打破に関与するとの報告があるオレイン酸がサツマイモネコブセンチュウに対して誘引活性を示すことを見出した。そこで、類似化合物を用いた構造活性相関実験を行った。

【方法及び結果】
（忌避物質） イチゴの根 1000 株を 80%MeOH を用いて抽出後、活性炭にて一次処理を行った。次いで、*M. incognita* に対する忌避性を指標として、各種クロマトグラフィーによる精製を行った。現在、順相 HPLC を用いた最終精製を行っている。
（誘引物質） オレイン酸が *M. incognita* に対する忌避活性を示すことをうけて、類似化合物である種々の高級不飽和脂肪酸(パルミトレイン酸、リノール酸、リノレン酸等)について誘引活性を検証した。その結果、誘引活性にはシス型の 2 重結合が 9 位に存在することが重要であると結論付けた。また、カルボキシメチル化誘導体は誘引活性を完全に消失することから、カルボン酸の存在が重要であることが判明した。一方、上記脂肪酸は *C. elegans* には誘引活性を示さなかったことから、これらの物質の誘引性は種特異的であると結論づけた。

Meloidogyne incognita, repellents, attractant

講演番号：4F11a15
講演日時、会場：3 月 29 日 11:54～ F 校舎 11 会場

クマムシにおける乾燥耐性獲得時の遺伝子発現変動解析

Characterization of gene expression changes in tardigrade during acquisition of desiccation tolerance.

○近藤 小雪[1]、加藤 由起[2]、白髭 克彦[2]、久保 健雄[1]、國枝 武和[1]([1]東大・院理・生物科学、[2]東大・分生研)
○ Koyuki KONDO[1], Yuki KATOU[2], Katsuhiko SHIRAHIGE[2], Takeo KUBO[1], Takekazu KUNIEDA[1] ([1]Tokyo Univ., [2]IMCB)

クマムシ類はこれまでに約 1000 種が知られる体長 1mm 以下の水生動物である。一部の種は周囲の乾燥に伴い脱水し、「乾眠」と呼ばれる無代謝状態に移行することで乾燥ストレスに耐えることができる。我々はこれまでに、池底に生息するヤマクマムシ *Hypsibius dujardini* が、直接強い乾燥（相対湿度 10%）に暴露されると死亡するものの、予めプレコンディショニングと呼ばれる 1 日以上の弱い乾燥（相対湿度 98%）にさらすことで強い乾燥への耐性（乾眠能力）を獲得すること、さらにこの乾眠能力の獲得過程には新規の転写が必須であることを示した。これらの結果はヤマクマムシが弱い乾燥を感知して耐性関連遺伝子の転写を誘導する機構をもつことを示唆しているが、その分子機構は全く不明であった。

今回、我々はその分子機構を解明する目的で、先ずプレコンディショニングによって発現誘導される遺伝子群の同定を試みた。乾燥前、プレコンディショニング 6 時間後、24 時間後のヤマクマムシについてトランスクリプトーム(totalRNA-seq)解析を行い、ドラフトゲノム配列にマップした結果をもとに既知の protein coding gene model と統合した新たな遺伝子モデルを構築した。その結果、17,064 個(43%) の non-coding 遺伝子 (NC) と 23,021 個(57%)の protein coding 遺伝子(PC)を同定した。活動前と各サンプルの発現量を cuffdiff を用いて比較し、活動前の FPKM が 1 以上の遺伝子のみを対象として解析した結果、乾燥 6 時間後に乾燥前より 4 倍以上発現増強した遺伝子 (初期遺伝子)は 282 あり、そのうち NC は 53%、PC は 47%であった。一方、乾燥 24 時間後に乾燥前より 4 倍以上発現増強した遺伝子(後期遺伝子)は 382 あり、そのうち NC は 45.5%、PC は 54.5%であった。初期遺伝子には全遺伝子と比較して NC が多く検出されたことから、プレコンディショニング初期には NC の発現がより盛んであると考えられる。初期及び後期遺伝子には、これまで乾燥耐性への関与の可能性が指摘されたクマムシ固有の熱可溶性タンパク質 CAHS の遺伝子も含まれており、今回同定された誘導遺伝子は耐性関連遺伝子の良い候補と考えられる。さらに、誘導遺伝子は既存の転写因子により新規に転写されて発現する遺伝子（一次応答遺伝子）と、一次応答遺伝子及び既存の mRNA が新規に翻訳されて転写カスケードが進むことで誘導される遺伝子(二次応答遺伝子)に分けられる。先に同定した初期及び後期遺伝子について一次応答遺伝子か二次応答遺伝子かを区別するため、プレコンディショニング前にクマムシを翻訳阻害剤で処理し、新規な翻訳を阻害した条件で同様にプレコンディショニング 6 時間後と 24 時間後のヤマクマムシについて totalRNA-seq 解析を行ったところ、 282 の初期遺伝子のうち、翻訳阻害により 2 倍以下に発現が低下した遺伝子は 36 あり、これらは二次応答遺伝子と考えられる。残りの遺伝子は翻訳阻害しても発現誘導が維持されたことから、これらは乾燥によって最初に転写される一次応答遺伝子と考えられる。また、プレコンディショニングによって誘導される CAHS 遺伝子は 3 つあるが、このうち 2 つは翻訳阻害剤の影響を受け、残り 1 つは影響が見られなかったことから、プレコンディショニングによって発現誘導される同じ遺伝子ファミリーにおいても、その転写制御は遺伝子ごとに異なることが示唆された。

tardigrade, RNA-seq, gene expression changes

講演番号：4F26a02
講演日時、会場：3 月 29 日 09:11～ F 校舎 26 会場

配糖体 Leptosperin の免疫化学的検出によるマヌカ蜂蜜の認証評価

Authentication of Manuka Honey by Immunochemical Detection of Leptosperin

○加藤 陽二[1]、荒木 裕佳子[1]、重里 真希[1]、藤中 里衣[1]、石坂 朱里[1]、北元 憲利[1]、新田 陽子[2]、丹羽 利夫[3]、瀧本 陽介[4] ([1]兵庫県大環境人間、[2]岡山県大保健福祉、[3]尚絅学院大健康栄養、[4]（株）ヘルスケアシステムズ)

○Yoji Kato[1], Yukako Araki[1], Maki Juri[1], Rie Fujinaka[1], Akari Ishisaka[1], Noritoshi Kitamoto[1], Yoko Nitta[2], Toshio Niwa[3], Yosuke Takimoto[4] ([1]Univ. Hyogo, [2]Okayama Pref. Univ., [3]Shokei Gakuin Univ., [4]Healthcare Sys. Inc.)

ニュージーランドで得られるマヌカ蜂蜜は、過酸化水素非依存性の抗菌活性を有することで知られ、抗菌活性の高いものほど高い価格で販売されている。このため抗菌活性を測定し、結果を商品に表示する認証（品質保証）が行われている。抗菌活性の主体はメチルグリオキザール（MGO）とされており、MGO の量を化学的に測定して認証に用いる企業もある。MGO は、マヌカの花に特徴的に存在するジヒドロキシアセトンが採蜜されて貯蔵保存中にアミノカルボニル反応により変換されて生じる。また化学反応性の高いアルデヒドであり、消費者の手元に届くまでに成分量は変動する。加熱により増加することから、人為的な加熱処理や試薬 MGO（合成品）を蜂蜜に添加することも可能である。また、マヌカ蜂蜜として売られていても、実際にはその中身がマヌカ花蜜の純度の極めて低いマルチフローラル蜂蜜（複数の花から採蜜）を疑わせる事例が認められる。食の偽装を防ぎ、食の安全安心を守るためにマヌカ蜂蜜の純度に特異的なマーカーが必要とされている。

演者らはマヌカ蜂蜜から、メチルシリンゲートをアグリコンとし、ゲンチオビオース（糖）とβ-グリコシド結合した新規配糖体 Leptosperin を発見し、マヌカ蜂蜜に特有の成分であることを発表している（Kato et al., J. Agric. Food Chem. 2012, 2014)。本研究では Leptosperin の特異抗体を樹立し、多検体処理の可能な ELISA や迅速簡便なイムノクロマトグラフィーによる測定法を開発したので、報告する。

市販マヌカ蜂蜜より単離精製した Leptosperin をキャリアーたんぱく質に結合させ、免疫源として用いてモノクローナル抗体を取得した。特異性解析の結果、アグリコンであるメチルシリンゲートやゲンチオビオースとは交差性を示さず、Leptosperin のみに特異的に反応することがわかった。マヌカ蜂蜜中の抗原物質は Leptosperin であることを HPLC 分画及び競争 ELISA により確認した。ELISA による Leptosperin 測定系を構築し、Unique Manuka Factor（UMF）協会提供のマヌカ蜂蜜や市販の蜂蜜を測定したところ、HPLC や LC/MS/MS による測定法と高い相関が認められた。20 分程度の反応時間で定量できるイムノクロマトチップも開発し、HPLC や ELISA 測定との高い相関を確認した。HPLC や ELISA による分析は検査機関で、またイムノクロマトは加えて採蜜現場や小売業者、消費者に至るまで Leptosperin 量を簡便に測定できる。Leptosperin は熱に比較的安定であり、マヌカ蜂蜜に特徴的に含まれる物質であることから、マヌカ蜂蜜の純度保証（品質保証）に優れたマーカーになる可能性が高い。

manuka honey, leptosperin, antibody

講演番号：4F26a03
講演日時、会場：3 月 29 日 09:22～ F 校舎 26 会場

ショウガオールによるβ-グルクロニダーゼ活性の阻害

Inhibitory effect of shogaol on ß-glucuronidase activity

紀岡 怜奈[1]、大場 輝子[2]、遠藤 栄一[2]、○橋本 啓[1]([1]宇都宮大農、[2]遠藤食品)
Reina KIOKA[1], Teruko OHBA[2], Eiichi ENDO[2], ○Kei HASHIMOTO[1] ([1]Utsunomiya Univ., [2]Endo Foods Co., Ltd.)

【目的】　発がん物質などの生体異物は肝臓においてグルクロン酸などにより抱合化され、胆汁と共に十二指腸へと移行し体外へと排出される。しかし、腸内細菌の産生するβ-グルクロニダーゼは、解毒過程でグルクロン酸抱合された変異原物質を脱抱合・活性化してしまうため、β-グルクロニダーゼ活性を阻害することで大腸がんのリスクを低下できるものと期待されている。そこで我々は各種野菜抽出物やファイトケミカルが、β-グルクロニダーゼ活性に及ぼす影響の検討を進めた。その結果、ニラに特徴的なファイトケミカルであるメチルメタンチオスルフィネートにβ-グルクロニダーゼ阻害活性を見出した[1]。香味野菜に関してさらにアッセイを続けたところ、新たにショウガ抽出物にβ-グルクロニダーゼ阻害活性を見出したので、本研究は、ショウガに特有の辛み成分である、ジンゲロールとショウガオールのβ-グルクロニダーゼ阻害活性について検討することを目的とした。

【方法】　96 穴マイクロプレートの各ウェルにアッセイ試料、β-グルクロニダーゼ溶液(大腸菌由来, 12 units/mL)を 50 μL ずつ加え、37℃で 10 分間プレインキュベートした。その後、基質溶液(4-nitrophenyl-β-D-gluculonide, 0.6 mM) 50μL を加え、37℃で 405 nm における吸光度を測定した。最初の 10 分間の吸光度の変化速度を β-グルクロニダーゼ活性とし、コントロールを基準としてアッセイ試料による β-グルクロニダーゼ活性の阻害率を算出した。

【結果】　ジンゲロールには有意なβ-グルクロニダーゼ阻害活性は認められなかった。一方で、ショウガオールは濃度依存的にβ-グルクロニダーゼ活性を阻害した。また、ショウガオールなどと共にバニロイド類であるカプサイシンには阻害活性が認められなかった。以上の結果から、阻害活性にはバニリル基部分ではなく、側鎖部分の構造が関与しているものと考えられた。Lineweaver-Burk プロットにより阻害様式を検討した結果、ショウガオールによるβ-グルクロニダーゼ阻害活性は混合型非拮抗阻害であると考えられた。

[1] Watanabe, Y, et al.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 77, 2325-2327 (2013)

β-glucuronidase, shogaol, vanilloid

講演番号：4F26a04
講演日時、会場：3 月 29 日 09:33～ F 校舎 26 会場

ペパーミントに含有されるリファンピシン処理 HepG2 細胞における CYP3A4 mRNA 誘導阻害物質の研究

An effective inhibitor isolated from peppermint, *Mentha x piperita* L., on cytochrome P450 3A4(CYP3A4) mRNA induced by rifampicin in HepG2 cells

○小林 司、名取 李花、南葉 美穂、煙山 紀子、菅谷 紘一、小野瀬 淳一、阿部 尚樹（東農大・応生科）
○Tsukasa Kobayashi, Rika Natori, Miho Nanba, Noriko Kemuriyama, Kouiti Sugaya, Jun-ichi Onose, Naoki Abe (Faculty of Applied Bio-Science, Tokyo Univ. of Agri)

【目的】
近年、食品と医薬品の相互作用により重篤な副作用を起こしたり、医薬品の効力が低下するといった問題に注目が集まっている。CYP3A4 は薬物代謝に最も関与する酵素の一つであるが、医薬品により CYP3A4 の誘導に対するハーブなどの食品との相互作用における遺伝子発現への影響に関する報告が少ないのが現状である。本研究では薬剤処理により CYP3A4 mRNA を誘導した細胞に対するハーブ中の成分が遺伝子発現に与える影響を検討した。

【方法・結果】
リファンピシン処理にて CYP3A4 を誘導した HepG2 に、有機溶媒を用いた各種ハーブ抽出物を添加し CYP3A4 誘導阻害活性のスクリーニングを行った。リアルタイム RT-PCR を用いて各種ハーブ抽出物に対する CYP3A4 の遺伝子発現を測定したところ、ペパーミント抽出物に、強い CYP3A4 mRNA の誘導阻害が認められた。
ペパーミント抽出物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーを用いて分画し、同様の検討を行ったところ、フラクションの 1 つに特に強い CYP3A4 mRNA 誘導阻害が示された。このフラクションを HPLC 及び TLC を用いて精製を行い化合物 1 を単離した。化合物 1 の NMR や LC/MS のスペクトルデータを、文献値と比較することにより pheophorbide a と同定した。
Pheophorbide a を CYP3A4 mRNA 活性試験に供したところ IC_{50} 値 2.57 μM を与えた。また、ペパーミント乾燥葉中の pheophorbide a の含有量を HPLC を用いて定量したところ、通常ペパーミントティーに使われる量である乾燥葉 2 g 中には、5.8 mg の pheophorbide a が含有されていることが示された。

【結論】
Pheophorbid は光過敏症を引き起こすことでも知られており、光過敏症の最小作用量 25 mg/man/day との報告がある。ペパーミントの摂取は含有される pheophorbide a により、リファンピシンの CYP3A4 mRNA 誘導に対して効果的に阻害する可能性が予期されることから、摂取量を調節することで、食薬相互作用における機能性因子として有効利用が期待される

CYP3A4, Pheophorbide A, *Mentha x piperita* L.

講演番号：4F26a05
講演日時、会場：3 月 29 日 09:44～ F 校舎 26 会場

醤油中 hTRPV1 活性化成分の単離および味修飾作用の評価

Isolation of hTRPV1 activating component in soy sauce and its taste modification effect.

○押田 麻由[1]、松浦 靖典[1]、茂木 喜信[1]、渡辺 達夫[2] ([1]ヤマサ醤油、[2]静岡県立大学食品栄養科学部)
○Mayu OSHIDA[1], Yasunori MATSUURA[1], Yoshinobu MOGI[1], Tatsuo WATANABE[2] ([1]Yamasa Corporation, [2]University of Shizuoka)

食塩はヒトに必要不可欠な成分である一方で、過剰摂取による血圧上昇や脳卒中、心臓疾患との関連が考えられている。そこで減塩に対する需要は今後ますます大きくなることが予想される。一方、塩味の弱い食事には物足りなさを感じる場合が多く、単に食塩量を減らした食事を継続して摂ることは難しい。そのため風味を損なわない効果的な塩味増強剤を利用することにより、無理なく減塩を続けられることが健康の維持には望ましいと考えられる。

醤油の味は、基本五味を中心に様々な味質が複雑に作用しあって形成されている。しかし、今日に至っても醤油の味に関連している全ての要素が明らかになっているわけではない。醤油は、食塩濃度が同じでも塩味強度に差が感じられる場合があることから、醤油中に塩味に影響を与える未知物質の存在が推察された。

ヒトの塩味受容には上皮性ナトリウムイオンチャネル(ENaC)が関連している。しかし、ENaC の阻害剤であるアミロライドを作用させた場合にも塩味に対する応答が完全には阻害されないことから、アミロライド非感受性の塩味応答機構が存在していると考えられている。アミロライド非感受性の塩味応答機構の候補として hTRPV1(human Transient Receptor Potential Vanilloid 1)があり、主要な hTRPV1 活性化成分であるカプサイシンを用いて減塩醤油の塩味を補う技術や hTRPV1 活性化成分が塩味や旨味に影響を与えることが報告されている。hTRPV1 がアミロライド非感受性の塩味応答機構を担っているか否かは明らかになっていないが、hTRPV1 活性化成分により何らかの塩味様刺激が生じる可能性がある。そこで、醤油中の hTRPV1 活性化成分の探索と、味覚修飾作用の評価を行った。

hTRPV1 活性を指標に醤油の溶媒抽出物を分画し、高い hTRPV1 活性を有する画分を精製した。各種機器分析による構造解析により、精製画分には Perlolyrine(以下 PL)を含むことが明らかになった。PL を有機合成し、hTRPV1 活性を測定したところ、EC_{50} は 2.87μM であり、hTRPV1 特異的な阻害剤である BCTC によって応答が有意に抑制されることが確認された。さらに PL は hTRPV1 と同じ TRP チャネルスーパーファミリーに属する hTRPA1 も活性化させ、EC_{50} は 1.67μM だった。次いで PL が味に与える影響を官能検査にて評価したところ、食塩溶液に PL を 5μM 添加すると有意に塩味を向上させることが分かった($p<0.05$)。さらにだし溶液に PL を 5μM 添加すると旨味とコクを有意に向上させることが分かった($p<0.05$)。

hTRPV1, salty taste, umami

講演番号：4F26a06
講演日時、会場：3 月 29 日 10:05～ F 校舎 26 会場

ピロロキノリンキノンによる AGEs 形成抑制作用の解析

Inhibition of advanced glycation end-products formation by pyrroloquinoline quinone

○大関 菖平、大塚 曜、早瀬 文孝、渡辺 寛人（明治大農）
○Shohe OOZEKI, Yo OOTUKA, Fumitaka HAYASE, Hirohito WATANABE (Meiji Univ)

【目的】メイラード反応により生体内に蓄積する AGEs（advanced glycation end products）はその受容体を介して細胞障害をひきおこし、糖尿病合併症などの疾患の原因となると考えられている。とくにグリセルアルデヒド（GLA）由来の AGEs は強い生理作用をもつことが明らかとなっており、なかでも GLAP（glyceraldehyde-derived pyridinium-type advanced glycation end product）と呼ばれるタンパク質リジン残基の修飾構造が重要であると考えられている。

一方、メイラード反応を阻害して AGEs の形成を抑制する薬剤・成分は、合併症などの疾患の発症を抑制しうると期待される。われわれは、これまでに AGEs 形成を阻害する食品・生体関連成分を探索し、*o*-キノン骨格を持つ PQQ（pyrroloquinoline quinone）がメイラード反応の重要中間体であるアマドリ化合物分解活性を有することを報告している（1)。しかしながら、アマドリ化合物を作用点とする PQQ が AGEs 形成を阻害し、細胞障害作用を抑制しうるかは明らかでない。そこで本研究においては、PQQ の AGEs 形成抑制能や、PQQ 共存下で形成された GLA 由来 AGEs の生理作用について解析を行った。

【方法】1. PQQ の存在下または非存在下で GLA とさまざまなタンパク質を 37℃で 5 日間反応させた後、透析によりタンパク質画分を回収した。これを酸加水分解、固相抽出（Sep-PakC18）に供した後、形成した GLA 由来 AGEs を LC/MS により定量するとともに、アミノ酸残基の損傷率を定量した。

2. PQQ の存在下または非存在下で GLA と反応させることにより、BSA を AGEs 化させた。反応後に透析によって PQQ や未反応の GLA など低分子を除去したものを GLA 由来 AGEs のモデル（GLA-BSA）とした。これをマウスマクロファージ様細胞株 RAW264 に作用させ、mRNA 発現変化について解析した。

【結果】PQQ は主要な GLA 由来 AGEs である GLAP や MG-H1 構造の形成を阻害し、アミノ酸残基の損傷を抑制した。また、PQQ 存在下で調製した GLA-BSA の遺伝子発現におよぼす作用は、非存在下で調製したものに比較して弱いことが明らかとなった。これらの結果から、メイラード反応において PQQ を共存させることにより、強い生理作用をもつ GLAP などの構造の形成が阻害され、AGEs の細胞障害作用が抑制されると考えられた。

PQQ, maillard reaction, advanced glycation end products

講演番号：4F26a07
講演日時、会場：3 月 29 日 10:16～ F 校舎 26 会場

β3 アドレナリン受容体に作用する抗肥満食品成分の探索に向けた高感度スクリーニング系の構築
A sensitive system for screening of anti-obesity food factors acting at ß3 adrenergic receptors
○太田 広人、大野 秀美、森村 茂、新留 琢郎 (熊本大院・自然科学)
○Hiroto OHTA, Hidemi OHNO, Shigeru MORIMURA, TAKURO NIIDOME (GSST, Kumamoto Univ.)

【目的】現代人の抱える健康問題の一つにメタボリックシンドロームや糖尿病をはじめとする肥満が原因で起こる重大な疾患がある。これらを予防する目的として、様々な機能性食品が開発されているが、効能のみに注目が集まり、作用機構が不明瞭なものも多い。そのため、普段から摂取している食品の中から、特定の作用点に働く抗肥満成分を見つけることができれば、そのような成分を含む食材を活用した新しい食事療法や、より安心・安全な機能性食品・サプリメントの開発につながると期待される。そこで本研究では、脂肪分解や熱産生を司る β3 アドレナリン受容体 (β3AR) に注目し、β3AR に直接アゴニストとして作用する食品成分を探索するための高感度スクリーニング系を構築することを目的とした。
【方法】これまで、CHO-K1 細胞に発現させた β3AR に対するアゴニスト活性を CRE-SEAP レポーターアッセイで評価してきたが、感度の面で問題があった。そこで、変異受容体 β3AR /F308A を作製し、バックグラウンドを下げる方法を試みたが、期待する結果は得られなかった。CHO-K1 細胞ではこれ以上の感度の向上は望めないと判断し、ホストを HEK-293 細胞に変更した。種々の条件検討を行い、下記の条件を確定した。β3AR 安定発現 HEK-293 細胞（β3AR/HEK 細胞）に SEAP 発現ベクター pCRE-SEAP を一過的に導入し、1 日培養した。96 穴培養プレートに細胞を 4×10^4 cells/well で播き直し、さらに 1 日培養した。その後、供試化合物を含む無血清培地に交換した。5 時間培養後、培地を交換し、SEAP 誘導のため 1 日培養した。その上清の SEAP 活性を発光で測定した。この条件のもと、代表的なアドレナリン受容体アゴニストに加え、いくつかの食品成分のアゴニスト活性を評価した。
【結果】β3AR/HEK 細胞に対するイソプロテレノールやノルアドレナリンのアゴニスト活性を CRE-SEAP アッセイで評価した結果、CHO-K1 細胞の時よりも高い応答を得るができた。食品成分として、発酵食品に含まれるチラミン及びフェネチルアミン、柑橘類に含まれるオクトパミン及びシネフリン、茶カテキンの一種 EGCG、フラボノイド類のケルセチン及びゲニステインを評価した。その結果、チラミンとフェネチルアミンに濃度依存的なアゴニスト活性が認められたのに対し、類縁のアミン化合物であるオクトパミンとシネフリン、EGCG にはアゴニスト活性は認められなかった。高濃度のケルセチンにはわずかにアゴニスト活性が認められ、カテコール骨格がその活性に寄与していることが推察された。以上の結果から、β3AR/HEK を用いた CRE-SEAP アッセイは、従来までの CHO-K1 細胞よりも高感度なスクリーニング系として利用できることが分かった。

β3 adrenergic receptor, food factor, GPCR

講演番号：4F26a08
講演日時、会場：3 月 29 日 10:27～ F 校舎 26 会場

ソバスプラウト乳酸発酵物に含まれる血管拡張物質
Vasodilating compounds in fermented buckwheat sprouts

○中村 浩蔵[1]、石田 竜也[1]、野尻 恵資[1]、小山 正浩[1]、猪狩 直樹[2]([1]信州大農、[2]大和薬品)
○Kozo NAKAMURA[1], Ryuya ISHIDA[1], Keisuke NOJIRI[1], Masahiro KOYAMA[1], Naoki IGARI[2]
([1]Shinshu Univ., [2]Daiwa Pharm.)

【目的】ソバスプラウト乳酸発酵物（FBS）は，高血圧自然発症ラット(SHR)に対して優れた降圧作用を引き起し，その主要な降圧メカニズムは血管拡張作用とアンジオテンシン I 変換酵素（ACE）阻害作用である[1)]。FBS からは，これまでに ACE 阻害物質として 7 種の降圧ペプチドが単離されているが，血管拡張物質は単離されていない。そこで本研究では，FBS に含まれる血管拡張物質を分離精製，構造決定し，生理活性を評価することを目的とした。

【方法】血管拡張物質の精製と構造決定　FBS 濃縮物から，アセトン抽出，固相抽出（Sep-Pak C18），ゲルろ過クロマトグラフィ（Sephadex G-15）によってゲルろ過画分（1.63 g）を得た。ゲルろ過画分を，疎水性カラムを用いた HPLC により細分画し，血管拡張作用の高い HPLC 画分を得た。LC-MS/MS と NMR 分析で HPLC 画分に含まれる化合物の構造を決定した。
血管等尺性張力測定試験　雄性 10～12 週齢 SHR 胸部大動脈血管リング標本を，フェニレフリン収縮させた状態で評価対象化合物を累積添加し，張力変化を記録した。
単回経口投与試験　絶食した雄性 12 週齢 SHR（n=6）に，評価対象化合物を単回経口投与し，投与前および投与後 3，6，9，24 時間後に収縮期血圧および拡張期血圧をテイルカフ法で測定した。降圧作用は，純水を投与した対照群（n=6）との比較で評価した。

【結果】ゲルろ過画分の LC-MS/MS 分析によって，トリメチルアンモニウム基を有する化合物の存在が推定された。そこで，血管拡張作用を指標として疎水性カラムを用いた HPLC 分取を行い，分取物の NMR 分析によって 3 種のコリンエステル，アセチルコリン（AcCh），プロピオニルコリン（PrCh），ブチリルコリン（BuCh）を同定した。それぞれの化合物の最大血管拡張率は，AcCh 89.9%（$10^{-6.5}$ M），PrCh 95.2%（10^{-4} M），BuCh 7.14%（10^{-4} M）であり，AcCh と PrCh の EC_{50} はそれぞれ 2.72×10^{-8} M，2.27×10^{-6} M であった。また，単回経口投与試験の結果，AcCh と PrCh は SHR の血圧を有意に低下させたが，BuCh の降圧作用は確認できなかった。AcCh と PrCh は，低用量で血管拡張作用と単回経口投与試験での有意な降圧作用を示したことから，FBS の降圧作用に関与していると考えられた。

[1)] Nakamura, K. et al., *J. Funct. Foods*, 5, 406 (2013)

choline esters, vasodilatation, fermented food

講演番号：4F26a09
講演日時、会場：3 月 29 日 10:38～ F 校舎 26 会場

ソバスプラウト乳酸発酵物に含まれる新規コリンエステルの探索
Search for a new choline ester in fermented buckwheat sprouts
○興津 翔[1]、山崎 遼[1]、森田 恵梨[1]、石田 竜也[1]、小山 正浩[1]、猪狩 直樹[2]、中村 浩蔵[1]([1]信州大農、[2]大和薬品)
○Sho OKITSU[1], Ryo YAMAZAKI[1], Eri MORITA[1], Ryuya ISHIDA[1], Masahiro KOYAMA[1], Naoki IGARI[2], Kozo NAKAMURA[1] ([1]Shinshu Univ., [2]Daiwa Pharm.)

【目的】哺乳類の神経伝達物質であるアセチルコリン(AcCh)は，哺乳類の他にもあらゆる生物種中に広く存在し細胞機能調節または細胞間の情報伝達物質として利用されている。AcCh の他にも天然から複数のコリンエステルが発見されており，プロピオニルコリン(PrCh)，ブチリルコリン(BuCh)は節足動物や軟体動物中に存在することが報告されている。我々は，高血圧自然発症ラット(SHR)において低用量で降圧作用を示すソバスプラウト乳酸発酵物(FBS)から，これらのコリンエステル類を単離し，降圧作用に関与していることを明示した。LC-MS 分析の結果，FBS にはこれらのコリンエステル以外にトリメチルアンモニウム基を有する化合物の存在が示唆された。そこで，本研究では FBS に含まれる新規コリンエステル類を単離・精製し，生理活性を評価した。
【方法】コリンエステルの精製　大和薬品株式会社で製造された FBS の凍結乾燥物を，固相抽出と 2 回の HPLC 分離により精製した。まず，コリンエステル類を陽イオン交換樹脂に吸着させ，洗浄後，塩酸で溶出した。この塩酸画分を凍結乾燥後， ODS カラムと疎水性カラムを用いて，2 段階の HPLC 精製を行った。HPLC 精製物は LC-MS/MS 分析，^{1}H-NMR，^{13}C-NMR 解析により構造を決定した。
生理活性試験　構造決定したコリンエステルを化学合成し，生理活性試験に用いた。血管拡張作用は雄性 11 週齢 SHR 由来胸部大動脈を用いた血管等尺性張力試験，降圧作用は雄性 11 週齢 SHR を用いた単回経口投与試験により評価した。
【結果】FBS 凍結乾燥物(11.5 g)を陽イオン交換カートリッジで精製し，塩酸画分(収量：540 mg，収率:4.70%)を得た。次に，塩酸溶出画分(540 mg)を ODS カラムで HPLC 精製し， ODS 画分(収量:140 mg，収率：25.9%)を得た。最後に，疎水性カラムを用いて ODS 画分(140 mg)の HPLC 精製を行い，疎水性カラム画分(収量:2.31 mg，トータル収率:0.0201%)を得た。疎水性カラム画分を LC-MS/MS 分析，^{1}H-NMR，^{13}C-NMR で構造解析したところラクチルコリン(LaCh)と同定された。血管等尺性張力試験で，化学合成した D-および L-LaCh の累積添加を行ったところ，有意な血管拡張作用が認められた。また，SHR への単回経口投与試験を行ったところ，収縮期および拡張期血圧が有意に低下した。LaCh は，コリンエステラーゼの基質であり，原料である乳酸およびコリンが生体内で生成することから，生体に存在すると予測された[1]。しかし，これまでに天然物としての単離例は報告されていないと考えられる。
[1] RAMA, B. V. et al., *Proc. Intern. Pharmacol.* Meeting, 1st, Stockholm, 1961, 7, 323-31.

choline esters, lactylcholine, natural product

講演番号：4F26a10
講演日時、会場：3 月 29 日 10:49～ F 校舎 26 会場

食品中コリン化合物の同時定量法の開発

Development of simultaneous quantitative method for choligenic compounds in foods

○森田 恵梨[1]、三輪 優莉絵[1]、興津 翔[1]、小山 正浩[1]、猪狩 直樹[2]、中村 浩蔵[1] ([1]信州大農、[2]大和薬品)
○ Eri MORITA[1], Yurie MIWA[1], Sho OKITSU[1], Masahiro KOYAMA[1], Naoki IGARI[2], Kozo NAKAMURA[1] ([1]Shinshu Univ., [2]Daiwa Pharm.)

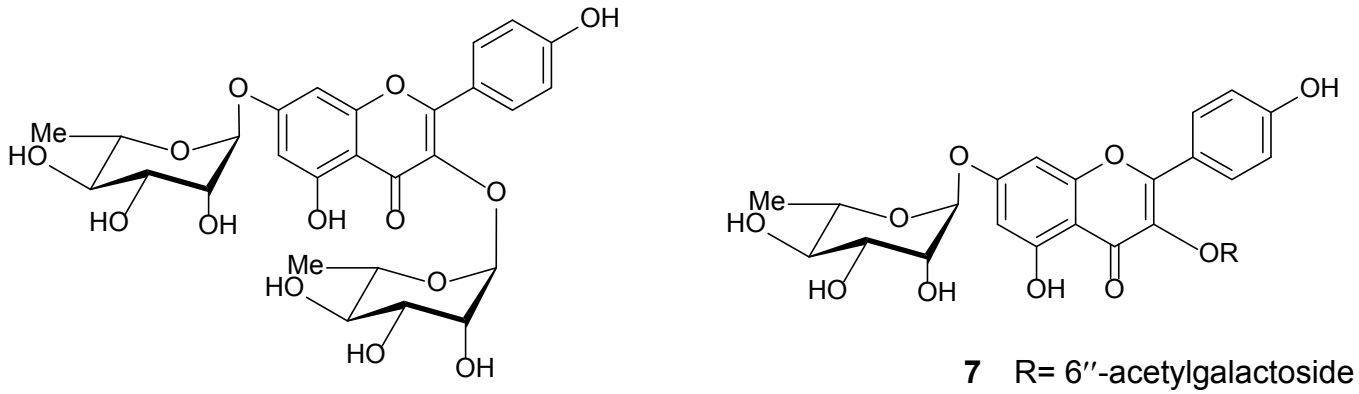
【目的】降圧作用を有するソバスプラウト乳酸発酵物から，アセチルコリン（AcCh），ブチリルコリン（BuCh），ラクチルコリン（LaCh），プロピオニルコリン（PrCh）が単離，同定された。これまでにこれらのコリン化合物が加工食品中から単離された報告は見当たらず，新たな食品機能性成分として期待される。また，ソバスプラウト乳酸発酵物にはコリン（Ch）も含まれていた。そこで本研究では，これらのコリン化合物 5 種（AcCh，BuCh，Ch，LaCh，PrCh）の含量を正確に定量するための同時定量法の開発を目的とした。
【方法】ソバスプラウト乳酸発酵物凍結乾燥物に内部標準を添加したものを，陽イオン交換カートリッジで処理することでコリン化合物を分離し分析試料を調製した。コリン化合物の定量は，LC/MS/MS 分析 Multiple Reaction Monitoring (MRM)モードを使用し，化学合成したコリン化合物標準品を用いた標準添加法で行った。分析条件は以下の通り。LC/MS/MS システム：ACQUITY UPLC, Waters Quattro micro API，カラム：疎水性カラム（4.6×250 mm），カラム温度：40℃，移動相：0.010%ギ酸-33%メタノール含有水，流速：0.50 mL/min，イオン化方法：ESI(+)，Cone 10 eV，Collision 10 eV，MRM 設定：AcCh（*m/z* 146.1→87.00），BuCh（*m/z* 174.10→115.00），Ch（*m/z* 104.20→60.20），LaCh（*m/z* 176.10→117.05），PrCh（*m/z* 160.10→101.00）。定量法の妥当性は，妥当性ガイドライン（「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドライン」厚生労働省）に従い 6 つの分析能パラメータ（直線性，真度，日内再現性，日間再現性，検出限界，定量限界）を求め，確認した。
【結果】コリン化合物に共通する第四級アルキルアンモニウム構造と強い相互作用を有する陽イオン交換処理および指定した質量電荷比イオンのみを選択する MRM モードの使用により，定量対象以外の夾雑物を効果的に除去できた。その結果，GC/MS によるコリン化合物定量の検出限界 50 pmol に比べて高感度な定量（検出限界 2 pmol）が可能となった。また，標準添加法の利用により，マトリックス効果の影響を最小限に抑えることができ，厳密な定量が可能となった。本定量法の妥当性を確認した結果，真度は 96～98%，精度は日内再現性が 1%未満，日間再現性が 2%未満と，真度，精度共に高いことが示された。本定量法でソバスプラウト乳酸発酵物中のコリン化合物を定量した結果，ソバスプラウト乳酸発酵物 100 g 中に含まれる AcCh，BuCh，Ch，LaCh，PrCh の量は，それぞれ 1.19 mg，2.24×10^{-4} mg，13.6 mg，2.79 mg，0.128 mg であった。真度，精度に優れ，高感度である本定量法は，様々な食品中のコリン化合物定量に利用可能であると考えられた。

choligenic compounds, quantification, LC/MS/MS

講演番号：4F26a11
講演日時、会場：3 月 29 日 11:10～ F 校舎 26 会場

ソラマメスプラウトのポリフェノール成分
Polyphenols in Faba bean sprouts
○奥村 小春[1]、細谷 孝博[1]、河原崎 海[2]、熊澤 茂則[1] ([1]静岡県大・食栄、[2]エコプロ・リサーチ)
○Koharu OKUMURA[1], Takahiro HOSOYA[1], Kai KAWARAZAKI[2], Shigenori KUMAZAWA[1] ([1]Univ. of Shizuoka, [2]Eco Pro Research Co., LTD.)

【目的】ソラマメ (*Vicia fava* L.) は世界中で食べられているマメ科植物である。種子部分を食するのが一般的であるが、近年ソラマメのスプラウトが開発され、販売されるようになってきている。スプラウトは、種子と比較し、ポリフェノールなどの栄養成分量が豊富であるという報告はあるが、詳細は未解明である。また、ソラマメには L-DOPA 等のカテコールアミンが含まれていることが知られているが、他のポリフェノール成分についての研究は種子、葉に関するものがほとんどである。そのため、本研究はソラマメスプラウト中の成分を単離、同定し、付加価値を与えることを目的とした。
【方法】ソラマメスプラウト (三和農林株式会社提供) の凍結乾燥物 35 g を 80% MeOH で抽出し、水とクロロホルムおよび酢酸エチルで順次分配した。各層を HPLC の 270 nm で分析したところ、酢酸エチル層において、8 本のピークを確認した。この 8 本のピークを分取 HPLC で単離・精製し、化合物 **1** (1.3 mg)、化合物 **2** (1.4 mg)、化合物 **3** (3.2 mg)、化合物 **6** (2.8 mg)、化合物 **7** (5.8 mg)、化合物 **8** (4.6 mg)を得た。得られた化合物について、NMR、MS などの各種分析機器を用いて構造解析した。
【結果】単離した化合物について、構造解析を行った結果、化合物 **6**~**8** はフラボノイド配糖体の Kaempferol 3,7-di-*O*-rhamnoside (**6**)、Kaempferol 3-*O*-(6″-*O*-acetyl)galactoside-7-*O*-rhamnoside (**7**)、Kaempferol 3-*O*-(6″-*O*-acetyl)glucoside-7-*O*-rhamnoside (**8**)であった。化合物 **2**、**3** は化合物 **7**、**8** の acetyl 基を有していないものだと考えられた。化合物 **4**、**5** を含め詳細は本学会で報告する。



6

図 1. ソラマメスプラウトから単離した化合物

faba bean sprouts, polyphenol, kaempferol glycoside

講演番号：4F26a12
講演日時、会場：3 月 29 日 11:21～ F 校舎 26 会場

ブドウ球菌エンテロトキシン A 遺伝子伝播の作用機序およびポリフェノール成分によるその制御機構の解明

Mechanism of gene transfer of staphylococcal enterotoxin A and their inhibition by polyphenols

○尾崎 順哉、島村 裕子、柴田 昌治、増田 修一 (静岡県立大学)
○Junya OZAKI, yuko Shimamura, Masaharu Shibata, Shuichi Masuda (University of shizuoka)

【目的】我々は、これまでにエンテロトキシン A (SEA) 産生株および非産生株の 2 種の黄色ブドウ球菌株のコロニーが偶然接触した際に、SEA 産生株のコロニーが溶菌し、非産生菌株に SEA 遺伝子が伝播することを確認している。しかし、その作用機序およびその制御機構については明らかになっていない。そこで本研究では､SEA 遺伝子伝播の作用機序とポリフェノール成分によるその制御機構について検討した。
【方法】SEA 産生株として *Staphylococcus aureus* No.29 (EM^r、SEA$^+$、溶菌株: ドナー)を非産生株として *S. aureus* No.77 (KM^r、SEA$^-$、非溶菌株: アクセプター) を供試菌株として用いた。No.29 株と No.77 株を、2 槽を膜で隔てた培養器（二槽式透析培養器）の各槽に各々植菌し、37℃で 72 時間透析培養して No.77 株が産生する低分子物質（膜通過物質）が No.29 株の溶菌を誘導するか検討した。また、SEA 遺伝子伝播にバイオフィルムの形成が関与していることが示唆されたことから、ポリフェノール類およびそれらを主成分とする既存食品添加物、計 12 試料のバイオフィルム形成抑制能およびバイオフィルム形成関連遺伝子（*ica*D）の発現抑制能について、クリスタルバイオレット染色法およびリアルタイム RT-PCR 法を用いて検討した。さらに、バイオフィルム形成抑制能が認められた試料については、SEA 遺伝子伝播に対する抑制能を Wsetern blot 法およびリアルタイム RT-PCR 法を用いて測定した。
【結果】二槽式透析培養器を用いて No.29 株と No.77 株を透析培養した結果、24 時間後に No.29 株の濁度が低下し、また 72 時間後では No.77 株に SEA 遺伝子の伝播が認められたことから、SEA 産生株 (No.29 株) の溶菌を誘導する低分子物質の存在が示唆された。さらに、No.29 株の溶菌が誘導され、No.77 株のバイオフィルムの形成後に SEA 遺伝子の伝播が起こる可能性が示唆された。そこで、ポリフェノール類および既存食品添加物 12 試料を用いてバイオフィルム形成阻害能を調べたところ、7 試料がバイオフィルムの形成およびバイオフィルム形成関連遺伝子の発現を抑制した。さらに、これら 7 試料は、SEA 産生および SEA 遺伝子発現を抑制したことから、バイオフィルムの形成と SEA 遺伝子伝播には関連性があることが示唆された。現在、SEA 産生株の溶菌を誘導する低分子物質の分離を検討している。

staphylococcal enterotoxin A, gene transfer, polyphenol

講演番号：4F26a13
講演日時、会場：3 月 29 日 11:32～ F 校舎 26 会場

アピオスの茎部におけるイソフラボン

Characteristics of isoflavone in stem of groundnut (Apios americana Medik)

○奈良 一寛[1]、小笠原 康雄[2] ([1]東京家政学院大、[2]青森県庁)
○ Kazuhiro NARA[1], Yasuo OGASAWARA[2] ([1]Tokyo Kasei Gakuin Univ., [2]Aomori pref. government)

【目的】北米原産のツル性植物であるアピオス（*Apios americana* Medik）は、1m 以上も根茎が伸び、5～10cm 間隔で節を付ける。それが地上部の生長とともに次第に大きく肥大し、数珠状に連なった塊茎となり、その塊茎が食用部となる。一般に、塊茎の採取の際には、茎部は除去されているが、茎部の除去には多くの時間と労力を必要としているため、有用な利用法や除去処理の時間短縮および労力軽減などが望まれる。

ダイズおよびその加工品以外で生理機能が期待できるイソフラボン類を摂取することは、通常の食生活における食物では困難であると考えられている。アピオスがマメ科植物であることから、我々はイソフラボン類に注目し、検索したところ、主要なイソフラボンとして、ダイズにも含まれない Genistein-7-O-genitiobioside が見出された。したがって、イソフラボンを含むアピオスは有用な食材として利用できると思われる。そこで本研究では、茎部におけるイソフラボン類について塊茎部と比較し、その有用性について検討することとした。

【方法】収穫後のアピオスを塊茎部および茎部に分別した。また塊茎部は大きさによって分別した。それぞれを一定量採取し、80%メタノールにて抽出し、アルコール可溶性画分とアルコール不溶性画分とに分別した。アルコール可溶性画分は、イソフラボン類の分析のため HPLC に供し、アピオスの主要なイソフラボンである Genistein-7-O-genitiobioside の定量を行った。

【結果および考察】塊茎部および茎部のアルコール可溶性画分を HPLC に供し、イソフラボン類の組成について比較したところ、茎部においても塊茎部と同様にアピオス塊茎部の主要なイソフラボンである Genistein-7-O-genitiobioside が確認された。塊茎部のイソフラボン類においては、大きさによって Genistein-7-O-genitiobioside に差異が認められた。イソフラボンの摂取は、日常の食生活では、大豆およびその加工品以外からは難しいとされることから、新たなイソフラボンの摂取源として、大きさに関わらずアピオスを利用できることが認められた。また、食用部の利用の際に除去されている茎部にもイソフラボン類が含まれることから、有効に利用できることが明らかとなった。

Apios americana, groundnut, isoflavone

講演番号：4F26a14
講演日時、会場：3 月 29 日 11:43～ F 校舎 26 会場

苦味受容体 TAS2Rs を用いた太田ポンカン果皮に含まれる苦味成分の探索

Bitter taste receptor-activating compounds in peel of *Citrus tangerina* cv. Ohta

○黒田 侑希、池田 りこ、山崎 豊実、中村 俊之、宇田 一成、若林 敬二、渡辺 達夫（静岡県大院薬食）
○Yuki Kuroda, Riko Ikeda, Toyomi Yamazaki, Toshiyuki Nakamura, Kazunari Uda, Keiji Wakabayashi, Tatsuo Watanabe (Univ. Shizuoka)

【背景・目的】

太田ポンカンは静岡県清水区発祥の柑橘類である。柑橘類はフラボノイドやリモノイドなど、様々な機能性成分を含有している事が知られている。中でもフェノール性水酸基が全てメチル化されたポリメトキシフラボンノイド(PMF)は、柑橘果皮に多く含まれているフラボノイドであり、太田ポンカンの果皮にも PMF に属するノビレチンやタンゲレチンが含まれている。特に、認知症に予防効果があるとされているノビレチンは他の柑橘果皮に比べ太田ポンカン果皮に多く含まれている。この特徴を活かし、太田ポンカン果皮を食品加工する事への関心が高まっている。しかし、太田ポンカンの果皮は強い苦味を持つ事が食品を利用する上で難点となる。

そこで本研究は、太田ポンカン果皮の苦味の本体とそれらを認識する受容体を明らかにし、苦味受容体を用いて苦味の低減方法を開発することで、食品利用へと役立てる事を目的とした。

【方法】

ヒト苦味受容体(hTAS2Rs)25 種のうち 4 種の太田ポンカン果皮抽出液に対する苦味の評価を、培養細胞を用いたカルシウムイメージングにて行った。キメラ G タンパク質安定発現 Flp-In™ T-Rex™ 293T 細胞(Flp-In G 細胞)細胞に、苦味受容体の遺伝子を含むプラスミドを形質転換し、苦味受容体を一過的に発現させた。蛍光カルシウム指示薬(Fluo-8 AM)を細胞に取り込ませ、投与後の蛍光量から苦味受容体の活性化を評価した。

【結果】

太田ポンカン果皮抽出液は hTAS2R14,16 で強い応答を誘発した。また、hTAS2R38,39 についても活性がみられた。ついで太田ポンカン果皮の主要成分 3 種の苦味を評価したところ、タンゲレチンに対し hTAS2R14 で応答が認められたが、ヘスペリジンとノビレチンではごく弱い活性が見られただけであった。太田ポンカン果皮に含まれるタンゲレチン含量から、太田ポンカン果皮の苦味にタンゲレチンが寄与している事が示唆された。

TAS2Rs, citrus peel, bitter compounds

講演番号：4F26p01
講演日時、会場：3 月 29 日 14:00～ F 校舎 26 会場

ウメ‘露茜’果肉のフェノール性化合物の解析

Phenolic composition analyses of red flesh Japanese apricot 'Tsuyuakane'

○堀西 朝子[1]、雪本 亮[2]、谷 佳樹[1]、森 一[3]、岸田 邦博[2]、尾崎 嘉彦[2] ([1]近畿大・生物理工、[2]近畿大院・生物理工、[3]和歌山県工技セ)
○Asako HORINISHI[1], Ryo YUKIMOTO[2], Yoshiki TANI[1], Hajime MORI[3], Kunihiro KISHIDA[2], Yoshihiko OZAKI[2] ([1]BOST, Kinki Univ., [2]Grad. Sch. of BOST, Kinki Univ., [3]Ind.Tech.Ctr.of Wakayama Pref.)

【目的】
我々はこれまで、ウメ‘南高’果実由来のフェノール性化合物はカフェ酸、*p*-クマル酸、フェルラ酸等のヒドロキシ桂皮酸類とキナ酸、アセチル化ショ糖あるいは細胞壁由来の糖等が結合した誘導体が主であることを報告してきた。一方‘露茜’は、ウメ‘養青梅’とニホンスモモ‘笠原巴旦杏’の種間交雑種として 2009 年に品種登録されたウメで、果実の成熟に伴い果皮に加えて果肉にもアントシアニンを蓄積し鮮紅色に着色するという特徴があり、追熟するとさらにアントシアニン量が増加することが知られている。しかしアントシアニン以外のフェノール性化合物については、まだ詳細に検討されていなかった。本研究では‘露茜’のフェノール性化合物の特徴を解析し‘南高’と比較する。
【方法】
和歌山県果樹試験場うめ研究所にて採取したウメ果実‘露茜’と‘南高’を用いた。果実は未熟果と完熟果を用い、‘露茜’については追熟果も用いた。各果実の果肉凍結乾燥粉末から水または含水エタノールにより抽出液を調製し、①Folin-Ciocalteu 法による総ポリフェノールの定量、 ②HPLC 分析によるプロファイルの比較、 ③アルカリ加水分解処理による構成ヒドロキシ桂皮酸の定量、 ④LC-MS による網羅的解析を行った。
【結果】
‘露茜’の総ポリフェノール含量は、未熟果と完熟果では同程度であったが追熟することで増加が認められた。また、今回検討した全ての抽出条件において‘南高’より高かった。HPLC 分析により、‘露茜’のフェノール性化合物の大部分はネオクロロゲン酸であり、追熟処理によりアントシアニンだけでなくネオクロロゲン酸含量も増加していることを確認した。‘露茜’の構成フェノール酸は、‘南高’と同様にカフェ酸、*cis* および *trans*-*p*-クマル酸、フェルラ酸の 4 種のヒドロキシ桂皮酸であった。‘南高’では *p*-クマル酸が最も多いのに対し‘露茜’ではカフェ酸が最も多かった。これはネオクロロゲン酸の高含量を反映していると考えられる。‘露茜’抽出物の HPLC 分析（UV 280nm）ではネオクロロゲン酸以外の顕著なピークは見られなかったが、LC-MS による解析ではクロロゲン酸類に加えて、*p*-クマル酸アセチル化ショ糖エステルの特徴的なパターンが見られた。
‘露茜’のフェノール性化合物の特徴的な成分は、アントシアニンに加えてネオクロロゲン酸であり、*p*-クマル酸アセチル化ショ糖エステル類も存在することが明らかになった。

Japanese apricot, phenolics, neochlorogenic acid

講演番号：4F26p02
講演日時、会場：3 月 29 日 14:11～ F 校舎 26 会場

茶製品中のカテキン重合生成物に関する化学的研究（第一報）
characterization of polymeric polyphenols from tea products
○寺本 世生、稲田 葵、松尾 洋介、齋藤 義紀、田中 隆 (長崎大薬)
○Sena TERAMOTO, Aoi INADA, YOSUKE MATSUO, Yoshinori SAITO, Takashi TANAKA (Nagasaki Univ.)

【目的】発酵茶やほうじ茶は、カテキン類が重合して生成した高分子ポリフェノールを含む。製品によっては抽出されるポリフェノールの７０％以上を占めることもある成分で、リパーゼやアミラーゼなどに対する強い阻害作用を示す機能性食品成分でもある。それぞれの茶製品は製造工程が違うので構造は一様ではないと推測されるが、いずれのカテキン重合体も通常の HPLC 分析ではベースライン上の幅広い盛り上がりとして検出され、スペクトル解析も困難なため、化学的にはほとんど解明されていない。我々は、そのようなカテキン重合体の構造と生成機構について検討を行っている。
【方法と結果】緑茶、紅茶、烏龍茶（水仙、武夷岩茶)、ほうじ茶、プアール茶のポリフェノール画分から Sephadex LH-20 を用いたゲルろ過法で高分子ポリフェノールを分離し、^{13}C NMR スペクトルを測定した。いずれの高分子ポリフェノールもカテキン類似のシグナルを示し、カテキン重合体であることを確認した。緑茶の高分子ポリフェノールはプロアントシアニジンに特徴的なシグナルを示し、そのことはチオール分解でも確認された。ほうじ茶から得られたものはδ95-100 付近の A 環メチン炭素由来のシグナルが小さく、δ60-80 の糖の領域に幅広いシグナルが観察されたことから重合への糖の関与が示唆された。紅茶の高分子ポリフェノールはピロガロール型 B 環のシグナルが顕著に小さくなっていた。烏龍茶とプアール茶の由来の重合体のスペクトルでは A 環、B 環、C 環に帰属されるシグナルが観察されたが、紅茶ほど顕著ではないものの B 環のシグナルの減少が認められた。また、いずれのスペクトルからもガロイル基とカテコール型 B 環の重合への関与は小さいと推測された。そこで、エピガロカテキンについてさまざまな条件で重合を行い ^{13}C NMR スペクトルを比較した。塩化銅で処理すると dehydrotheasinensin C と重合体が生成し、重合体の ^{13}C NMR スペクトルでは紅茶と同様 B 環のシグナルが小さくなっていた。中性水溶液（pH 7.0）中での自動酸化で得られた重合体のスペクトルでは A 環、B 環、C 環のシグナルに加えてアセタール炭素と推測されるシグナルが観察された。過酸化水素で処理して得られた高分子成分のスペクトルでは、B 環、C 環のシグナルは残存していたが A 環のシグナルが小さくなり、カルボン酸に帰属されるシグナルが新たに出現した。
【考察】今回の結果から、ほうじ茶では A 環と共存する糖の熱分解生成物との反応が進行すると推定され、紅茶の高分子ポリフェノール生成には B 環の酸化が関与していると考えられる。烏龍茶とプアール茶については反応点の推定が出来なかった。現在、紅茶製造時における重合機構について検討を行っている。

tea, polyphenol, catechin

講演番号：4F26p03
講演日時、会場：3 月 29 日 14:22～ F 校舎 26 会場

NMR を用いた多変量解析による紅茶のプロファイリング
NMR-based black tea profiling with multivariate statistics
○細谷 孝博、吉田 周平、熊澤 茂則 (静岡県大・食栄)
○Takahiro Hosoya, Shuhei Yoshida, Shigenori Kumazawa (Univ. of Shizuoka)

【目的】核磁気共鳴（NMR : Nuclear Magnetic Resonance）は、分子の構造上の情報を得るために非常に有用な手法である。従来、単一化合物の分子構造解析に用いられてきたが、現在では、分子を構成する原子核そのものを定量的に観測できることから、定量分析への応用も検討されている。また、NMR では各成分中に検出対象の核が含まれていれば、多成分を同時に検出することができることから、NMR スペクトルを用いた多変量解析によるメタボロミクスに関する研究も進みつつある。

我々が毎日摂取している食品中には様々な成分が含まれており、食品の風味や機能性などは、それらの成分が相互的に関わることで多様に変化する。そのため、食品の特徴を見出すためには、食品中の含有成分を総合的に評価することが必要である。本学会では、紅茶に含まれる成分を対象に、NMR を用いた定量分析および多変量解析、また機能性評価を組み合わせた総合的評価を行った。

【方法・結果】紅茶の代表的な産地であるインドおよびスリランカの各地域から集めた 30 種類の紅茶葉を 94°C の湯で抽出した紅茶サンプルについて、^{1}H-NMR を測定し、得られたシグナルについて、それぞれの成分を帰属した。しかし、紅茶特有の成分であるテアフラビン（TF）に由来するシグナルが観測限界以下であったため、Sep-Pak C18 カラムを用いた固相抽出による TF 成分の分離・濃縮を行った。TF を含む画分を得たのち、CD_3OD に溶かし、内部標準として DSS を添加して ^{1}H-NMR を測定した。得られたスペクトルから、紅茶に含まれる 4 種類の TF（TF1、TF2A、TF2B および TF3）を定量し、試料間の差異を明らかにした。また多変量解析ソフト AMIX（ブルカー・バイオスピン株式会社）を用いて主成分分析を行ったところ紅茶の分類分けに成功した。今回の分類に寄与した成分を調べたところ、ローディングプロットより第 1 主成分（PC1）には総 TF 量が寄与していることが確認できた。さらに、各紅茶の TF 含有画分についてマウス前駆脂肪細胞（3T3-L1）を用いた分化抑制試験を行い、活性と TF 定量値および各主成分スコアの相関を調べた。前者では主にガレート型 TF が活性に寄与することが確認され、後者では PC1 スコアに正の相関が見られた。このことより、紅茶に含まれる TF 類が脂肪細胞分化抑制作用を示すことが分かり、脂肪細胞分化抑制作用を有する紅茶のスクリーニングに ^{1}H-NMR が利用できることが示された。

以上のことから、NMR を用いた定量分析やプロファイリングを食品分野への新たな分析法として適応できることが示された。今後、食品分野における品質評価や商品開発の一手段として利用されることが期待される。

black tea, multivariate statistics, NMR

講演番号：4F26p04
講演日時、会場：3 月 29 日 14:33～ F 校舎 26 会場

ビタミン類によるアマドリ化合物の分解作用

Degradation of Amadori compound by vitamins

○酒井 伸崇[1]、臼井 照幸[1,2]、渡辺 寛人[1]、早瀬 文孝[1] ([1]明治大農、[2]女子栄養大栄養)
○Nobutaka SAKAI[1], Teruyuki USUI[1,2], Hirohito WATANABE[1], Fumitaka HAYASE[1] ([1]Meiji Univ., [2]Kagawa Nutrition Univ.)

【目的】メイラード反応は、還元糖などのカルボニル化合物とアミノ酸などのアミノ化合物間における非酵素的褐変反応である。生体膜リン脂質の一つである phosphatidylethanolamine（PE）は分子内にアミノ基を有しており、近年、この PE にもメイラード反応が起きることが明らかになった。その結果、生成するアマドリ化合物は Amadori-PE と呼ばれ、糖尿病患者中で有意に蓄積の増加が認められている。Amadori-PE が生体内に蓄積すると、脂質過酸化、糖尿病性網膜症などの病態に関与することが示唆されている。したがって、Amadori-PE を分解する作用を有する化合物の発見が強く望まれていた。当研究室において、α-tocopherol（α-Toc） が Amadori-PE を減少させることを見出した。本研究では Amadori-PE に対するα-Toc の作用について解析し、Amadori-PE の減少とそれに伴う生成物の同定・定量を行った。また、α-Toc の異性体であるδ-tocopherol （δ-Toc）、および、α-Toc と同じく脂溶性ビタミンに分類されるビタミン K についても同様に実験を行いその作用について解析した。

【方法】(1) Amadori-PE にα-Toc を添加し、メタノール溶液中、37℃で 3 日間インキュベートした。反応溶液を LC-ESI-Q-TOF-MS 分析に供し、Amadori-PE およびその生成物の同定・定量を行った。(2) 同様の方法により、δ-Toc およびビタミン K の Amadori-PE に対する作用を解析した。

【結果】α-Toc の添加によって、濃度依存的に Amadori-PE は有意に減少した。また、それに伴って PE、およびグルコソンが生成することが明らかとなった。また、α-Toc の異性体であるδ-Toc についても同様に実験を行ったところ、δ-Toc も Amadori-PE の分解活性を有することが明らかとなり、その活性はδ-Toc > α-Toc となった。さらに、脂溶性ビタミンの一つであるビタミン K についても同様に実験を行ったところ、ビタミン K に関しても Amadori-PE の分解活性を有することが明らかとなり、その活性はビタミン K > α-Toc のようになった。本実験により、α-Toc は Amadori-PE を分解し、それに伴って PE およびグルコソンを生成させること、また、Amadori-PE の分解活性を有する新たな化合物として、δ-Toc とビタミン K の存在を明らかにした。以上の結果は、α-Toc をはじめとするビタミン類がアマドリ化合物を分解することによってメイラード反応を抑制し、関連疾患の予防に寄与しうること、また生体におけるビタミン類の重要性を示唆するものである。

Maillard reaction, Amadori compound, vitamin

講演番号：4F26p05
講演日時、会場：3 月 29 日 14:44～ F 校舎 26 会場

寒締めホウレンソウの良食味に関する呈味性と成分研究

Study about taste and component in spinach grown under low temperature

○山田 伽奈子[1]、大澤 真理[1]、富永 直樹[2]、六角 啓一[2]、森光 康次郎[1]([1]お茶大院・食物、[2]タキイ種苗・研究農場)
○KANAKO YAMADA[1], MARI OSAWA[1], NAOKI TOMINAGA[2], KEIICHI MISUMI[2], YASUJIRO MORIMITSU[1] ([1]Graduate School of Humatities and Sciences Faculty of Life Science, Department of Nutrition and Food Science, [2]Takii & Co., Ltd Research Farm Physiology and Chemichal Research group)

【目的】日本では伝統的に「寒締め」によって、甘く栄養価の高い冬野菜が作られ、特に冬期のホウレンソウやニンジンの食味は消費者に好まれている。寒締めにより糖度が増し、えぐ味や苦味が軽減することはすでに報告されている。本研究では、良食味を呈するホウレンソウ品種について、寒締めに伴う呈味性の収穫期変動や呈味に影響を及ぼす成分研究を行った。
【方法】11 月～2 月に収穫された従来品種と良食味品種 2 種、6 月に栽培された市販品を用いて、官能評価と成分分析を行った。ホウレンソウ（生食）の官能評価を行い、好まれる味と品種について検討を行った。次に、良食味として好まれたホウレンソウの成分分析を行い、関与成分を推察した。また、甘味となる糖分析、えぐ味となるシュウ酸、硝酸を HPLC 定量した。その他の良食味関与成分は LCMS 定量を行った。官能評価は、各呈味成分の水溶液を調製し、閾値検査を行った。さらに、各呈味成分間の相互作用についても検討を行った。
【結果】官能評価結果から良食味品種がより甘く、より好まれた。この傾向は 11 月、12 月収穫期のホウレンソウで強く、厳冬期である 1 月、2 月での差は小さくなる傾向にあった。総糖含有量について、品種別では良食味品種が多く、収穫期別では 1 月が多い結果となったが、寒締めホウレンソウ間での良食味に与える影響は小さいと考えられた。シュウ酸と硝酸含有量について、品種・収穫期ごとに明確な差は認められなかった。これらの結果から、寒締めホウレンソウにおいて良食味を呈する品種には、別の呈味関連成分が関与すると考えた。成分分析の結果、グリシンベタイン含有量が影響している可能性が示唆された。現在までの LCMS 定量結果では、品種間での明確な含有量差は認められていない。ただし、6 月よりも 12 月と 1 月収穫期の含有量良食味品種で高く、この時期のホウレンソウ中のグリシンベタイン含有量が検知閾値以上であることがわかった。グリシンベタイン溶液から直接感じられる甘味などの呈味性閾値が高いことから、同時に存在する糖類の甘味、もしくはアミノ酸のうま味をエンハンスしている可能性について研究を進めている。寒締めで良食味を呈するホウレンソウとは、甘味度と同時にグリシンベタイン含量が高い品種ではないかと推察している。

spinach, winter vegetable, betaine

講演番号：4F26p06
講演日時、会場：3 月 29 日 15:05～ F 校舎 26 会場

新潟県産エノキタケ「雪ぼうし３号」の加熱調理による旨味成分の増加要因の解明
Elucidation of the factors for increase in 5'-guanylic acid by heating of "Yukiboushi No. 3", a strain of *Flammulina velutipes* from Niigata

○宮本 晶子[1]、池田 裕一[2]、御所窪 誠[3]、古澤 睦月[3]、五百崎 淳[1]、原 崇[1]、城 斗志夫[1]([1]新潟大学農、[2]新潟県森林研究所、[3]新潟大院自然科学)
○Akiko MIYAMOTO[1], Yuichi IKEDA[2], Makoto GOSHOKUBO[3], Mutsuki FURUSAWA[3], Jun IOZAKI[1], Takashi HARA[1], Toshio JOH[1] ([1]Niigata Univ., [2]Niigata Prefectural Forest Research Institute, [3]Grad. Sch. Sci. Technol., Niigata Univ.)

【目的】新潟県で開発されたエノキタケの新品種「雪ぼうし 3 号」は、傘や柄が大きく、日持ちや収量性が良いという特徴を持っている。一般に広く流通している市販品種と雪ぼうし 3 号を加熱調理し、官能検査を行ったところ、雪ぼうしの方が旨味や甘味において評価が高く、また各種呈味成分の分析では、キノコの代表的な旨味成分である 5’-グアニル酸（GMP）が加熱調理過程において大きく増加し、その増加量が市販品種より雪ぼうしで大きいことが明らかになった。そこで本研究では、市販品種より雪ぼうしにおいて GMP が加熱でより多く増加する要因の解明を試みた。
【方法及び結果】雪ぼうし３号と市販品種は新潟県内のエノキタケ生産者が同一条件で栽培したものを用いた。最初に、生のエノキタケを凍結乾燥後、過塩素酸で GMP を抽出し、HPLC で定量した。GMP 含量は雪ぼうしで 24.2 mg/100 mg d.w.、市販品種で 21.3 mg/100 mg d.w.で有意な差はなかった。そこで、水を加えて加熱調理し、GMP を測定したところ、雪ぼうしで 128.2 mg/100 mg d.w.、市販品種で 70.8 mg/100 mg d.w.と加熱前よりそれぞれ 5.3 倍、3.3 倍増加し、雪ぼうしの増加率の方が大きかった。この加熱による GMP の大きな増加が、官能評価における雪ぼうしの優れた旨味の理由であることが示唆された。加熱による雪ぼうしの GMP 増加率が大きい要因を明らかにするため、子実体から粗酵素液を調製し、GMP の生成と分解に関わるリボヌクレアーゼ（RNase）とホスホモノエステラーゼ（PMase）の活性、最適温度、耐熱性を調べた。その結果、雪ぼうしと市販品種の間で活性に大きな差はなく、両品種における RNase と PMase の最適温度は全て 40℃で同じであった。また、RNase は 60℃、PMase は 70℃で完全に失活する点も両品種で同じであった。次に、GMP 生成の基質となる RNA 含量を雪ぼうしと市販品種の傘および柄で測定した結果、雪ぼうしの RNA 含量は市販品種より傘で 1.4 倍、柄で 1.3 倍多く、RNA 含量の多さが GMP 増加量の違いの一因と推測された。雪ぼうしは市販品種より傘や柄が大きいことから、加熱時の内部温度の上昇が遅く、熱により RNase が失活するまでの時間が長いため、GMP の増加率が大きいのではないかと考えた。そこで、両品種を様々な温度で 20 分間加熱し、GMP の増加におよぼす温度の影響を調べた。その結果、両品種ともに RNase が失活すべき温度である 60℃で GMP の増加が最大となった。この結果から加熱温度と子実体の内部温度に差があると推測されたため、60℃で加熱した時の傘の内部温度を大きさが異なる雪ぼうしで測定した。その結果、傘が大きいものほど内部温度の上昇が遅く、60℃に達する迄の時間が長かった。したがって、大きい子実体ほど RNase が失活する迄の時間が長く、GMP の増加量が多いことが示唆された。

Flammulina velutipes, 5'-guanylic acid, ribonuclease

講演番号：4F26p07
講演日時、会場：3 月 29 日 15:16～ F 校舎 26 会場

茹でエダマメのメタボローム解析
Metabolomic analysis of boiled edamame
○清水 康貴[1]、佐々木 亮介[2]、及川 彰[1,2] ([1]山形大農、[2]理研 CSRS)
○YASUTAKA SHIMIZU[1], RYOUSUKE SASAKI[2], AKIRA OIKWA[1,2] ([1]Yamagata Univ., [2]Riken CSRS)

【目的】　エダマメとは、マメ科(*Leguminosae*)マメ亜科(*Fraboidesae*)ダイズ属(*Glycine*)のダイズ(*Glycine max* (*L.*)*Merr*)の未熟種子のことをいい、日本では古くから食材として利用されている。また、エダマメは GABA などの機能性成分を含むことが知られており、健康食品としても人気が高まってきている。山形県鶴岡市の特産物であるダダチャマメは、商業品種のエダマメと比較して高い糖含量や独特な香りを持つブランドエダマメとして知られている。エダマメは基本的に茹でて食するものであり、茹でによりエダマメの青臭さや収斂味は抑えられ、香りや甘みが上昇する。味や風味の変化の一部は、遊離アミノ酸や糖の成分変化に起因することが明らかになっている。また、茹で時間は品種間で差異はあるものの、塩を入れて 3 分間茹でるものとされていることが多い。しかし、香りに関する成分など茹でにより変化する他の成分や、茹で条件による成分変化については十分に調べられていない。そこで、本研究では、メタボローム解析を用いて茹でによるエダマメ成分の変化を明らかにすることを目的とした。
【方法】　供試材料として生豆の状態で冷凍したダダチャマメ品種“白山”を用いた。茹でによる成分変化を調べるために、1、2、3、5 分間茹でたものと茹でる前の冷凍生豆をサンプルとした。サンプルは凍結乾燥後破砕し、適宜前処理を行った後メタボローム解析に供した。イオン性化合物はキャピラリー電気泳動質量分析装置を、中性糖は液体クロマトグラフィーを用いて含量を調べた。
【結果・展望】　メタボローム解析の結果、茹でによってエダマメ内の成分の変化を網羅的に明らかにすることができた。その中には、raffinose のように茹で時間に応じて急激に増加するものや、5-oxo Pro のように緩やかに増加するものなど茹で時間によって変化量に違いが認められた。また、最適な茹で時間とされる 2~3 分の間に最大量となる guanine や Phe などの成分も認められた。現在、より詳細な茹で条件の検討を行っており、茹でがどのようにエダマメの風味や機能性に影響を与えるのかを明らかにしていくつもりである。

edamame, metabolomics, CE-MS

講演番号：4F26p08
講演日時、会場：3 月 29 日 15:27～ F 校舎 26 会場

新精米法による新たな機能性米の創出とその機能成分の可視化

Creation of functional rice by new rice polishing method and visualization of the functional food factors in the functional rice

○財満 信宏[1]、郡 俊之[1]、森山 達哉[1]、川西 孝彦[2]、寺下 隆夫[3]、白坂 憲章[1] ([1]近畿大学農、[2]幸南食糧株式会社、[3]日本米飯管理士協会)
○Nobuhiro ZAIMA[1], TOSHIYUKI KOHRI[1], TATSUYA MORIYAMA[1], TAKAHIKO KAWANISHI[2], TAKAO TERASHITA[3], NORIFUMI SHIRASAKA[1] ([1]Kinki Univ, [2]Kohnan shokuryo co, [3]The Society for the Rice Science and Cooked Rice Managers License of Japan)

【目的】日本人の主食である米には、血中コレステロール低下作用、頸動脈狭窄の抑制作用、抗血小板凝集作用などを有することが報告されているトコトリエノールや、コレステロール吸収抑制作用や不定愁訴緩和作用などを有するγオリザノールなどをはじめとする機能性成分が含まれている。これらの機能性成分は、白米にはほとんど含有されておらず、玄米食や胚芽米食によって摂取することが可能である。しかし玄米や胚芽米は、独特の食味によって敬遠される例も少なくない。本研究は、精米方法を検討することによって、食味は白米と同程度でありながらも機能性成分が保持されるような新たな機能性米を創出することおよび、その機能性米に含まれる機能成分をイメージングマススペクトロメトリー（IMS）で可視化して評価することを目的とした。
【方法】使用した米（コシヒカリ）は幸南食糧株式会社から入手した。精米された米の胚芽残存は 5 段階に分類した。5 段階の分類は目視で行い、各基準は、 1 胚芽が 50%以上残存、2 表層部を削り取られた胚芽が残存、3 基底部の胚盤が完全に残存、4 基底部の胚盤が一部残存、5 基底部の胚盤が全く残存しない、とした。液体窒素で凍結した米からクライオスタット（Leica Microsystems）で 10μm の切片を作成し、トルイジンブルー染色した後に、米切片中の胚芽面積を評価した。機能成分の可視化は MALDI-IMS によって行った。切片にマトリックスとして DHB（2,5-Dihydroxybenzonic acid）溶液を塗布し、質量分析装置（MALDI LTQ-XL (ThermoFisher Scientific)）に供し、機能性成分を測定した。機能性成分の分布の可視化には Image Quest(ThermoFisher Scientific)を用いた。
【結果】従来の精米方法で行った米の胚芽残存 5 段階評価では分類 3 が最も多かったのに対し、新精米法では、分類 2 が最も多かった。新精米法で精米した米切片中の胚芽面積は従来の精米法と比較して有意に増加した。IMS 解析によって、αトコフェロール、αトコトリエノールは新精米法で精米された米の胚芽に存在していることが可視化された。さらにこれら両機能性成分のαトコフェロールとαトコトリエノールは、炊飯後の状態でも胚芽に存在していることが IMS 解析で可視化された。実際に食される状態における米中の機能性成分の分布を明らかにしたのは本研究が初めてである。官能検査によって、従来の精米法と新精米法で精米された米の食味は同等であることが示された。
　以上の結果から、本研究によって確立した新たな精米法によって、白米と同等の食味でありながらも機能性成分を多く含む米を提供することが可能であると示された。

rice, functional food, imaging mass spectrometry

講演番号：4F26p09
講演日時、会場：3 月 29 日 15:38～ F 校舎 26 会場

泡盛油が泡盛酒質に及ぼす影響

Influence to the quality of the awamori by the addition of awamori oil.

○新垣 壱馬[1]、宮澤 舞[2]、玉城 康智[1] ([1]沖縄高専、[2]三洋化成工業株式会社)
○Kazuma ARAKAKI[1], Mai MIYAZAWA[2], Yasutomo TAMAKI[1] ([1]Okinawa National College of Technology, [2]Sanyo Chemical Industries, Ltd.)

【背景・目的】

沖縄の伝統蒸留酒である泡盛を熟成する過程で上部に析出する油成分（フーゼル油）をここでは泡盛油と呼ぶ。泡盛油は古酒独特の味や香りを付与することが経験的に知られているが、油臭の原因となるため通常は取り除かれている。しかし、泡盛油が泡盛の味や香りにどの程度影響を及ぼすかについての詳細は明らかにされていない。本研究は、泡盛油をモデル泡盛（43%エタノール）に添加し、添加量の違いがモデル泡盛に及ぼす影響を検討した。

【実験方法】

モデル泡盛 50ml に泡盛油を 1、10、100、1000μl 添加し、暗所で 3 年間熟成させ、その後酒質を分析した。分析項目として、低沸点香気成分、TBA 価、総酸度、pH を測定した。さらに、添加した泡盛油は、採取後 1 年、5 年、9 年間保存したものを実験に使用し、それぞれがモデル泡盛の酒質に及ぼす影響を検討した。

【結果】

泡盛油の添加量が増加するほど、低沸点香気成分が増加し、特に酢酸エチルの増加が顕著であった。TBA 価は、泡盛油を 100μl 添加したサンプルが最も高い値を示し、添加量毎で比較すると、9 年間保存の泡盛油が最も低い値であった。また、泡盛油の添加量が多いほど、総酸度は高くなり、pH は低くなるという傾向が見られた。

Awamori, Fusel oil

講演番号：4F26p10
講演日時、会場：3 月 29 日 15:49～ F 校舎 26 会場

タイの伝統的発酵米麺カノムチンの物性における発酵工程の影響

Effect of fermentation step on Thai traditional fermented noodle, Kanomjeen

○吉橋 忠[1]、サトマリー プラジョンウェート[2]、スロジャナメタクン ビパ[2] ([1]国際農研、[2]カセサート大食品研)
○Tadashi YOSHIHASHI[1], Prajongwate Satmalee[2], Vipa Surojanametakul[2] ([1]JIRCAS, [2]IFRPD, KU)

タイの伝統的発酵米麺であるカノムチンは、インディカ品種の砕米を原料とし、水浸漬後に好気的発酵、水挽、嫌気的発酵（発酵終了まで通常 7 日）を経て、予備糊化後に押出式製麺によって調製される米麺である。東南アジア、特にインドシナ半島周辺には、同様の発酵米麺が各地に存在しており、製法が類似している。これらの発酵米麺は、発酵を経ない米麺に比べ、独特の風味と食感を持つことが特徴であり、それぞれの国において国民食となっているものも多い。
通常、発酵を経た米麺のみが食品として消費されているが、タイでは、発酵経ずに同様の製麺をしたカノムチン・ソッド（生カノムチン）という麺も生産されており、発酵に伴う独特な風味が失われる他、食感も大きく変わることが指摘されている。
発酵による食感の変化を明らかにするため、実験室で小規模にカノムチンを製麺する手法を確立すると共に、発酵を経たカノムチンと、発酵していないカノムチン・ソッドを同じ米原料から調製し、テクスチャ、特に麺体の引っ張り強度と伸びを測定した。発酵したカノムチンでは、それぞれの項目が発酵していないカノムチン・ソッドに比べ向上していた。また、発酵による成分変化を測定したところ、糊化温度など、澱粉の特性には大きな変化は見られなかったが、タンパク質含量には大きな変化がありほぼ半分に減少していた。このため、発酵中の米タンパク質を SDS-PAGE により分析したところ、プロテインボディ-II が選択的に分解されており、プロテインボディ-I は、ほぼ分解を受けていなかった。また、製造初期の好気的発酵において、タンパク質の分解が進んでいた。分解を受け、低分子化したタンパク質は、水洗の行程により溶脱されると考えられる。
これらの調製した米麺について、凍結切片（10μm、2.5%グルタルアルデヒドにより後固定）を調製し、タンパク質の局在を CBB 及びニンヒドリンーシッフ染色後に、光学顕微鏡で観察した。発酵を経たカノムチンでは、麺体中に均一にプロテインボディ-I と考えられるタンパク質顆粒が分布しており、澱粉ゲル及びタンパク質顆粒の均一な構造により、強い引っ張り強度や、伸び率を示していることが示唆された。一方、発酵していないカノムチン・ソッドでは、カノムチンで見られた均一に存在するプロテインボディ-I の他に、プロテインボディ-II に由来すると考えられる不完全なタンパク質のネットワーク構造が観察され、澱粉ゲル中に不均一な構造が形成されていた。このため、引っ張り強度・伸びといった物理性が弱くなっていることが推察された。

fermented rice noodle, texture, protein body

講演番号：4F37a02
講演日時、会場：3 月 29 日 09:11～ F 校舎 37 会場

「新規酸性乳飲料」は乳たんぱく質の吸収が速い

"Newly designed acid milk" is a novel fast protein source.

○東 誠一郎、北出 晶美、高杉 諭、圷 美穂、野間 晃幸、山地 健人、伊藤 裕之（（株）明治　研究本部　食機能科学研）
○ SEIICHIRO HIGASHI, MASAMI KITADE, SATOSHI TAKASUGI, MIHO AKUTSU, TERUYUKI NOMA, TAKETO YAMAJI, HIROYUKI ITO (Food Science Research Lab., Meiji Co., Ltd.)

【背景】牛乳は良質なたんぱく質源であるが、乳たんぱく質の約 80%を占めるカゼインの特性によって酸性域で凝集する性質を有している。我々は、酸性域での乳たんぱく質の凝集を制御し、安定化させる製法を見出し、新規酸性乳飲料（以下“酸性乳”）を開発した。この新規酸性乳は、牛乳と同等のたんぱく質を含みながらも、酸性域での流動性が保たれており、その物性の違いから通常の牛乳とは異なる機能性を有する可能性が考えられる。
【目的】酸性乳が生理学的応答に与える影響を検討する上で、たんぱく質の吸収性に着目した。本研究では、酸性乳中のたんぱく質の吸収性を、脱脂乳を比較対照として評価した。
【方法】8 週齢の SD 系雄性ラットに門脈カテーテルを留置した。カテーテル留置から 1 日後に 16 時間の絶食を行い、体重の平均値が均一になるように酸性乳群、脱脂乳群の 2 群に群わけを行った。各群に試験溶液 10 mL/kg BW（たんぱく質として 0.34 g/ kg BW）を単回経口投与した。単回経口投与前、投与 15, 30, 60, 120 分後にカテーテルより採血し、血漿を得た。血漿中のアミノ酸濃度を測定し、たんぱく質の吸収性を評価した。
【結果】酸性乳群は、投与 30 分後において、脱脂乳群と比較して門脈血中の総アミノ酸濃度が有意に高値を示した。
【結論】「新規酸性乳飲料」は脱脂乳と比較して、たんぱく質の吸収が速いことを見出した。酸性域で乳たんぱく質を安定化させる処方を用いることで、従来吸収が遅いとされているカゼインの吸収を早期に誘導することが可能となった。

milk, casein, absorption

講演番号：4F37a03
講演日時、会場：3 月 29 日 09:22～ F 校舎 37 会場

「新規酸性乳飲料」は運動後の骨格筋合成を速やかに促進する
"Newly designed acid milk" ingestion rapidly promotes muscle protein synthesis following exercise compared with skim milk
○中山 恭佑、神田 淳、三本木 千秋、池上 秀二、伊藤 裕之（（株）明治　研究本部　食機能科学研）
○ KYOSUKE NAKAYAMA, ATSUSHI KANDA, CHIAKI SANBONGI, SHUJI IKEGAMI, HIROYUKI ITOH (Food Science Research Lab., Meiji Co., Ltd.)

【背景】牛乳は良質なたんぱく質源である。今回我々が開発した新規酸性乳飲料（以下“酸性乳”）は、乳たんぱく質を通常の牛乳と同程度含み、牛乳よりも速いたんぱく質吸収性を有する。たんぱく質吸収性の違いは、骨格筋代謝応答にも変化をもたらす可能性が考えられる。
【目的】酸性乳の摂取が運動後の骨格筋合成に与える影響を、脱脂乳を比較対照として評価した。
【方法】2 時間の水泳運動に供した SD 系雄性ラット（6 週齢）に、運動直後に酸性乳または脱脂乳をたんぱく質として 0.85 g/kg BW となるよう単回経口投与した。運動直後、または経口投与 30, 60, 90, 120 分後における骨格筋合成速度を測定した。骨格筋合成速度は、各タイムポイントにおいてラットから摘出した上肢三頭筋を用いて、筋摘出 15 分前に尾静脈より投与した安定同位体ラベルフェニルアラニンをトレーサーとして算出した。
【結果】酸性乳群は、投与 30 分後において、脱脂乳群と比較して有意に高い骨格筋合成速度を示した。投与 60 分, 90 分, 120 分後においては、酸性乳群は脱脂乳群と比較して骨格筋合成速度が高値傾向を示した。
【結論】「新規酸性乳飲料」の摂取は、脱脂乳と比較して運動後の骨格筋合成を速やかに促進させることを見出した。この促進効果には、酸性乳の速いたんぱく質吸収性が関与していると考察する。運動後にたんぱく質を摂取し速やかに骨格筋合成を促進させることは、運動実施者の効率的なカラダ作りのために重要な栄養戦略であり、これに対して、「新規酸性乳飲料」が通常の牛乳と比較してさらに効果的であることが示唆された。

Newly designed acid milk, muscle protein synthesis, exercise

講演番号：4F37a04
講演日時、会場：3 月 29 日 09:33～ F 校舎 37 会場

乳たんぱく質強化乳飲料の継続摂取が男子大学生長距離ランナーのコンディションならびに運動パフォーマンスに及ぼす影響

Effects of continuous intake of milk protein enriched drink on physical condition and physical performance in male college distance runners.

○小田 宗宏[1]、大西 一政[2]、柳楽 明佳[2]、山田 成臣[2]、長田 昌士[2]、山地 健人[2]、伊藤 裕之[2]、鈴木 公一[1]、川島 一明[1] ([1]日大・生物資源、[2]（株）明治・食機能科学研)
○Munehiro ODA[1], Kazumasa OHNISHI[2], Akika NAGIRA[2], Naruomi YAMADA[2], Masashi NAGATA[2], Taketo YAMAJI[2], Hiroyuki ITOH[2], Kouichi SUZUKI[1], Kazuaki KAWASHIMA[1] ([1]Nihon Univ., [2]Meiji co., Ltd.)

【背景】日々の高強度トレーニングを行うアスリートは、筋損傷、疲労蓄積、脱水が日常的に生じており、これらの抑制は運動パフォーマンス向上に重要である。一方、乳たんぱく質には筋損傷抑制、疲労軽減、体水分保持機能がこれまでに報告されていることより、乳たんぱく質摂取はアスリートの運動パフォーマンス向上に有用と考えられる。
【目的】乳たんぱく質を普通牛乳より多く配合した乳たんぱく質強化乳飲料の継続的な摂取が、高強度トレーニングを続けるアスリートのコンディションや運動パフォーマンスに及ぼす影響を評価する。
【方法】男子大学生長距離ランナー19 名に、乳たんぱく質強化乳飲料を 16 週間毎日摂取(200mL×2本/日)させた。摂取前、摂取後 4、8 週目に採血を行い、筋損傷指標、浸透圧などを測定した。また、摂取前、4 週目に Visual Analogue Scale（VAS）法を用いて口渇感や疲労に関する主観的状態の評価を行った。16 週目に 10,000m 走を実施し、過去の個人記録と比較した。
【結果】筋損傷指標であるクレアチンキナーゼ、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼは乳たんぱく質強化乳飲料の摂取により、4、8 週目に摂取前と比較し有意に低値となった。乳酸脱水素酵素は 8 週目に摂取前と比較し有意に低値となった。また、血清浸透圧は乳たんぱく質強化乳飲料の摂取により、4、8 週目で摂取前と比較し有意に低値となった。VAS 法による評価の結果、運動後の口渇感が軽減され、運動翌朝の体調、疲労感が改善された。16 週目に行った 10,000m 走においては、参加した 13 名中 12 名が自己記録を更新した。
【結論】高強度のトレーニングを行っている男子大学生長距離ランナーが乳たんぱく質強化乳飲料を継続摂取することで、トレーニングによる筋損傷が抑制されること、体水分保持機能が向上すること、疲労感が軽減されることが示唆された。乳たんぱく質強化乳飲料の継続摂取は、長距離ランナーのコンディションを改善し運動パフォーマンスを向上させることが示唆された。

milk protein, college long distance runners, physical performance

講演番号：4F37a05
講演日時、会場：3 月 29 日 09:44～ F 校舎 37 会場

乳たんぱく質強化乳飲料摂取によるスポーツ愛好家の HR-QOL 改善効果

Effects of milk protein enriched drink intake on health-related quality of life in amateur sports players

○大西 一政[1]、柳樂 明佳[1]、山田 成臣[1]、長田 昌士[1]、山地 健人[1]、伊藤 裕之[1]、川島 一明[2]、鈴木 公一[2]、小田 宗宏[2]([1]（株）明治・食機能科学研、[2]日大・生物資源)
○ KAZUMASA ONISHI[1], AKIKA NAGIRA[1], NARUOMI YAMADA[1], MASASHI NAGATA[1], TAKETO YAMAJI[1], HIROYUKI ITO[1], KAZUAKI KAWASHIMA[2], KOICHI SUZUKI[2], MUNEHIRO ODA[2] ([1]Meiji co., Ltd., [2]Nihon Univ.)

【背景】近年、健康志向の高まりにより運動実施率は高まっているが、運動に伴う筋肉痛、疲労蓄積あるいは脱水は、健康増進や余暇充実を目的として運動を行うスポーツ愛好家の健康関連 QOL（Health Related-QOL：HR-QOL）を低下させる。一方、乳たんぱく質には筋損傷抑制、疲労軽減、体水分保持効果がこれまでに報告されていることより、運動によるスポーツ愛好家の HR-QOL 低下を乳たんぱく質摂取により抑制できる可能性が考えられる。
【目的】乳たんぱく質を普通牛乳より多く配合した乳たんぱく質強化乳飲料の単回あるいは継続的な摂取が、スポーツ愛好家のコンディションに及ぼす影響を評価する。
【方法】藤沢市体育協会に所属する各種スポーツ団体のおよそ 1000 名に協力していただき、以下２つの研究を実施した。①【単回摂取試験】競技当日の競技前後に乳たんぱく質強化乳飲料(200mL)を各１本摂取してもらい、運動前後および翌朝の状態を Visual Analogue Scale（VAS）法により評価した。②【4 週間継続摂取試験】乳たんぱく質強化乳飲料を 4 週間毎日摂取(200mL×2 本/日)してもらい、継続摂取前、摂取 2 週目、摂取 4 週目の運動前後および翌朝の状態を VAS 法により評価した。
【結果】①乳たんぱく質強化乳飲料を競技前後に単回摂取することで、競技前に比べて翌朝の疲労感、体調、口渇感が有意に改善した。②乳たんぱく質強化乳飲料の継続摂取により、4 週目に疲労感、体調、口渇感が有意に改善した。また、この改善効果は単回摂取時よりも継続摂取した時の方が顕著であった。
【結論】乳たんぱく質強化乳飲料の摂取は、スポーツ愛好家のコンディションを単回摂取、継続摂取のいずれにおいても改善し、HR-QOL を向上させた。また、継続摂取時にその効果がより強くなることが明らかになった。

milk protein, health related quality of life, amature sports player

講演番号：4F37a06
講演日時、会場：3 月 29 日 10:05～ F 校舎 37 会場

スケトウダラタンパク質の骨格筋重量増加効果－性差、飼料条件および飼育条件の影響－
Alaska Pollack Protein increases skeletal muscle weight in rats-effect of gender, and dietary and feeding cndition-

○岸田 太郎[1]、原 由真[1]、澤井 真梨子[1]、速水 耕介[2]、横井 香里[2]、川端 二功[2]、辻 智子[2]、魚住 圭佑[1]、安井 万智[1]、水重 貴文[1]([1]愛媛大農、[2]日本水産（株）生活機能研)
○Taro Kishida[1], Yuma Hara[1], Mariko Sawai[1], Kohsuke Hayamizu[2], Kaori Yokoi[2], Fuminori Kawabata[2], Tomoko Tsuji[2], Keisuke Uozumi[1], Machi Yasui[1], Takafumi Mizushige[1] ([1]Ehime Univ, [2]Nippon Suisan Kaisya, Ltd.)

【背景・目的】魚食の有用性は古くから着目されており、魚の摂取は肥満を原因とする心疾患を予防することが多く報告されている。作用物質として魚油が注目される一方、魚肉タンパク質は多量に摂取されている重要なタンパク質源であるにもかかわらず、疾病予防効果等に関する知見は少ない。そこで我々は蒲鉾や魚肉ソーセージ等広く利用されているスケトウダラの魚肉タンパク質（APP）に着目し、その機能性について検討している。脂質代謝への影響を検討する中で、APP を含む食餌性肥満食をラットに与え、運動負荷をかけずに 8 週間摂取させたところ、カゼイン摂取と比較して骨格筋重量が有意に増加することを見出した。そこで本研究ではこの効果が発現する飼料条件、性差および飼育条件を探った。
【方法】実験 1:5 週齢の SD 系雄ラットに AIN-93G 組成に基づく通常食で予備飼育後、通常食(LF-Cas)、通常食のタンパク質源のすべてをケルダール窒素が等価となるように APP と置き換えた飼料(LF-APP)、通常食の油脂含量をラードで強化しスクロース含量も増量した食餌性肥満食（DIO-Cas)、DIO-Cas のタンパク質源を通常食の場合と同様に APP と置き換えた飼料（DIO-APP）を与え、2 日または 7 日間飼育した。
実験 2：5 週齢の SD 系雌ラットに卵巣摘出術を施し回復後、LF-Cas 食または LF-APP 食を与え、2 日または 7 日間飼育した。同様の実験を無手術のラットを用いて同時に行った。
実験 3：5 週齢の SD 系雄ラットを馴化後、ラットの右後肢にギプス固定を行い、DIO-Cas を与え 2 週間飼育した。その後ギプスを外して群分けし、DIO-Cas または DIO-APP 食を与え 3 週間飼育した。
【結果・考察】
今回行ったすべての条件において、APP は骨格筋重量を有意に増加させた（実験 1～3)。APP は性差に関わりなく、また広範な飼料および飼育条件で骨格筋重量を増加させることがわかった。骨格筋組織切片の観察により、APP は筋肉径を太くしていることが示唆された（実験 1)。運動を負荷・制限しない条件では、タンパク質分解に関わる Atrogin-1 および MURF-1 の骨格筋遺伝子発現が有意に低下し、筋肥大抑制に関わる Myostatin の遺伝子発現も低下し、APP がタンパク質の合成・分解に働きかけている可能性が示唆された(実験 1)。一方運動を制限した条件ではそのような変化は見られなかったが、筋肉増加のシグナルの 1 つである IGF-1 およびその下流の Myogenin の骨格筋遺伝子発現が増加し、筋細胞の分化に働きかけている可能性が示唆された（実験 3)。

Fish protein, Scheltal mascle, rat

講演番号：4F37a07
講演日時、会場：3 月 29 日 10:16～ F 校舎 37 会場

酒粕の体を温める効果

Effects of sake lees intake on skin surface temperature and blood flow

○村上 直之、入江 元子、大浦 新、堤 浩子、秦 洋二 (月桂冠総研)
○Naoyuki MURAKAMI, Motoko IRIE, Shin OURA, Hiroko TSUTSUMI, Yoji HATA (Res. Inst., Gekkeikan Sake Co. Ltd.)

【背景・目的】酒粕は長い食経験を持つ伝統的な発酵食品である．酒粕は米を原料とした麹菌や酵母の発酵により生成される成分が多く含まれ，機能性研究により様々な機能性が明らかになってきた．近年，環境や生活習慣の変化から「冷え」を訴える人が増加傾向にあり，食事等での改善が望まれている．また，酒粕がもつイメージの筆頭には「体が温まる」効果があげられるが，これまでほとんど研究が行われていない．そこで，酒粕の冷え改善の機能性を調べるため「体が温まる」効果について検証を行った．
【方法】冷え性の症状が顕著であった男女各 4 名を被験者として選抜し，試験内容の詳細を説明し同意を得たうえで実施した．被検食として，酒粕 2 種類，酒粕ペプチド（プロテアーゼ処理した酒粕），コントロールとして α 化米粉砕物を用い，それぞれ 10 g を摂取した．なお，酒粕に関してはアルコールの影響をなくすため，凍結乾燥してアルコール分を除去したサンプルを使用した．温度 20.5±1.0 ℃湿度 55.5±2.5%の室内にて，試験食を摂取後 40 分間安静にした後，15 ℃冷水に 1 分間手を浸漬した．その後 5 分毎に 30 分間サーモグラフィーカメラと血流測定装置で手の表面温度と指先の血流を測定した．また，*in vitro* の試験系における NO 産生試験では，血管内皮細胞モデルとして HUVEC を用い，可溶性である酒粕ペプチドを添加して，培地中に産生された NO 産生量をグリース試薬を用いて経時的に測定した．
【結果】被検食（酒粕 2 種類および酒粕ペプチド）を摂取することで，手の甲の表面温度および血流がコントロール食を摂取した時よりも上昇した．特に酒粕ペプチドでは表面温度および血流の上昇が顕著であった．酒粕ペプチドの NO 産生作用について確認を行ったところ，濃度依存的に NO 産生量の上昇が確認された．以上のことから，酒粕由来のペプチドには血管内皮細胞の NO 産生を促進し, 血管を拡張させ血流を改善する効果が示唆された．

Sake lees

講演番号：4F37a08
講演日時、会場：3 月 29 日 10:27～ F 校舎 37 会場

キノコに存在する D-アミノ酸の同定と定量
Determination of D-Amino Acids in Mushrooms

○余 卓尔[1]、吉野 一晴[2]、渡邉 彰[2]、伊藤 智和[1]、邊見 久[1]、麻田 恭彦[2]、吉村 徹[1] ([1]名大院生命農、[2]香川大農)
○Zhuoer YU[1], Issei Yoshino[2], Akira Watanabe[2], Tomokazu Ito[1], Hisashi Hemmi[1], Yasuhiko Asada[2], Tohru Yoshimura[1] ([1]Nagoya Univ., [2]Kagawa Univ.)

近年、哺乳類をはじめとした真核生物に遊離 D-アミノ酸が存在することが見出され、これら D-アミノ酸が重要な生理機能を有することが明らかとなってきた。例えば、D-セリンは哺乳動物脳に存在し、*N*-メチル D-アスパラギン酸（NMDA）レセプターのコアゴニストとして機能する。D-アスパラギン酸は、神経および内分泌システムでシグナル分子として働いている。しかしながら、哺乳類以外の真核生物における D-アミノ酸の機能はまだほぼ未知のまま残されている。

本研究では、我々が日常的に摂取するものを含む九種類のキノコ、すなわち、エノキ、ヒラタケ、マイタケ、ハナビラタケ、ヤコウタケ、ワサビタケ、ブナシメジ、エリンギ、ナメコの子実体および栄養菌糸体に存在する D-アミノ酸、特に D-セリンと D-アスパラギン酸を中心に定量した。

分析したほとんどのキノコに D-セリンはほとんど含まれていなかった。しかしながら、ワサビタケ菌糸体には、例外的に D-セリンが含まれており、その含量は全セリン量の約 9.8%であった。一方、D-アスパラギン酸は、全てのキノコ菌糸体に存在していた。特にワサビタケ菌糸体に高濃度含まれており、全アスパラギン酸の 17.7%が D−アスパラギン酸であった。一方、子実体中ではいずれのキノコにおいても D−アスパラギン酸は検出されないか極微量であった。また、ワサビタケ菌糸体に D-アラニンの存在が確認された。ブナシメジには、他のキノコに含まれない未知 D−アミノ酸が存在していた。また、この D−アミノ酸は子実体特異的であり、菌糸体には存在しなかった。現在、この未知 D−アミノ酸の同定を進めている。

mushroom, d-amino acid

講演番号：4F37a09
講演日時、会場：3 月 29 日 10:38～ F 校舎 37 会場

HepG2 細胞においてロイシン欠乏に応答する miRNA の探索とその応答機序解析
Identification and regulatory mechanism of microRNAs which respond to leucine deprivation in HepG2 cells
○山村 淳貴、加藤 久典（東京大学総括プロジェクト機構　食と生命）
○JUNKI YAMAMURA, HISANORI KATO (The University of Tokyo Corporate Sponsored Research Program "Food for Life")

【背景と目的】
microRNA(miRNA)はタンパク質をコードしない小分子 RNA の 1 種であり、標的とする mRNA の 3’非翻訳領域に結合することでその分解や翻訳抑制を誘導する。現在では全遺伝子発現の 50%以上がこの miRNA によって制御されていると考えられている。一方、栄養状態の変化は遺伝子発現やタンパク質の修飾を介して下流に伝達され、最終的な生体応答に反映される。そこで本研究では、こうした情報伝達において miRNA が担う役割を明らかにすることを目的とし、アミノ酸欠乏時に発現変動する miRNA の探索を行った。併せて、アミノ酸欠乏時に活性化する転写因子である ATF4 に着目して、各種 miRNA の発現変動機序の解明にも着手した。
【方法】
(実験 1) ヒト肝臓ガン由来 HepG2 細胞を MEM 培地もしくはロイシン不含 MEM 培地で 12 時間培養した。また同細胞に対し ATF4 過剰発現ベクターをトランスフェクションし、24 時間培養した。各培養後に細胞から total RNA を回収し miRNA 3.0 Array (Affymetrix)に供して miRNA の網羅的発現解析を行った。(実験 2) HepG2 細胞に対して ATF4 を標的とする siRNA をトランスフェクションし 6 時間後に培地を MEM またはロイシンを含まない MEM に交換し、以後 16 時間培養後に total RNA を回収し、miR-1469 の発現を RT-qPCR により調べた。
【結果と考察】
マイクロアレイを利用した網羅的解析によって、ロイシン欠乏に応答して発現上昇する 12 個の miRNA、また ATF4 の過剰発現によって上昇する 203 個の miRNA が抽出された。このうち miR-1469 は両実験において共通して上昇しており、この上昇は siRNA による ATF4 のノックダウンでキャンセルされることが明らかになった。さらに miR-1469 の host gene である NR2F2 の転写開始点上流領域を探索したところ、約 900bp 上流にアミノ酸欠乏時の転写調節に関わるアミノ酸応答配列(AARE)のコア配列 TTTCATCAT が発見されたことから、miR-1469 の発現上昇が ATF4 を介したものである事が支持された。現在 miR-1469 の標的遺伝子の探索を mRNA およびタンパク質レベルで行っている。

microRNA, amino acid nutrition

講演番号：4F37p01
講演日時、会場：3 月 29 日 14:00～ F 校舎 37 会場

鉄欠乏時では活性酸素シグナルセンサーとオートファジーを活性化することで細胞内恒常性を維持する

Regulation of ROS signaling and autophagy in iron deficiency

○井上 博文[1]、勝間田 真一[2]、高橋 信之[1]、上原 万里子[1] ([1]東京農大・健康、[2]東京農大・栄養)
○ Hirofumi INOUE[1], Shi-Ichi KATSUMATA[2], Nobuyuki TAKAHASHI[1], Mariko UEHARA[1] ([1]Dept. of Nutr. Sci. Food Safety, Tokyo Univ. of Agri., [2]Dept. of nutr. Sci., Tokyo Univ. of Agri.)

【目的】鉄はヘムをはじめ、様々なタンパク質の補因子として機能するのみならず、生体内レドックス反応において重要な役割を担っている必須微量元素である。過剰な鉄は酸化ストレスの増強を招くことで疾患リスクを上昇させる。その一方で、鉄不足は貧血や心肥大といった循環器系疾患の発症に関与することが報告されているが、これを制御する分子の作用機序は明らかではない。興味深いことに、我々は鉄欠乏下で肝中過酸化脂質量が増大することから、鉄欠乏と酸化ストレスとの関連を見出した。そこで本研究では、鉄欠乏状態と活性酸素シグナルとの関連を解明することを目的とした。
【方法・結果】先ず、マウス繊維芽細胞である NIH3T3 細胞に鉄キレート剤である deferoxamine(DFO)処理(0-100μM)を濃度依存的に行い、anti-DNP 抗体を用いたカルボニル化修飾でタンパク質の酸化レベルを評価した。その結果、DFO 濃度依存的にタンパク質のカルボニル化が増強することを明らかにした。また DFO 処理群において、タンパク質凝集体(aggresome)と不溶性タンパク質量が増加することも見出した。そこで、DFO 処理によるタンパク質凝集体が活性酸素種(ROS)依存的か否かを検討するために細胞内 ROS 量と活性酸素シグナルセンサーである Nrf2 の活性レベルについて解析を行った。その結果、DFO 処理は細胞内 ROS 量の蓄積と Nrf2 シグナルを活性化することを明らかにした。続いて、DFO により増加した酸化タンパク質がどのような作用機序で制御されているのかを明らかにするために、オートファジーマーカー分子である LC3-II のタンパク質発現レベルとオートファジー実行分子群 p62, Beclin-1, Vps34 mRNA レベルについての解析を行った。その結果、DFO 処理により LC3-II の発現が上昇するとともに、p62, Beclin-1, Vps34 の遺伝子発現も上昇した。また酸化タンパク質がオートファジーによって制御されているか否かを明らかにするため、p62 ノックダウン及びオートファジー阻害剤である 10mM 3-Methyladenine(3-MA)と 100μM DFO の併用処理を行った。その結果、DFO 単独処理と比較して、p62 ノックダウン細胞および 3-MA 併用処理群において、酸化タンパク質が著しく増強されることが確認された。【結論】鉄欠乏時では、Nrf2 を介したレドックス応答と p62 を介したオートファジーを活性化させることで、細胞内恒常性を維持していることが示唆された。

iron deficiency, autophagy, oxidative stress

講演番号：4F37p02
講演日時、会場：3 月 29 日 14:11～ F 校舎 37 会場

実験的大腸炎及びそれに伴う腎肥大発症における血中ミネラルの関与
Plasma calcium is associated with the development of hypertrophy of the kidney in the experimental colitis of rats

○常木 生也、清水 英寿、岩谷 一史、原 博、石塚 敏（北大院農・応生科）
○Ikuya TSUNEKI, Hidehisa SHIMIZU, Hitoshi IWAYA, Hiroshi HARA, Satoshi ISHIZUKA (Hokkaido Univ.)

＜研究背景＞

潰瘍性大腸炎は主に大腸粘膜における炎症性疾患であるが、腎不全を併発することが知られている。一方、デキストラン硫酸ナトリウム（DSS）により誘導される実験的大腸炎において、血清中亜鉛濃度の低下および肝臓中亜鉛濃度の上昇が病態進行に関係することを我々は見出している。DSS による実験的大腸炎におけるこれらの関係について検討した。

＜方法＞

4週齢の F344/Jcl 雄ラットに卵白をタンパク源とした AIN-93G 準拠飼料を7日間自由摂食させた後、対照群および1% DSS 投与群の2群に分けた。DSS は純水に溶解させた状態で自由摂取させた。体重減少・便の性状を基準とした臨床症状（DAI）を経時的に評価し、DSS 投与10日後に解剖を実施した。さらに、誘導結合プラズマ分析装置（ICP-MS）を用い関連組織における網羅的ミネラル解析を実施するとともに、各種遺伝子発現を解析した。

＜結果及び考察＞

摂餌量や体重に有意な変化はなく、DSS 投与3日後から DSS 群において DAI の有意な上昇が確認された。DSS 群において、結腸の短縮、結腸 TNF-αおよび MCP-1 発現の上昇が確認された。DSS 群では、腹部大動脈の血漿中 Ca 濃度が有意に低下した。また血漿 Ca 濃度は、DAI や結腸 TNF-α及び MCP-1 発現、単位重量当たりの腎重量と負の相関があり、結腸長とは正の相関があることを見出した。血漿中 Ca 濃度を反映する腎皮質中 Ca 濃度と DAI との間には負の相関が観察された。これらのことより、大腸炎発症時における血中 Ca 濃度の低下はその病態進行及び腎肥大の指標となり得ることが示唆された。

ulcerative colitis, dextran sulfate sodium, calcium

講演番号：4F37p03
講演日時、会場：3 月 29 日 14:22～ F 校舎 37 会場

成長期の潜在的亜鉛欠乏がラットのオレキシン分泌に及ぼす影響

Effect of marginal zinc deficiency on orexin secretion in growing rats

○後藤 知子、小松 裕介、住友 将洋、真柳 佑希、白川 仁、駒井 三千夫（東北大院農）
○ Tomoko GOTO, Yusuke KOMATSU, Masahiro SUMITOMO, Yuki MAYANAGI, Hitoshi SHIRAKAWA, Michio KOMAI (Tohoku Univ.)

【目的】近年、我が国では、朝食の欠食など食習慣の乱れや食生活の偏りにより、潜在的な亜鉛欠乏が増えているといわれている。必須微量元素の１つである亜鉛が欠乏すると、食欲不振、成長の遅延、皮膚炎、味覚障害などを引き起こすことが知られている。ラットを用いた検討では、亜鉛欠乏食給餌 3～4 日目から摂食量が低下することが観察されてきた。しかし、成長期の潜在的亜鉛欠乏ラットにおける食欲調節ペプチドの分泌については不明な点が多い。摂食促進ペプチドとして知られるオレキシンは、視床下部外側野（Lateral hypothalamus; LH）と、その周辺領域に散在する特定のニューロンに特異的に発現し、摂食促進作用のみならず、覚醒・睡眠の維持に重要な役割を果たす。オレキシン神経の投射先は、視床下部内全般（特に弓状核、腹内側核）のみならず、小脳を除く中枢神経系全域にわたる。特に、モノアミン作動性神経の起始核である青斑核（ノルアドレナリン作動性）・縫線核（セロトニン作動性）・結節乳頭体核（ヒスタミン作動性）や室傍核などに顕著な投射がみられる。そこで本研究では、成長期の潜在的亜鉛欠乏が、ラットのオレキシン分泌に及ぼす影響を明らかにすることを目的とし、オレキシン産生部位の視床下部外側野におけるオレキシン濃度を測定した。
【実験方法】＜実験 1＞血漿中オレキシン濃度の測定 : 実験動物は、SD 系雄ラット、4 週齢を用いた。3～4 日間の馴化後、実験食（亜鉛欠乏食・低亜鉛食・亜鉛添加食）を給餌した。実験群は、亜鉛欠乏食群、低亜鉛食群、亜鉛添加食群、ペアフェド群とした。実験食給餌 4 日目に採血し、血漿中オレキシン濃度を ELISA 法にて測定した。＜実験 2＞LH 透析液中オレキシン濃度の測定 : 実験動物は、SD 系雄ラット、5 週齢を用いた。3～5 日間の馴化後、麻酔下で LH にガイドカニューレ埋め込み手術を行い、5 日間の回復期間後に実験食（亜鉛欠乏食、亜鉛添加食）を給餌した。実験群は、亜鉛欠乏食群、ペアフェド群とした。実験食給餌 4 日目の暗期（20：00～8：00）に、マイクロダイアリシス法にて透析液を回収し、透析液中オレキシン（オレキシン A）濃度を ELISA 法にて測定した。
【結果および考察】血漿中オレキシン濃度は、亜鉛欠乏食群でペアフェド群に比べ有意な低値を示した。LH における透析液中オレキシン濃度も、亜鉛欠乏食群でペアフェド群に比べ有意な低値を示した。したがって、成長期の潜在的亜鉛欠乏ラットではオレキシン分泌が低下する可能性が考えられた。

zinc deficiency, orexin, rats

講演番号：4F37p04
講演日時、会場：3 月 29 日 14:33～ F 校舎 37 会場

Menaquinone-4 and geranylgeraniol regulates testosterone production testis-derived tumor I-10 cells

○Hsin-Jung Ho, Hitoshi Shirakawa, Risa Yoshida, Misato Maeda, Tomoko Goto, Michio Komai (Tohoku Univ.)

[Objectives] Vitamin K is a fat soluble vitamin which is involved in blood coagulation and bone metabolism. Naturally existing vitamin K includes vitamin K1 (phylloquinone) and K2 (menaquinone). Menaquinone-4 (MK-4) is both a member of the vitamin K2 family and metabolite of K1 and other vitamin K in several tissues. Geranylgeraniol (GGOH) is a side chain component of MK-4 and also an isoprenoid which plays a role in several important biological processes. We previously showed that MK-4 and GGOH can enhance testosterone production in rats and testis-derived tumor cells. However, the whole mechanisms of this enhancement have not been well elucidated. In this study, we further clarified the mechanisms of enhanced testosterone production by MK-4 and GGOH.
[Materials & Methods] First, effects of MK-4 and GGOH on testosterone production in testis-derived tumor cells (I-10) were measured; progesterone is the precursor hormone of testosterone, also were measured in I-10 cells. And then, cAMP level of I-10 cells was measured after treated with MK-4 or GGOH. I-10 cells also treated with the inhibitors of protein kinase A (PKA), adenylate cyclase (AC) and phosphodiesterase (PDE) to clarify the effects on cAMP-PKA signaling pathway. Finally, steroidogenesis-related mRNA and protein levels also been measured by quantitative RT-PCR and western blotting, respectively.
[Results] MK-4 and GGOH could significantly increase testosterone production as well as enhanced cAMP levels in I-10 cells, and that exhibited dose-dependent manner. Moreover, after treated with PKA and AC inhibitors, concentration of progesterone, intermediate of testosterone in I-10 cells, was reduced even treated with GGOH or MK-4; in contract, after treated with PDE inhibitor, progesterone level was increased after treated with GGOH. Through RT-PCR, the results showed that MK-4 might stimulate testosterone production through regulated AC and PDE mRNA levels. Also via western blotting, showed that MK-4 and GGOH regulated cAMP-PKA signaling pathway.
[Conclusion] These results showed that MK-4 and GGOH can induce steroidogenesis via the cAMP-PKA signaling pathway by similar effects but not the same.

menaquinone-4, geranylgeraniol, testosterone production

講演番号：4F37p05
講演日時、会場：3 月 29 日 14:44～ F 校舎 37 会場

ビオチンがテストステロン産生に及ぼす影響とその作用機序の解析

Effect of biotin on testosterone production in mouse testis and testis derived tumor cells.

○前田 美里、白川 仁、桂井 朋子、駒井 三千夫（東北大院農）
○Misato MAEDA, Hitoshi SHIRAKAWA, Tomoko KATSURAI, Michio KOMAI (Tohoku Univ.)

【背景・目的】ビオチンは、糖代謝、脂質代謝、アミノ酸代謝に関与するカルボキシラーゼの補酵素として働く。一方、我々はビオチンの新規作用の検索を行い、薬理量のビオチンをラットへ投与した場合、黄体形成ホルモン非依存的に精巣におけるテストステロン（Ts）産生が上昇することを見出した。近年、加齢およびストレス負荷により、性ホルモン産生が低下する加齢男性性腺機能低下症候群（LOH 症候群）が顕在化している。この LOH 症候群に対する食品成分による症状改善にも関心が集まっている。そこで本研究では、マウス及び精巣ライディッヒ細胞由来の培養細胞を用いて、ビオチンが Ts 産生に及ぼす影響を解析した。

【方法】BALB/c マウス及び I-10 を用いた。BALB/c マウス（雄、7 週齢）にビオチンを腹腔内投与した。6 時間後、精巣・血清を採取し、Ts 濃度を ELISA 法で測定した。マウス精巣由来癌細胞 I-10 をビオチンの存在下・非存在下で一定時間培養した後に培地中に分泌された Ts 量と Ts 産生経路の中間体であるプロゲステロン（Ps）量を測定した。また、ビオチンの作用点を推定するため、Ts 合成経路の上流因子に当たるアデニル酸シクラーゼ（AC）や A キナーゼ（PKA）、ホスホジエステラーゼ（PDE）の阻害剤、ビオチンの細胞輸送に関わる SMVT の拮抗剤を細胞に処理して同様の測定を行った。細胞特異性を調べるため、ヒト肝癌由来細胞（HepG2）、大腸癌由来細胞（LS180）、マウスマクロファージ様細胞（RAW264.7）においてレポータージーンアッセイを行い、PKA の活性化を調べた。

【結果】マウスにビオチンを腹腔内投与したところ、精巣中・血漿中の Ts 量が上昇した。これに加え、ビオチンは、添加量・時間依存的に I-10 細胞の Ts および Ps 分泌量を有意に増加させた。次に、AC 阻害剤（MDL12,330A）や PKA 阻害剤（H89）を共処理すると、それぞれ Ts 産生促進作用が阻害された。一方、PDE 阻害剤や SMVT 拮抗剤（パントテン酸）による有意な阻害作用は見られなかった。また、HepG2、LS180、RAW246.7 細胞に関して PKA の活性化は見られなかった。以上のことから、ビオチンは Ts 産生を促進し、その作用は SMVT を介さずに AC の活性化→ PKA のリン酸化（活性化）を介すことが明らかとなった。

biotin, testosterone, i-10

講演番号：4F37p06
講演日時、会場：3 月 29 日 15:05～ F 校舎 37 会場

all-*trans*-レチナールによる網膜色素上皮細胞の細胞死誘導機構の解析とピリドキサミンによる保護効果の検証

Cytoprotective action of pyridoxamine against all-*trans*-retinal-induced cell death in human retinal pigment epithelial cells

○井出 涼子[1]、甲斐 建次[2]、須山 享三[3]、赤川 貢[2]([1]大阪府大・生命環境、[2]大阪府大院・生命環境、[3]東北大院・医学)

○Ryoko Ide[1], Kenji Kai[2], Kyozo Suyama[3], Mitsugu Akagawa[2] ([1]Sch. of Life & Environ. Sci., Osaka Pref. Univ., [2]Grad. Sch. of Life & Environ. Sci., Osaka Pref. Univ., [3]Tohoku Univ. Sch. of Med.)

【目的】加齢黄斑変性症は、加齢に伴い網膜中心部の黄斑に障害が生じることで視力低下を引き起こし、深刻なケースでは視力の喪失をもたらす難治性疾患である。欧米では成人の失明原因の第１位であり、日本でも50歳以上の約1%が罹患しており、高齢化社会の到来とともに患者数が急増している。発症要因としては、加齢に伴う all-*trans*-retinal(atRal)代謝の衰弱・遅延によって atRal 濃度が上昇し、黄斑部に存在する網膜色素上皮細胞に atRal 由来の蛍光性加齢色素(リポフスチン)が蓄積することによって細胞が損傷され、アポトーシスが惹起されるというメカニズムが示唆されている。しかしながら分子レベルでの詳細な発症機構は未だ解明されていない。一方、一級アミンでありビタミン B6 化合物として知られるピリドキサミン(PM)は、脂質過酸化やメイラード反応によって生じるカルボニル化合物を捕捉することで糖尿病合併症の発症を予防する効果が報告されている。そこで本研究では、atRal によって誘導される網膜色素上皮細胞死のメカニズムを解析するとともに、PM によるリポフスチン生成の抑制効果および細胞死の阻害効果を明らかにすることを目的とした。

【方法と結果】はじめに、atRal によるタンパク質中のリポフスチン形成を調べるために atRal と BSA を 37℃、遮光条件下でインキュベートし、SDS-PAGE で分離後に蛍光スキャナで解析したところ、蛍光性の付加体の形成が明らかとなった。また、atRal と *N*α-Boc-Lys を同様の条件でインキュベートし、生成物を蛍光 HPLC、NMR および ESI-LC/MS によって解析したところ、リジン残基のε-アミノ基に 2 分子の atRal が結合した蛍光性付加体の生成が確認された。さらにヒト由来網膜色素上皮細胞 ARPE-19 を使って細胞レベルでの検証を行ったところ、atRal 処理細胞の蛍光顕微鏡観察において atRal 濃度依存的かつ経時的なリポフスチンの蓄積が見られ、細胞増殖アッセイによって細胞死の誘導が観察された。また、細胞内タンパク質中にリポフスチンが形成されるかどうかを SDS-PAGE による分離後に蛍光スキャナで分析した結果、atRal 濃度依存的かつ経時的なタンパク質の蛍光化が認められた。そこでこれら atRal の効果に対する PM の抑制効果を調べるために、PM と BSA または *N*α-Boc-Lys を上記の条件でインキュベートし、同様に解析を行った。その結果、PM は BSA の蛍光化および atRal と *N*α-Boc-Lys の反応による蛍光性付加体の生成を顕著に抑制することが判明した。さらに PM は濃度依存的に ARPE-19 細胞のリポフスチン形成、細胞死およびタンパク質の蛍光化を抑制することが明らかとなった。以上の結果から、PM は atRal 由来のリポフスチン生成を抑制し、網膜色素上皮細胞を保護することが判明した。

Age-related macular degeneration, all-*trans*-Retinal, Pyridoxamine

講演番号：4F37p07
講演日時、会場：3 月 29 日 15:16～ F 校舎 37 会場

マクロファージ分化におけるビタミン D の影響

Influence of vitaminD on differentiation of monocyte, THP-1, to macrophages

○安藤 恵、湊 健一郎、小原 章裕（名城大院農）
○Megumi ANDOH, Kenichiro MINATO, Akihiro OHARA (Meijo Univ.)

【目的】マクロファージには，異物の侵入を感知し貪食する働きを持つ 1 型マクロファージ（M1）が存在する。これらには炎症性作用があり，過度に増殖した状態が続くと，慢性炎症性疾患を誘発するといわれる。一方で，Th2 サイトカインにより誘導される 2 型マクロファージ（M2）が存在し，それらは M1 を抑制する働きがあるといわれる。つまり M2 は M1 増殖を抑えることにより，慢性炎症性疾患の予防が期待される。本実験ではビタミン D の M2 促進効果を検討した。ビタミン D は骨代謝の調節作用が知られるが，最近では免疫系への作用も期待されている。本実験ではさらに，ビタミン D が含まれる魚からの抽出物についても M2 促進効果があるか検討する。
【方法・結果】THP-1 細胞をマクロファージに分化させるため，PMA とビタミン D を添加し 48 時間培養した。PMA と血清を除いて 24 時間培養後，LPS（M1 分化条件）または，IL-4（M2 分化条件）を添加し，ビタミン D とともに 24 時間培養して影響を調べた。単球からのマクロファージ分化は免疫細胞染色法によりマクロファージマーカーCD68 発現を調べ，マクロファージに分化したことを確認した。ビタミン D のマクロファージ分化への影響は，定量的 PCR 法により，M1 型分化マーカーとして IL-1β，及び M2 型分化マーカーとして IL-10 の mRNA 遺伝子発現量を調べた。その結果，ビタミン D はマクロファージ分化において，LPS 存在下（M1 分化条件）では IL-1β 発現を抑制し，IL-4 存在下（M2分化条件）では IL-10 発現を促進する傾向があった。
【結論】以上の結果より，単球からの M1/M2 への分化においてビタミン D は，M1 分化を抑制し M2 分化を促進することが示唆された。本実験ではさらに魚からの抽出物のマクロファージ分化への影響があるかについても検討している。

macrophage, M1/M2, vitaminD

講演番号：4F37p08
講演日時、会場：3 月 29 日 15:27～ F 校舎 37 会場

DGKα欠損マウスにおける糖尿病性腎症に対するビタミン E の効果
Effect of vitamin E on diabetic nephropathy in DGK alpha deficient mice

○林 大輝[1]、八木 敬子[2]、上田 修司[1]、山之上 稔[1]、江本 憲昭[2]、斎藤 尚亮[3]、白井 康仁[1] ([1]神戸大院・農・生命機能、[2]神戸薬大・臨床薬学、[3]神戸大・バイオ研)
○Daiki HAYASHI[1], Keiko YAGI[2], Shuji UEDA[1], Minoru YAMANOUE[1], Noriaki EMOTO[2], Naoki SAITO[3], Yasuhito SHIRAI[1] ([1]Kobe Univ., Dept. Agrobiosci., [2]Kobe Pharm. Univ., Clin. Pharm., [3]Kobe Univ., Biosignal Res. Ctr.)

【目的と背景】

糖尿病性腎症は糖尿病の三大合併症のひとつであり、血中高グルコースによるジアシルグリセロール(DG)の産生と、それに続くプロテインキナーゼ C(PKC)の活性亢進がその発症及び増悪の一因であることが知られている。一方で DG キナーゼ(DGK)は DG をホスファチジン酸に変換する酵素であることから、PKC 活性を間接的に抑制し、糖尿病性腎症を改善することが期待される。現在までに、ビタミン E(VtE)がラット腎糸球体において DGK の活性化を介し、PKC 活性を正常化することにより糖尿病性腎症を改善することが報告されている[1)]。さらに、我々は、VtE がラット腎糸球体に存在する DGK サブタイプの中でも in vitro で DGKαを特異的に活性化することを明らかにしている[2)]。しかし、実際に in vivo で DGKαが VtE による糖尿病性腎症改善に関与しているかはいまだ明らかではない。そこで本研究では、DGKα欠損マウスを用いて VtE の糖尿病性腎症改善効果が DGKαの欠損により減弱するか否かを検証した。

【方法】

生後 6 週齢の野生型マウス(WT)及び、DGKα欠損マウス(KO)をストレプトゾトシン(STZ)投与により糖尿病にし、それぞれ VtE を腹腔内に隔日投与した処置群及び投与していない群、さらに同齢の STZ 未処置マウスのコントロール群を用意した。各群、6 週間にわたって糖尿病性腎症の指標である尿量、尿アルブミン量、尿クレアチニン量、血中クレアチニン量、クレアチニンクリアランス(Ccr)を 1 週間おきに測定し、比較した。

【結果】

STZ 投与後 1 週間で WT,KO のどちらにおいても STZ 未処置群に比べ有意な血糖値の上昇が見られ、糖尿病を発症したことを確認した。また、血糖値及び体重における VtE 投与の影響は WT,KO 共に認められなかった。糖尿病性腎症を発症すると、多尿となり腎糸球体のろ過機能の目安となる Ccr が変動することが知られているが、尿量、Ccr において WT では VtE 投与による腎症の改善傾向が見られたが、KO では VtE の効果が減弱した。以上のことから DGKαは in vivo においても VtE による糖尿病性腎症の改善に寄与していることが明らかになった。

1) Koya et al J. Am. Soc. Nephrology., Mar 1997; 8: 426 – 435
2) R. Fukunaga-Takehara et al Genes to Cells 2005 10: 311 - 319

diabetic nephropathy, diacylglycerol kinase α, vitamin E

講演番号：4F37p09
講演日時、会場：3 月 29 日 15:38～ F 校舎 37 会場

ビタミン B_{12} 欠乏線虫(*Caenorhabditis elegans*)のアミノ酸及びポリアミン代謝異常について

Effects of vitamin B_{12} deficiency on amino acid and polyamine metabolism in *Caenorhabditis elegans*

○美藤 友博、藪田 行哲、河野 強、渡邉 文雄 (鳥取大院連合農学)
○Tomohiro BITO, Yukinori YABUTA, Tsuyoshi KAWANO, Fumio WATANABE (Tottori Univ.)

【背景・目的】ビタミン B_{12}(B_{12})は奇数鎖脂肪酸および分岐鎖アミノ酸の異化代謝において、(*R*)-メチルマロニル CoA からスクシニル CoA への変換を触媒するメチルマロニル CoA ムターゼ(MCM)の補酵素として機能する。また、B_{12} はホモシステインとテトラヒドロ葉酸からメチオニンの生成を触媒するメチオニンシンターゼ(MS)の補酵素としても機能している。従って、B_{12} 欠乏症は種々のアミノ酸代謝異常に起因することが推察されるが、B_{12} 欠乏症である神経障害とアミノ酸代謝異常の詳細な関連性は明らかになっていない。我々は、これまでに線虫(*Caenorhabditis elegans*)が生育に B_{12} を要求し、哺乳動物と同様に B_{12} 欠乏症を呈することを明らかにした[Bito *et al.* (2013) FEBS Open Bio, 3, 112-117]。そこで本研究は B_{12} 欠乏性神経障害の発症機構の解明を目的とし、B_{12} 欠乏が線虫のアミノ酸代謝およびポリアミン代謝に及ぼす影響を検討した。

【方法】線虫を B_{12} 添加および B_{12} 無添加培地で 5 世代間生育させたものをコントロール線虫および B_{12} 欠乏線虫として使用した。線虫の体内アミノ酸含量は全自動アミノ酸分析装置で測定した。線虫の *S*-アデノシルメチオニン(SAM)と *S*-アデノシルホモシステインならびにポリアミン含量はHPLCにて測定した。B_{12} 関連酵素およびポリアミン代謝関連酵素の mRNA 発現は qPCR 法で評価した。

【結果・考察】B_{12} 欠乏線虫は B_{12} 欠乏ラットと同様にバリン、ロイシン、イソロイシンなどの分岐鎖アミノ酸の顕著な蓄積に加えて、今回新たにオルニチンの蓄積が示された。オルニチンはポリアミンの前駆体であるためポリアミン化合物を測定した結果、B_{12} 欠乏線虫ではスペルミジンが著しく減少していた。また、B_{12} 欠乏線虫では生体内のメチル化反応の指標である SAM が著しく減少すると共にスペルミジン合成に関与する SAM デカルボキシラーゼの mRNA 発現レベルが顕著に低下していた。以上の結果から、B_{12} 欠乏線虫におけるスペルミジンの減少は基質である SAM の減少が最も大きな要因であると推測された。また、オルニチンはアルギニンからアルギナーゼの作用により生成されるが、*C. elegans* はアルギナーゼ遺伝子が欠損していると報告されているため、現在、*C. elegans* においてアルギナーゼの存在の有無を含めて詳細に検討している。

Vitamin B_{12}, Ornithine, Polyamine

講演番号：4F37p10
講演日時、会場：3 月 29 日 15:49～ F 校舎 37 会場

リンゴ果汁によるアスコルビン酸の血中保持効果と排泄への影響

Effects of apple juice on blood and urinary ascorbic acid concentrations in ODS rats

○井澤 弘美（青森県立保健大学）
○Hiromi IZAWA (Aomori Univ. of Health and Welfare)

【緒言】

一般に果物にはビタミン C（アスコルビン酸、以下 AsA とする）が多く含まれているが、リンゴの AsA は他の果物と比べて少ない（日本食品標準成分表では 4mg/100g 可食部）。一方、リンゴを摂取することで通常以上の AsA が体内に保持されることを示した報告がある。そこで本研究では、リンゴ果汁を摂取しても体内の AsA 量が通常以上の濃度が保持されるかどうかを調べ、もし増加した場合はその作用機序を検討することとした。

【研究方法】

ODS 雄性ラットを用い二つの実験を行った。

実験Ⅰ. 0.2、2 および 20%リンゴ果汁に AsA が 2g/L になるように調製した水溶液をラットの飲料水とし、それぞれ 0.2%りんご果汁溶液摂取群（0.2%AJ 群）、2%AJ 群および 20%AJ 群とした。対照は 2g/L AsA 溶液摂取群（Control 群）とした。AIN93G 標準飼料と飲料水は自由摂取させた。２週間の飼育後解剖し臓器、血液を実験に供した。

実験Ⅱ. Control 群と 2%AJ 群の 2 群とし、実験Ⅰと同様の飼育を行った。飼育開始時、飼育 1 週間後および 2 週間後に 24 時間尿を採取し、飼育 2 週間後に全採血して血液を実験に供した。

【結果および考察】

実験Ⅰ. 0.2%と 20%AJ 群の各臓器中 AsA は、Control 群よりも低値を示し、中には有意差を示すものもあった。2%AJ 群の各臓器中 AsA は Control 群との有意差は見られなかった。2%AJ 群の血漿 AsA 濃度は Control 群よりも有意に高値を示した。このことから、2%AJ の摂取が通常以上に血中 AsA 濃度を保持する効果をもつことが示唆された。

実験Ⅱ. 2%AJ 群の血漿 AsA 濃度は Control 群よりも有意に高値を示した。また、尿中 AsA 濃度は、Control 群で時間依存的増加傾向を示した。それに対して 2%AJ 群では、その傾向を示さず AsA 濃度がほぼ一定であった。この結果から、2%AJ 摂取による血中 AsA 保持効果の作用機序として、2%AJ が腎臓での AsA の再吸収に関与し、尿中に AsA を排出させないようにしていることが示唆された。

apple, ascorbic acid, ODS rat

講演番号：4F45a03
講演日時、会場：3 月 29 日 09:22～ F 校舎 45 会場

発酵米糠抽出物のヒト急性 T 細胞性白血病株に対するデスレセプター経路によるアポトーシス誘導作用

Extract of fermented rice bran induces apoptosis via death receptor pathway in human leukemia cells.

○堀江 裕紀子[1]、伊藤 麻里[1]、根本 英幸[1]、小坂 弘明[1]、村井 毅[2]、池川 繁男[3] ([1](株)コーケン、[2]北海道医療大学、[3](株)玄米酵素)
○Yukiko HORIE[1], Mari ITO[1], Hideyuki NEMOTO[1], Hiroaki KOSAKA[1], Tsuyoshi MURAI[2], Shigeo IKEGAWA[3] ([1]Koken Co., Ltd., [2]Health Sciences University of Hokkaido, [3]Genmai Koso Co., Ltd)

米はアジア・アフリカ・日本では主食の一つとして、精米した胚乳が食されているが、糠層は食されていない。しかし、米糠にはビタミン・ミネラル・食物繊維のほか、γ-オリザノールに代表される生理活性物質が豊富に含まれており、食と健康の意識が高まる昨今では、それらの機能に多くの注目が寄せられている。発酵米糠食品（FBRA）は玄米と米糠を麹菌 *Aspergillus oryzae* で発酵させた食品である。FBRA には米糠由来の生理活性物質に加え、麹菌の発酵によって新たに産生された機能性成分も含まれており、健康維持に役立つ機能性解析に期待が寄せられている。今回、FBRA 超音波抽出液によるヒト急性 T 細胞性白血病細胞株 Jurkat のアポトーシス誘導作用と、その作用機序について精査した。

FBRA粉末に5倍量の蒸留水を加え、30分間超音波抽出し、遠心分離(20,000×g, 2h)後の上清をメンブレンフィルター(0.45 μm)で滅菌した濾液をFBRA抽出液として調製した。10%FBS含有RPMI培地中で前培養したJurkat細胞にFBRA抽出液を添加し細胞生存率を調べた結果、濃度並びに時間依存的な減少がみられた。さらに、DNAの断片化とカスパーゼ阻害剤による細胞生存率の回復が観察され、アポトーシスが誘導されている事がわかった。そこで、アポトーシス関連タンパク質の発現量を測定した。その結果、カスパーゼ3、8、9の活性化とBcl-2の減少が観察された。また、阻害剤を用いた試験において細胞生存率がカスパーゼ8阻害剤によって回復したが、カスパーゼ9阻害剤では影響を受けなかった。さらに、t-Bidの蓄積が観察された。これらの結果、FBRA抽出液はデスレセプター経路によってアポトーシスを起こし、t-Bidを介してミトコンドリア経路を刺激しているものと推察された。そこでさらに、デスレセプターの発現量に注目し、DR5とFasの発現量を調べた。その結果、濃度依存的に発現量が増加しており、FBRAがレセプターの感受性を上げてアポトーシスシグナルを増強させている可能性が示唆された。因みに、これらのアポトーシス誘導作用は未発酵の米糠抽出液では観察されなかったため、これらの作用は麹菌による発酵によって得られた生産物の作用と推察された。

最後に、FBRA抽出液をスピンカラムで限外濾過し、Jurkat細胞に作用させた結果、10kDa以下の分画成分にアポトーシス誘導活性が認められた。現在、活性成分の探索を試みている。

rice bran, *Aspergillus oryzae*, apoptosis

講演番号：4F45a04
講演日時、会場：3 月 29 日 09:33～ F 校舎 45 会場

マンゴスチン（*Garcinia mangostana*）から単離したキサントン類の DNA 合成酵素阻害活性と抗がん作用について

Anti-cancer effects of xanthone derivatives isolated from mangosteen (*Garcinia mangostana*) on DNA polymerase inhibitory activity

○小野寺 威文[1,2,3]、坂本 裕香[1]、竹仲 由希子[4]、神前 祥子[4]、棚橋 孝雄[4]、水品 善之[1,2]（[1]神戸学院大・栄養、[2]神戸学院大・LSC、[3]神戸学院大・薬、[4]神戸薬科大）

○Takefumi ONODERA[1,2,3], Yuka SAKAMOTO[1], Yukiko TAKENAKA[4], Sachiko KOZAKI[4], Takao TANAHASHI[4], Yoshiyuki MIZUSHINA[1,2] ([1]Faculty of Nutrition, Kobe Gakuin Univ., [2]LSC, Kobe Gakuin Univ., [3]Faculty of Pharmaceutical Sci., Kobe Gakuin Univ., [4]Kobe Pharmaceutical University)

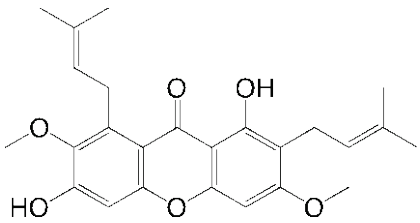
【目的】オトギリソウ科のマンゴスチン（*Garcinia mangostana*）は、東南アジアで栽培されている常緑高木であり、その果実は食用にされている。マンゴスチンの果皮に含まれるキサントン類には種々の生物活性が知られている。我々は、これまでにマンゴスチン果実から哺乳類の DNA 合成酵素(DNA ポリメラーゼ, Pol）阻害活性物質としてα-mangostin を単離・精製して、本物質にはがん細胞増殖抑制活性があることを報告した[1]。そこで、さらなる Pol 阻害活性に基づいた抗がん作用をもつ有用成分の単離を目的として、マンゴスチンの葉部および果皮の成分の検索を行った。

【方法】ベトナムとタイでそれぞれ採取した *G. mangostana* の葉部と果皮をメタノール抽出後、クロロホルム可溶画分を各種クロマトグラフィーにより分離精製し、単離した化合物を各種スペクトルデータに基づき同定した。哺乳類由来の Pol 分子種の精製酵素を準備して、Pol 活性測定は、基質として合成 DNA である poly(dA)/oligo(dT)$_{18}$ と[^{3}H]-dTTP を用いて、Pol によるトリチウム[^{3}H]の取り込み量を液体シンチレーションカウンターで定量測定した[2]。ヒト子宮がん細胞（HeLa cells）増殖抑制活性は WST-1 法で測定した。

【結果】*G. mangostana* の葉部より friedelin と 10 種のキサントン誘導体、果皮より 8 種のキサントン誘導体を単離した。そのうちβ-mangostin, mangostanin, gartanin, 8-deoxygartanin は両部位から共通して得られ、計 14 種の既知キサントン誘導体を同定した。ついで、得られたキサントン誘導体のうちα-mangostin を含む 8 種について、哺乳類 Pol 群に対する阻害活性を評価し、構造活性相関を調べたところ、β-mangostin がα-mangostin より強い活性を示し、その活性は 8 種のキサントン誘導体の中で最も強かった。このことからキサントン骨格のプレニル基とメトキシ基の数と置換位置が、Pol 阻害活性に重要な影響を与えることが示唆された。また、ヒト子宮がん細胞増殖抑制活性は、Pol 阻害活性と同じ傾向を示し、β-mangostin の増殖抑制活性が最強であった。現在、β-mangostin について、ヒト子宮がん細胞に対するアポトーシス誘導活性があるか解析中である。

【考察】β-mangostin に哺乳類 Pol 阻害活性に基づいたヒト由来がん細胞増殖抑制活性が見られたことから、抗がん剤開発が期待できる。

[1] Y.Mizushina *et al.* (2013) ***Food Chem. Toxicol.*** 59, 793-800.
[2] 特許第 3821867 号、発明者：水品他



β-mangostin の構造

DNA polymerase, *Garcinia mangostana*, Anti-cancer

講演番号：4F45a05
講演日時、会場：3 月 29 日 09:44～ F 校舎 45 会場

トコトリエノールの抗癌作用に対するフェルラ酸の相乗効果

Synergistic anti-cancer effect of tocotrienol and ferulic acid

○永塚 貴弘[1]、舘脇 直人[1]、西田 浩志[1]、仲川 清隆[2]、宮澤 陽夫[2,3] ([1]新潟薬大・応用生命、[2]東北大院農・機能分子解析学、[3]東北大学未来科学技術共同研究センター)
○Takahiro EITSUKA[1], Naoto TATEWAKI[1], Hiroshi NISHIDA[1], Kiyotaka NAKAGAWA[2], Teruo MIYAZAWA[2,3] ([1]Niigata University of Pharmacy and Applied Life Sciences, [2]Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University, [3]New Industry Creation Hatchery Center, Tohoku University)

【目的】米ぬかにはトコトリエノール（T3)、フェルラ酸（FA）などの食品成分が豊富に含まれ、近年米ぬか成分の機能性が数多く見出されている。T3 は多様な生理作用を有しており、中でも抗癌作用についての研究報告が多く存在する[1]。T3 は 4 種の異性体の間で生理活性の強さが異なり、δ-T3 が最も高い抗癌効果を示すことが知られている。一方、FA にも抗酸化、認知症予防、発癌抑制などの生理作用が認められ、近年注目を集めている。以上のことから、米ぬか成分の積極的活用は健康維持に繋がると考えられるが、これらの機能性成分を組み合わせてその影響を検証した研究例は過去にない。本研究ではδ-T3 と FA に着目し、δ-T3 の癌細胞増殖抑制と FA による相乗効果を検討した。
【方法・結果】δ-T3 と FA を培地に添加して PANC-1 細胞（膵臓癌）を培養後、生存率を MTT 法で測定した。δ-T3 を単独で処理した結果、PANC-1 細胞の増殖を濃度依存的に阻害した。一方、FA 単独では細胞の増殖に何ら影響がなかったが、δ-T3 と FA を同時に添加することでδ-T3 による増殖阻害活性が FA の濃度に依存して飛躍的に高まることが明らかになった[2]。フローサイトメトリー解析の結果、細胞周期に対する FA の効果は認められなかったが、δ-T3 処理によって G1 期停止を誘導し、FA の同時添加でその作用がさらに高まった。ウエスタンブロット法によって細胞周期の G1 期停止に関与する p21 の発現を調べたところ、δ-T3 と FA の同時処理で p21 の発現レベルが効果的に増加していた。FA はフェニルプロパノイドに分類されるフェノール性化合物として知られている。フェニルプロパノイド類（カフェ酸など）を用いて PANC-1 細胞に対する増殖抑制効果を同様に検討した結果、δ-T3 との同時添加で相乗作用が認められたことから、フェニルプロパノイド骨格が相乗効果に重要であると示唆された。FA の作用機序を明らかにするために、細胞からδ-T3 を抽出して HPLC で分析した。FA を同時処理することで顕著に細胞内のδ-T3 量が増大しており、FA による相乗作用はδ-T3 の細胞内濃度に起因すると考えられた。この結果から、T3 が有するその他の生理作用についても FA は相乗効果を発揮することが示唆された。そこで、T3 によるテロメラーゼ阻害[3]に対する FA の影響を調べたところ、FA は相乗的にテロメラーゼの活性を抑制した。以上のことから、δ-T3 の抗癌作用に対して FA は相乗効果を発揮することが明らかになった。

[1] T. Miyazawa et al., J. Nutr. Biochem., 20, 79-86 (2009)
[2] T. Eitsuka et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., in press
[3] T. Eitsuka et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 348, 170-175 (2006)

Tocotrienol, Ferulic acid, Synergistic effect

講演番号：4F45a06
講演日時、会場：3 月 29 日 10:05～ F 校舎 45 会場

酵母スクリーニング系を用いた benzyl isothiocyanate のがん予防機構解明

Elucidation of the mechanism of cancer prevention by benzyl isothiocyanate using yeast screening system

○安部 奈緒美[1,2]、國末 成美[1]、宗正 晋太郎[1]、村田 芳行[1]、佐藤 あやの[3]、守屋 央朗[4]、中村 宜督[1]([1]岡山大院・環境生命、[2]学振特別研究員、[3]岡山大院・自然科学、[4]岡山大・異分野コア)
○Naomi ABE[1,2], Narumi KUNISUE[1], Shintaro MUNEMASA[1], Yoshiyuki MURATA[1], Ayano SATOH[3], Hisao MIRIYA[4], Yoshimasa NAKAMURA[1] ([1]Grad. Sch. of Environ. & Life Sci., Okayama Univ., [2]JSPS Research Fellow, [3]Grad. Sch. of Nat. Sci., Okayama Univ., [4]Res. Core for Interdiscip. Sci., Okayama Univ.)

ベンジルイソチオシアネート（BITC）は、主にパパイヤやクレソンに由来する食品成分であり、がん予防剤として期待されている。BITC による腫瘍形成の阻害には、がん細胞の増殖阻害が重要であると考えられているが、そのメカニズムについては未だ不明な点が多い。出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は、動物細胞に近いという点で分裂酵母よりは劣るものの、高い形質転換能と相同組換え効率から遺伝子操作が極めて容易である。また、全ゲノム塩基配列の解読が終了し、ヒトと同様の細胞分裂や DNA 修復の機構を持つことから、増殖阻害作用に関わる薬剤標的を探索するためのモデル生物として適していると考えた。そこで本研究では、genome-wide multi-copy plasmid collection が導入された出芽酵母を用いて、BITC 耐性に貢献する遺伝子の同定を試みた。さらに、ヒト大腸がん細胞株を用いて、同定した BITC 耐性遺伝子の細胞増殖阻害作用におけるヒトでの役割を調査した。

酵母細胞がもつ全遺伝子を網羅的に過剰発現した酵母を用いてスクリーニングを行った結果、動原体構成タンパク質の一つをコードする *MTW1* を含む 12 の遺伝子を、BITC 耐性に貢献する遺伝子の候補として同定した。Mtw1 のヒトホモログである Mis12 のタンパク質発現は、ヒト大腸がん由来 HCT-116 細胞において BITC 処理により下方調節され、その機構としてプロテアソームの寄与が示唆された。さらに、RNA 干渉によって HCT-116 細胞の Mis12 をノックダウンしたところ、G_2/M 期での細胞周期停止が誘導され、その結果として細胞増殖が阻害された。以上の結果から、酵母 Mtw1 のヒトホモログである Mis12 が、ヒト大腸がん細胞においても BITC による細胞増殖調節において重要な役割を果たすことが示唆された。

isothiocyanate, cancer, yeast

講演番号：4F45a07
講演日時、会場：3 月 29 日 10:16～ F 校舎 45 会場

Crithmum maritimum 抽出物のメラニン合成促進作用
Melanogenesis stimulatory effect of *Crithmum maritimum* extract
○畑岡 薫乃[1]、VILLAREAL Myra[2,3]、礒田 博子[2,3] ([1]筑波大生命環境、[2]筑波大生命環境系、[3]筑波大北アフリカ研究センター)
○Yukino HATAOKA[1], Myra VILLAREAL[2,3], Hiroko ISODA[2,3] ([1]School of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba, [2]Faculty of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba, [3]ARENA)

【目的】
皮膚や毛髪の色素であるメラニンは、紫外線を吸収することで細胞や遺伝子の損傷を回避する役割を持つ。一方、メラニン合成制御に異常が起こると、白斑や白髪といった症状が現れる。これらの改善にはメラニン合成を促進させる処方が有効である。本研究では、伝承薬効を有する地中海アロマ薬用植物である *Crithmum maritimum* (CM) に着目した。CM は、乾燥地に生育することから、紫外線等の環境ストレスに対抗する多くの機能性物質を有すると考えられる。本研究では、CM 抽出物がメラニン合成に及ぼす影響及び作用メカニズムについて、メラニン産生モデル細胞であるマウス由来悪性黒色腫 (B16 細胞) を用いて評価を行った。
【方法】
CM の葉より熱水抽出を行い､その抽出物をメラニン産生系のモデル細胞である B16 細胞に処理した。その後、細胞内メラニン産生量を定量し、CM 抽出物がメラニン合成に及ぼす影響を評価した。次いで、CM によるメラニン合成メカニズムについて、Real-Time PCR、Western Blotting によってメラニン合成経路に関わる遺伝子、タンパク質及びリン酸化タンパク質の定量を行った。
【結果・考察】
CM 抽出物を B16 細胞に処理することによって、細胞内メラニン産生量の有意な増加が見られたことから、CM 成分によるメラニン合成促進作用を見出した。また、メラニン合成に関わる酵素であるチロシナーゼ、ドーパクロムトートメラーゼの発現と、これらの転写因子である MITF の発現増加が見られた。さらに、上流の MAPK 経路の制御を確認した。
以上のことから、CM によるメラニン合成促進作用は主に MAPK 経路の制御を介し、MITF の発現を増加させることで、チロシナーゼ、ドーパクロムトートメラーゼなどのメラニン合成酵素の発現を増加させることによるものでことが示唆された。

Crithmum maritimum, melanin, tyrosinase

講演番号：4F45a08
講演日時、会場：3 月 29 日 10:27～ F 校舎 45 会場

酵素消化低分子化フコイダン抽出物によるガン細胞の細胞表面糖鎖構造変化の誘導

Induction of change of the sugar chains on cancer cell surface by enzymatically digested low-molecular weight fucoidan extract

○林 寛大[1]、片山 貴博[1]、杉本 昌紀[2]、江藤 博[3]、白畑 實隆[1,2,4]、照屋 輝一郎[1,2,4]（[1]九大院シス生、[2]九大院生資環、[3]第一産業、[4]九大院農院）

○ Kanta HAYASHI[1], Takahiro Katayama[1], Masanori Sugimoto[2], Hiroshi Eto[3], Sanetaka Shirahata[1,2,4], Kiichiro Teruya[1,2,4] ([1]Grad. Sch. Sys. Life Sci., Kyushu Univ., [2]Grad. Sch. Biores. Bioenv. Sci., Kyushu Univ., [3]Daiichi Sangyo Co. Ltd., [4]Fac. Agr., Kyushu Univ.)

【背景及び目的】

フコイダンとはコンブやワカメ、モズクなどの褐藻由来の硫酸化フコースを多量に含む多糖類である。当研究室ではグリコシダーゼ処理で低分子化させた酵素消化低分子化フコイダン抽出物(LMF)を使用して、ガン細胞に対する細胞死誘導効果について検討を行ってきた。本研究では、LMF がガン細胞表面糖鎖に及ぼす効果に着目した。糖鎖構造の変化が多くの疾病に関与していることが知られており、ガンの転移能の獲得も細胞表面の *N*-結合型複合糖鎖の枝分かれの増加に起因すると考えられている。本研究では、LMF がガン細胞表面糖鎖構造に及ぼす効果を解析することで、糖鎖構造の変化を通じた抗腫瘍効果の解明を目的とした。

【材料及び方法】

LMF は第一産業株式会社から提供されたトンガ王国産モズクより調製したものを使用した。ヒト線維肉腫由来細胞株 HT1080、ヒト肺腺ガン由来細胞株 A549、正常ヒト線維芽細胞 TIG-1 を LMF 添加 MEM 培地で培養し、各濃度 LMF 処理によるガン細胞死誘導効果を IN Cell Analyzer 1000 を用いて評価し、細胞表面糖鎖構造の変化を、IN Cell Analyzer 1000、ウェスタンブロット-レクチン染色を用いて評価した。LMF 処理による細胞表面糖鎖への影響は、2 種のレクチン、Concanavalin A (Con A) と Phytohemagglutinin-L4 (PHA-L4) を用いて解析した。

【結果と考察】

HT1080 及び A549 細胞では、各濃度の LMF 処理により顕著な濃度依存的な細胞数の減少が確認された。また、細胞表面糖鎖においては、分岐鎖である β-1,6-GlcNAc に特異的に結合する PHA-L4 レクチンの結合量が LMF 未処理に比べて減少し、反対に糖鎖のマンノース特異的に結合する Con A が上昇することが確認された。これは LMF がガン細胞の β-1,6-GlcNAc 分岐鎖を減少させ、マンノース部分を露出させたと考えられた。一方で、正常細胞 TIG-1 では、LMF 処理によって細胞死は誘導されず、細胞表面糖鎖の発現量変化もガン細胞と異なる結果となった。以上のことから LMF がガン細胞の細胞形質の変化を通して、細胞表面糖鎖変化を誘導していると考えられた。

Cancer cell, Fucoidan

講演番号：4F45a09
講演日時、会場：3 月 29 日 10:38～ F 校舎 45 会場

酵素消化低分子化フコイダン抽出物と抗ガン剤との併用による抗腫瘍作用増強効果の評価

Combined use of enzymatically digested low-molecular weight fucoidan extract and an anti-cancer drug enhance their anti-tumor effects

○加治佐 真吾[1]、後藤 梨々子[2]、江藤 博[3]、吉田 年宏[4]、白畑 實隆[1,2,5]、照屋 輝一郎[1,2,5] ([1]九大院生資環、[2]九大院シス生、[3]第一産業(株)、[4]吉田医院、[5]九大院農院)

○Shingo Kajisa[1], Ririko Gotou[2], Hiroshi Eto[3], Toshihiro Yoshida[4], Sanetaka Shirahata[1,2,5], Kiitirou Teruya[1,2,5] ([1]Grad.Sch.Biores.Bioenv.Sci.,Kyushu Univ, [2]Grad. Sch. Sys. Life Sci., Kyushu Univ, [3]Daiichi Sangyo Co.Ltd, [4]Yoshida clinic, [5]Fac.Agr.,Kyushu Univ)

【目的】

褐藻類の粘質物に多く含まれる多糖類フコイダンはアポトーシス誘導作用、血管新生抑制作用、免疫賦活作用などを持ち、ガン治療に有効であると言われている。また、現在の抗ガン剤治療では薬剤耐性や副作用が問題となっており、それをどう解決するかが課題となっている。そこで本研究では酵素消化低分子化フコイダン抽出物（以下 LMF）と抗ガン剤とを併用した時の抗腫瘍増強効果と、抗ガン剤由来の細胞死からの正常細胞保護効果を検討することを目的とした。

【方法】

LMF は第一産業株式会社より提供されたトンガ王国産モズクから調製したものを使用した。抗ガン剤は、ガン治療で多用されている 5-Fluorouracil (以下、5-FU)と Carboplatin（以下、CBDCA）を使用した。細胞はヒト線維肉腫細胞株 HT1080 及びヒト肺腺ガン細胞株 A549、正常ヒト線維芽細胞 TIG-1 を使用した。LMF、5-FU、CBDCA をそれぞれ単独で各種細胞に処理した場合と、LMF と 5-FU または CBDCA を併用処理した際の各細胞の呼吸活性を WST-1 法により測定し細胞生存能力を検討した。また、Hoechst 33342 染色後に IN Cell Analyzer 1000 を用いて細胞数を測定し、細胞死誘導効果を検討した。

【結果・考察】

HT1080 細胞において LMF と 5-FU、CBDCA はそれぞれ単独で呼吸活性の低下と細胞生存率の低下を示していたが、併用することによりその効果が増強された。A549 細胞において LMF は単独で弱い抗腫瘍効果が確認され、5-FU や CBDCA と併用するとそれぞれの単独処理よりもより高い抗腫瘍効果が見られた。TIG-1 細胞において LMF 単独処理を行うと呼吸活性及び細胞数の変化はほぼ見られず、LMF の正常細胞に対する細胞毒性は低いことが確認された。また、LMF を 5-FU 及び CBDCA と併用すると、5-FU 及び CBDCA 単独処理の場合よりも呼吸活性と細胞生存率が上昇した。以上のことから LMF はガン細胞に対して抗ガン剤の細胞死誘導を増強させるだけでなく、正常細胞に対しては逆に細胞毒性軽減作用を持つ可能性が示唆された。

fucoidan, anti-cancer

講演番号：4F45a10
講演日時、会場：3 月 29 日 10:49～ F 校舎 45 会場

酵素消化低分子化フコイダン抽出物とナタ豆抽出物との併用による抗腫瘍作用増強効果

Combined use of enzymatically digested low-molecular weight fucoidan extract and sword bean extract enhance their anti-tumor effects

○宮本 菜摘[1]、山本 諭司[2]、江藤 博[3]、白畑 實隆[1,2,4]、照屋 輝一郎[1,2,4]（[1]九大院生資環、[2]九大院シス生、[3]第一産業(株)、[4]九大院農院）
○Natsumi MIYAMOTO[1], Satoshi YAMAMOTO[2], Hiroshi ETO[3], Sanetaka SHIRAHATA[1,2,4], Kiichiro TERUYA[1,2,4] ([1]Grad. Sch. Biores. Bioenv. Sci., Kyushu Univ., [2]Grad. Sch. Sys. Life Sci., Kyushu Univ., [3]Daiichi Sangyo Co. Ltd., [4]Fac. Agr., Kyushu Univ.)

[目的]

褐藻由来の硫酸化多糖類フコイダンは、L-フコースを主成分とする多糖類である。フコイダンは免疫賦活効果、血管新生抑制効果、アポトーシス誘導効果を介した抗ガン作用が報告されている。日本人の死亡原因 1 位を占めるガンの治療において、近年代替医療法への関心が高まると同時にフコイダンのガンに対するこれらの効果が注目されている。本研究ではトンガ王国産モズクを原料とした酵素消化低分子化フコイダン抽出物（Low Molecular Weight Fucoidan Extract, LMF）を使用した。これまでに LMF とレクチンの一種である Concanavalin A (Con A) の併用処理により、ヒト線維肉腫由来細胞株 HT1080 に対して顕著な細胞死誘導効果をもたらすことが確認されている。そこで、本研究では LMF 処理時に Con A を含有するナタ豆抽出物を併用することで、LMF の抗腫瘍効果を増強することができるかどうかの検討を行った。

[方法]

10% FBS 添加 MEM 培地中で、細胞を 24 時間前培養後、各濃度の LMF やナタ豆抽出物を含む培地で 48 時間処理を行った。処理後、WST-1/1-Methoxy PMS 溶液を添加した培地に交換し、WST-1 発色後、マイクロプレートリーダーを用いて波長 450 nm の吸光度を測定した。その後細胞を 10%ホルマリンで固定し、Hoechst 33342 で核染色を行った後、蛍光プレートリーダーを用いて Hoechst 33342 の蛍光強度を測定した。さらに、IN Cell Analyzer 1000 を用いて細胞数解析を行った。

[結果・考察]

HT1080 細胞において、LMF を単独で処理した場合では濃度依存的な細胞死誘導効果が確認され、ナタ豆抽出物を単独で添加した場合でも濃度依存的な細胞死誘導効果が確認された。さらに LMF とナタ豆抽出物を併用処理した場合ではナタ豆抽出物の濃度依存的な細胞死誘導効果が確認された。ヒト肺腺ガン由来細胞株 A549 においては、LMF とナタ豆抽出物を単独で処理した場合よりも、併用処理した場合において強い細胞死誘導効果が確認された。ヒト正常線維芽細胞 TIG-1 においてはガン細胞で細胞死誘導効果が見られた条件において、顕著な細胞死誘導効果は確認されなかった。

fucoidan, anti-tumor, sword bean

講演番号：4F45a11
講演日時、会場：3 月 29 日 11:10～ F 校舎 45 会場

1-デオキシノジリマイシンは大腸がんを予防する

1-Deoxynojirimycin prevents the colon cancer

○鄂 爽[1]、木村 俊之[2]、都築 毅[1] ([1]東北大院農、[2]農研機構)
○Shuang E[1], Toshiyuki Kimura[2], Tsuyosi Tsuduki[1] ([1]Tohoku Univ., [2]NARO)

【目的】
がんの患者数および死亡数は、世界中で日々増加している。日本では、1960 年以降がんによる死亡率が増加し続け、現在は全死因の約 30%を占めている。がんの中でも、近年食の欧米化に伴い大腸がんの発症率と死亡率は年々増加している。がんの発症には長い年月の環境要因が大きく関わっているため、食品を利用した予防法は有効である。そこで本研究では、有効ながん予防法の確立を目指して、カロリー制限に着目して検討した。初めに、カロリー制限食が大腸がんに与える効果をマウスを用いて確認した。次に、最近我々がカロリー制限様成分として見出した 1-デオキシノジリマイシン（DNJ）の大腸がんに与える影響をマウスを用いて検討した。

【方法】
4 週齢、雄性の ICR マウスを用い、一週間の予備飼育後、アゾキシメタンを大腸がん誘発剤としてマウスの腹部に注射し、一週間後、さらに硫酸デキストランナトリウムを腸炎誘発剤として水に混ぜて、飲水させた。初めに、マウスをカロリー制限食もしくは普通食で飼育した。次に、マウスを DNJ 含有食（高濃度 DNJ、低濃度 DNJ、DNJ を含まない食事）で飼育した。マウスは 21 週齢において屠殺し、大腸に対してがんや炎症の程度を評価した。

【結果】
大腸がんを誘発したマウスは、未処理のもと比べて、がんの発生率や炎症スコアが有意に高値であった。カロリー制限群はがんの発生率や炎症スコアが低値であった。これにより、カロリー制限食はがん予防に効果的であることが確認された。次に、カロリー制限様成分である DNJ において検討したところ、がんの発生率や炎症スコアは DNJ の用量依存的に低値となった。このことから DNJ は、カロリー制限食と同様に、大腸がん予防効果を持つことが明らかとなった。

calorie restriction, 1- deoxynojirimycin, colon cancer

講演番号：4F45a12
講演日時、会場：3 月 29 日 11:21～ F 校舎 45 会場

スフィンゴミエリンによる肝癌細胞死誘導とその機構解析
Induction of hepatoma cell death by exogenous sphingomyelin
○山田 佳奈、高宮 奈津子、三浦 豊（東京農工大学・大学院・応用生命化学）
○Kana YAMADA, Natsuko TAKAMIYA, Yutaka MIURA (Department of Applied Biological Chemistry, Tokyo University of Agriculture and Technology)

【目的】スフィンゴミエリン(SPM)は生体膜の構成成分の一つであり、食品中では乳や卵に多く含有されている。しかし SPM の生理作用に関してはまだ明らかになっていない点も多い。すでに我々は、乳や卵由来の SPM により、肝癌細胞特異的に細胞死が誘導されることを見出している。本研究ではラット腹水肝癌細胞をモデルとして、SPM による細胞死誘導機構を解析すると同時に、肝癌移植ラットを用い生体内での SPM の作用を検討した。
【方法】ラット肝癌細胞 AH109A 細胞をモデル肝癌細胞として用いた。SPM は培地に懸濁し、超音波処理によりミセル化した後に培地に添加し、SPM 添加培地で AH109A 細胞を 48 時間培養し、あらかじめ SPM を細胞に取り込ませた後に細胞増殖測定等の実験を行った。細胞増殖は WST-8 法にて測定し、細胞死は Annexin V/PI 二重染色法で検討した。誘導された細胞死の機構を解析するため、各種阻害剤（カスパーゼ阻害剤、ネクロプトーシス阻害剤等）を用いる一方で、細胞内活性酸素量やミトコンドリア膜電位を測定した。細胞内のカスパーゼ活性化状態は Western Blot 法により検討した。また、AH109A 細胞を Donryu 系雄ラットに腹腔内注射し、約 10 日後に腹水の貯留を確認した後、SPM を腹腔内に投与し、投与 48 時間後の腹水量、腹水中の細胞生存率を測定した。
【結果と考察】あらかじめ SPM を取り込ませた AH109A 細胞は対照群に比べて、細胞増殖が顕著に抑制され、細胞死が誘導されていた。その際ミトコンドリア膜電位の低下、細胞内活性酸素量の増加、Annexin V 陽性細胞の増加が観察されたことから、アポトーシス様の細胞死が誘導されている可能性が考えられた。そこでカスパーゼ阻害剤を作用させたところ、細胞増殖抑制作用が消失した。しかし、カスパーゼ 3 の活性化は見られず、またネクロプトーシス阻害剤により細胞死が部分的に抑制される傾向も観察され、通常のアポトーシスとは一部異なる細胞死が誘導されている可能性も示唆された。また SPM は腹水中の AH109A の生存率を有意に低下させ、生体内においてもその作用が発揮されることが明らかとなった。
以上の結果より、SPM は肝癌細胞に対して細胞死を誘導すること、誘導される細胞死は通常のアポトーシスとは異なる経路で起きている可能性があること、SPM の細胞死誘導作用は生体内でも発揮されうることが明らかとなった。現在 SPM により誘導される細胞死についてさらに詳細な検討を行っている。

hepatoma, sphingomyelin, cell death

講演番号：4F45a13
講演日時、会場：3 月 29 日 11:32～ F 校舎 45 会場

原子状水素によるガン細胞死誘導機構の解析

Analysis of hydrogen radical-induced cancer cell death

○黒田 敦子[1]、中島 麻美[2]、金城 智也[3]、濱崎 武記[3]、樺山 繁[4]、照屋 輝一郎[1,2,3]、白畑 實隆[1,2,3]
([1]九大院生資環、[2]九大院シス生、[3]九大院農院、[4]日本トリム)
○Atsuko Kuroda[1], Asami Nakashima[2], Tomoya Kinjo[3], Takeki Hamasaki[3], Shigeru Kabayama[4], Kiichiro Teruya[1,2,3], Sanetaka Shirahata[1,2,3] ([1]Grad. Sch. Biores. Bioenv. Sci., Kyushu Univ., [2]Grad. Sch. Sys. Life Sci., Kyushu Univ., [3]Fac. Agr., Kyushu Univ., [4]Nihon Trim Co. Ltd.)

[背景・目的]

電解還元水は水の電気分解で得られ、多量な分子状水素と電極由来の微量の白金ナノ粒子を含む。白金ナノ粒子はスーパーオキシドラジカル、過酸化水素、ヒドロキシラジカルなどの活性酸素を消去する抗酸化剤として作用する報告がある。また分子状水素は酸化ストレス抑制効果を示す新しい抗酸化物質として注目されている。溶液中に白金ナノ粒子及び水素分子が共存すると白金ナノ粒子表面の触媒作用により水素分子の共有結合が弱くなる、または解離することで一部ラジカル化し水素原子供与様反応を水素分子が起こすようになる。これまで我々はこの原子状水素が還元剤であるにもかかわらず強いガン細胞死誘導効果を示すことを明らかにしている。また、Flow cytometry による解析から、白金ナノ粒子及び水素の併用処理によって白金ナノ粒子濃度依存的な Sub-G1 細胞の増加が認められ、アポトーシス誘導が確認された。そのため本実験では小胞体ストレスと、デスレセプター経路に関与している可能性のあるアポトーシス関連因子についての探索を行うために、Western blotting などを用いて解析を行った。

[方法]

白金ナノ粒子は、クエン酸還元法によってヘキサクロロ白金を還元することで合成した。細胞はヒト骨髄性白血病細胞株由来 HL60 細胞、マウス大腸ガン細胞株由来 Colon26 細胞及びマウス肉腫細胞株由来 Sarcoma180 細胞を用いた。白金ナノ粒子を 2 時間処理した後、PBS で洗浄し、水素ガスインキュベーター（75% H_2, 20% O_2, 5% CO_2）及び対照として、窒素ガスインキュベーター（75% N_2, 20% O_2, 5% CO_2）中で各時間培養した細胞からタンパク質を回収し、Western blotting にてアポトーシス関連タンパク質の解析を行った。

[結果・考察]

Western blotting によるカスパーゼ経路活性化の解析を行った結果 Caspase-3, -7 及び Caspase-8、Caspase-9 の活性化が認められた。また、小胞体ストレス細胞死誘導経路に関与する小胞体分子シャペロン(BiP)及び C-EBP Homologous Protein(CHOP)の発現に変化は見られなかったことから、水素ラジカルによるアポトーシス誘導は小胞体ストレス経由ではなくミトコンドリア経路を介していることが示唆された。また、小胞体ストレス経路を介していないことから水素ラジカルによるタンパク変性等の影響はないと推測された。

platinum nanoparticles, hydrogen, apoptosis

講演番号：4F45a14
講演日時、会場：3 月 29 日 11:43～ F 校舎 45 会場

原子状水素を利用した抗がん治療法の開発を目的とした検討

Development of new cancer therapeutics method using hydrogen radical

○中島 麻美[1]、黒田 敦子[2]、金城 智也[3]、濱崎 武記[3]、樺山 繁[4]、照屋 輝一郎[1,2,3]、白畑 實隆[1,2,3]
([1]九大院シス生、[2]九大院生資環、[3]九大院農院、[4]日本トリム)
○Asami Nakashima[1], Atsuko Kuroda[2], Tomoya Kinjo[3], Takeki Hamasaki[3], Shigeru Kabayama[4], Kiichiro Teruya[1,2,3], Sanetaka Shirahata[1,2,3] ([1]Grad. Sch. Sys. Life Sci.,Kyushu Univ., [2]Grad. Sch. Biores. Bioenv Sci.,Kyushu Univ., [3]Fac. Agr., Kyushu Univ., [4]Nihon Trim Co. Ltd.)

[背景・目的]

水の電気分解により得られる電解還元水を日常的に飲用することで、ガンや糖尿病、動脈硬化症、神経変性疾患、アレルギー性疾患などの酸化ストレス関連疾患が改善されることが報告されている。電解還元水には多量の水素分子及び微量の電極由来の白金ナノ粒子が含まれている。分子状水素は近年様々な酸化ストレス関連疾患モデル動物において酸化ストレス抑制効果を示す新しい抗酸化物質として注目されている。また白金ナノ粒子はスーパーオキシドラジカル、過酸化水素、ヒドロキシラジカルを消去する抗酸化剤として作用することも報告されている。一方、分子状水素と白金ナノ粒子が共存した場合には、白金ナノ粒子表面で原子状水素が生成し、より強い抗酸化性を示すことが明らかとなっている。しかし原子状水素の生理機能についてはまだ十分明らかにされていない。

これまでの研究により、溶存水素存在下で白金ナノ粒子を処理した場合、ヒト骨髄性白血病由来細胞株 HL60 に強い細胞死が誘導されたが、正常細胞であるヒト末梢血単核球 PBMC においてはほとんど細胞死が確認されなかった。これは白金ナノ粒子の取り込み能力の違いや原子状水素に対する感受性細胞種によって異なると推測される。

水素分子は分子径が小さいため、容易に体内へ拡散することができる。そこで、我々は白金ナノ粒子を腫瘍に到達させることができれば、新しいがん治療法として利用できるのではないかと考えた。

そこで、本研究では水素存在下で白金ナノ粒子を投与したマウスがどのような影響を及ぼすのか、また実際にマウスにガンを担持させ、その抗がん効果が確認できるかどうかの検証を行った。

[方法]

白金ナノ粒子の合成にはヘキサクロロ白金塩を用い、クエン酸ナトリウムにより還元することで作製した。HL60 細胞は、白金ナノ粒子で 2 時間処理した後、水素ガスインキュベーター（75% H_2、20% O_2、5% CO_2）中で培養した。マウスは 4 週齢のメス ICR マウスを用い、腫瘍は 1×10^6 cells の Sarcoma180 細胞と colon-26 細胞を皮下に移植することで形成させた。担癌マウスをインキュベータ内で飼育し、白金ナノ粒子処理後経時的に体重、腫瘍径を測定した。

[結果・考察]

インキュベータ内で 2 週間飼育したマウスの経過観察を行ったが、対照と比較して体重変化などの外観観察および生化学データに変化は見られなかった。また、インキュベータ内で白金ナノ粒子を投与したマウスにおいて有意な腫瘍の減少が見られた。今後は投与方法を検討し、より効果的な腫瘍抑制法を確立させたいと考えている。

platinum nanoparticles, hydrogen, apoptosis

講演番号：4F45p02
講演日時、会場：3 月 29 日 14:11～ F 校舎 45 会場

米胚乳タンパク質の血清尿酸値低下効果（第 2 報）

The lowering effect of rice endosperm protein on serum urate level (second report)

○近藤 葉月[1]、樋口 裕樹[1]、藤井 幹夫[1]、丸山 健太郎[1]、北原 祐樹[2]、山本 哲郎[2]、齋藤 次郎[3]、近藤 澄夫[4]、門脇 基二[5]、細島 康宏[6]、斎藤 亮彦[6]([1]亀田製菓（株）、[2]（株）TTC、[3]メディカルステーションクリニック、[4]医療法人健昌会福島健康管理センター、[5]新潟大・農、[6]新潟大・医)

○Hazuki KONDO[1], Yuki HIGUCHI[1], Mikio FUJII[1], Kentaro MARUYAMA[1], Yuki KITAHARA[2], Tetsuro YAMAMOTO[2], Jiro SAITO[3], Sumio KONDO[4], Motoni KADOWAKI[5], Michihiro HOSOJIMA[6], Akihiko SAITO[6] ([1]Kameda Seika Co.,Ltd., [2]TTC Co.,Ltd., [3]Medical Station Clinic, [4]Medical Corporation Kenshokai, Fukushima Healthcare Center, [5]Agr. Niigata Univ., [6]Med. Niigata Univ.)

【目的】植物性タンパク質には、動物性タンパク質にはない生理機能が知られている。我々はこれまでに、米胚乳より抽出したタンパク質（米胚乳タンパク質）について軽度肥満者や透析患者を対象とした試験で HDL-コレステロールの上昇、血清尿酸値の低下、炎症性ケモカイン MCP-1 の低下などの機能を確認している。本研究では、高尿酸血症の成人男性を対象とした試験により米胚乳タンパク質摂取による血清尿酸値低下効果を調べた。

【方法】高尿酸血症の成人男性で合併症を持たない者を試験の対象とした。米胚乳タンパク質の摂取量は 1 日あたり 5.0g のアドオン形式とした。試験は 2 回実施し、両試験とも open-test とした。得られたデータの統計解析はベースライン値を対照とした対応のある t 検定で行った。試験 1：血清尿酸値が 6.0 以上 8.0mg/dL 未満の 8 人を対象として 4 週間の試験を行った。試験開始 0、2、4 週目に採血および採尿を行い、生化学検査を行った。試験 2：血清尿酸値が 7.0 以上 9.0mg/dL 未満の 13 人を対象として 12 週間の試験を行った。試験開始 0、4、8、12 週目に採血および採尿を行い、生化学検査を行った。

【結果と考察】試験 1：2、4 週間目ともに血清尿酸値の平均値は下がったものの、有意な変化は見られなかった。試験 2： 4、8 週間目の血清尿酸値の平均値は下がったが、12 週間目の平均値はむしろ上昇した。いずれの時点のデータともにベースラインの血清尿酸値と有意な差はなかった。4 週間目の測定値にスミルノフ・グラブス検定で外れ値と見なされるデータがあったため、これに対応する被験者のデータを除外した後の血清尿酸値の平均値をベースラインのデータと比較したところ低下傾向が認められた($P<0.1$)。また、血清尿酸値のベースラインが上位 6 人のグループと下位 6 人のグループで層別解析を行ったところ、上位 6 人のグループでは 4、8 週間目ともに血清尿酸値が有意に低下していた（$P<0.05$)。尿中尿酸値のベースラインが上位 6 人のグループと下位 6 人のグループで層別解析を行ったところ、上位 6 人のグループでは 4、8 週間目ともに血清尿酸値が有意に低下していた（$P<0.05$)。12 週間目における血清尿酸値の上昇は、血清クレアチニン値が 12 週間目にて有意に上昇していたこと、試験 12 週間目が夏季であったことより、夏季の発汗による血清尿酸の濃縮などが理由であると考えられた。これらの結果から、米胚乳タンパク質の 1 日 5.0g の摂取は血清尿酸値を低下させる可能性が示唆された。

rice endosperm protein, uric acid, clinical trial

講演番号：4F45p03
講演日時、会場：3 月 29 日 14:22～ F 校舎 45 会場

リジンとオルニチンは消化管運動を促進するが、逆にアルギニンは抑制する

Lysine and ornithine stimulate but conversely arginine suppresses gastrointestinal motility

○中戸 絢也[1]、ホー イーイン[1]、金子 賢太朗[1]、水重 貴文[1,2]、金本 龍平[1]、大日向 耕作[1] ([1]京大農、[2]京大学際融合教育研究推進センター・生理化学研究ユニット)
○ Junya NAKATO[1], Yee Yin HO[1], Kentaro KANEKO[1], Takafumi MIZUSHIGE[1,2], Ryuhei KANAMOTO[1], Kousaku OHINATA[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Research Unit for Physiological Chemistry, C-PIER, Kyoto Univ.)

【目的】消化管は種々の栄養素を認識する器官であり、栄養素自体がリガンドとして作用する場合がある。今回我々は、塩基性アミノ酸 L-Lys、L-Orn、L-Arg と腸管との相互作用に着目した。小腸の消化管運動に対する作用を検討したところ、Lys と Orn は消化管運動を促進する一方で、Arg は抑制することを見出した。さらに、Lys と Orn が、Arg とは異なるメカニズムを介して作用しているのか否かを検討した。
【方法】雄性 ddY マウスに塩基性アミノ酸を経口投与し、30 分後に Evans Blue で着色した 1% CMC 溶液を経口投与した。その 5 分後に小腸を摘出し、色素の移動距離によって消化管運動を評価した。
【結果および考察】Lys と Orn の経口投与により、用量依存的に色素の移動距離が増加したことから、Lys と Orn は消化管運動促進作用を示すことが判明した。対照的に、Arg の経口投与により、用量依存的に色素の移動距離が減少したことから、Arg は消化管運動抑制作用を示すことが判明した。消化管運動の促進作用を仲介するメディエーターとして、アセチルコリンおよび一酸化窒素(NO)が知られている。そこで、ムスカリン性アセチルコリン受容体アンタゴニスト Atropine または NO 合成酵素阻害剤 L-NAME を、単独での作用が無い用量で検討した。その結果、Lys と Orn の消化管運動促進作用が阻害された。したがって、Lys と Orn の消化管運動促進作用は、アセチルコリン－NO 系の活性化を介していると考えられる。一方で、Arg の消化管運動抑制作用は Atropine の投与で阻害されなかったことから、Lys や Orn とは異なる認識機構が存在する可能性が示唆された。また、Arg の作用は、消化管運動を抑制するホルモンであるコレシストキニンのアンタゴニスト Lorglumide では阻害されなかったことから、コレシストキニンを介したものではないと考えられた。なお現在、消化管運動と関係が深い摂食調節についても、塩基性アミノ酸の作用を検討中である。
【結論】Lys と Orn はアセチルコリン－NO 系を介して消化管運動を促進することを見出した。対照的に Arg は消化管運動を抑制したが、この作用はアセチルコリン－NO 系から独立しており、腸管には Lys/Orn と Arg の間で異なる認識機構が存在する可能性が示唆された。

basic amino acid, gastrointestinal motility, acetylcholine-no system

講演番号：4F45p04
講演日時、会場：3 月 29 日 14:33～ F 校舎 45 会場

難吸収性ポリフェノールの消化管における認識機構 1.－知覚神経除去モデルラット脊髄後根神経節の遺伝子発現解析―

Resistant polyphenols recognize the gut system - genome analysis of dorsal spinal root ganglions in sensory denevated model rats

○渡辺 尚貴[1]、安岡 顕人[2]、稲川 広大[1]、神尾 直哉[1]、江部 力彦[1]、鈴木 拓真[1]、阿部 啓子[3]、越阪部 奈緒美[1] ([1]芝工大シス理工、[2]公益財団法人神奈川科学技術アカデミー(KAST)、[3]東大院農学生科)

○Naoki Watanabe[1], Akihito Yasuoka[2], Kodai Inagawa[1], Naoya Kamio[1], Rikihiko Ebe[1], Takuma Suzuki[1], Keiko Abe[3], Naomi Osakabe[1] ([1]Shibaura Institute of Technology., [2]KAST RiSE Lab., [3]Tokyo Univ.)

ポリフェノール摂取は心血管系疾患を予防することが報告されているが、その作用機序は未解明である。未解明の理由としては、ポリフェノール類は一般に生体利用率が低いことにある。我々は生体利用率が 1%以下である難吸収性ポリフェノールに着目し、投与直後から循環刺激作用が見られること、またエネルギー代謝亢進作用を示すことを明らかにしてきた。今回、神経毒処置により知覚神経を除去したモデル動物（除知覚モデルラット）を用いて同様の検討を実施するとともに、その作用機序解明のため正常および除知覚モデルラットの脊髄後神経節のトランスクリプトーム解析を実施したので報告する。ペントバルビタール麻酔下において、2 日間にわたって Wistar 系雄性ラット背部皮下に気管支拡張剤である salbutamol(0.6mg/kg)前投与後に、capsaicin を総量として 125mg/kg 投与した。これらの動物に、2 週間後に 0.1mg/ml の capsaicin 溶液を点眼し、wiping が消失したことを確認し、これを除知覚モデルラットとした。難吸収性ポリフェノールである flavan-3-ols を 10mg/kg 胃内に強制単回投与した場合、直後から一過性の平均血圧や心拍数の上昇が認められ、60 分後には大動脈の eNOS のリン酸化が起こるが [1)]、これらの作用は除知覚モデルラットにおいては消失した。また、同様に強制単回投与 20 時間のエネルギー代謝量は有意に亢進するが [2)]、この作用も消失する。一方、0.2% flavan-3-ols 含有飼料をラットに 2 週間摂食させた場合、平均血圧の有意な低下、大動脈の eNOS 発現量の増大、呼吸交換比の有意な減少が認められたが、これらの作用は除知覚モデルラットにおいては全て消失した。これらのことから flavan-3-ols が消化管知覚神経に認識されるのではないかと考え、正常ラットと除知覚モデルラットの脊髄後根神経節（T8-T12）の総 RNA を抽出し、そのトランスクリプトーム解析を実施した。抽出した RNA を用いたシーケンスライブラリーの作製は Tru Seq RNA Sample preparation Kit v2(イルミナ社製)用いて実施し、シーケンスの鋳型となるクラスターを形成させ、鋳型 DNA の塩基配列を取得した。シーケンスデータの解析は HiSeq システム（イルミナ社製）を用いて実施した。膜貫通型タンパク質に着目して解析したところ、正常ラットに比較して除知覚モデルラットで発現が 1/16 まで低下した遺伝子数は 736、 1/8 まで低下した遺伝子数は 457、1/4 まで低下した遺伝子数は 1141、1/2 まで低下した遺伝子数は 778 であった。今回は、flavan-3-ols 投与後の生理作用発現低下に関与する遺伝子群について報告する。

1) Inagawa et al. PLoS One. 2014 ;9(4):e94853, 2) Matsumura et al. PLoS One. 2014 ;9(11) :e112180.

【謝辞】 本研究は、総合科学技術・イノベーション会議の SIP（戦略的イノベーション創造プログラム）「次世代農林水産業創造技術」によって実施されました。

Polyphenol, Sensory nerve, Transcriptome

講演番号：4F45p05
講演日時、会場：3 月 29 日 14:44～ F 校舎 45 会場

食用菊抽出物の神経栄養因子様作用

Extract from chrysanthemum flowers induces neurite outgrowth and Erk1/2 in PC12 cells

○若生 豊（八戸工大）
○Yutaka WAKOU (Hachinohe Inst. Tech.)

【目的】

ストレスや高齢化により、精神疾患は増えており、医療計画にも追加され、成人病の一つとして位置づけられている。認知症や抑うつ症の病態や発症機構については、脳内モノアミン仮説だけではなく、神経細胞の傷害や酸化ストレスとの関連性が重視されている。ある種のフラボノイドは損傷した神経の突起伸長を促し神経修復能を有する可能性が示唆している。仁科等は延命楽品種の菊花フラボノイドが抗うつ作用を有する可能性を示唆している。食用の菊は約 60 種あり成分も異なっている。中でも青森県の「安房宮」と山形県の「延命楽」は代表的なものであり、今回は、安房宮種の菊花成分の神経栄養因子様作用について検討した。

【方法】

安房宮品種および延命楽品種の菊花メタノール抽出物を、ダイオードアレイ検出器を備えた HPLC で観察し、紫外スペクトル等より比較を行った。両品種のメタノール抽出および、溶媒分画、クロマトグラフィー等により分離した画分について抗酸化活性、ならびに PC12 細胞に対する神経栄養因子様作用を検討しその活性を比較した。抗酸化活性はスーパーオキシドラジカル消去活性を測定した。神経栄養因子様作用は PC12 細胞の神経突起伸長作用とウエスタンブロットと免疫染色により MAPK の ERK1/2 のリン酸化を測定することによって比較した。

【結果】

フォリン-デニス法により菊花のポリフェノールを比較したところ乾燥重量 1 g 当たり阿房宮と延命楽の品種では 1.57 mg および 2.95 mg であり約 2 倍含有比率が異なった。スーパーオキシドアニオン消去活性は安房宮品種で高かったが、ポリフェノール量当たりの比較では差は無かった。両品種のポリフェノール類の HPLC におけるピークの保持時間は、ほぼ一致していることから，組成は共通性が高いことが示されたが、スペクトル観察などより、安房宮品種ではクロロゲンおよびアピゲニンに類似のピークの面積比率が高く、延命楽品種ではルテオリンが主要なピークを形成する特徴を示し成分の組成比が大きく異なった。安房宮品種の菊花抽出物（ポリフェノール量 300 ng/ml）は延命楽品種と同様に PC12 細胞の神経突起伸長作用を示した。ERK1/2 のリン酸化活性を、ブロッティング膜上のバンドシグナルのデンシティーより比較した結果、抽出物重量では安房宮品種の方が強いデンシティーを示し、ポリフェノール相当量当たり比較でも高い傾向を示した。

chrysanthemum, flavonoid, neurotrophic factor

講演番号：4F45p06
講演日時、会場：3 月 29 日 15:05～ F 校舎 45 会場

AgRP 神経由来の神経ペプチドが脂質・糖質食の選択に与える影響
Effects of AgRP neuron-derived neuropeptides on high-fat / high-sugar diet selection in mice
○傅 欧、成川 真隆、三坂 巧、中島 健一朗（東大院農生科・応生化）
○ Ou FU, Masataka NARUKAWA, Takumi MISAKA, Kenichiro NAKAJIMA (Dept.Appl.Biol.Chem.,The Univ.Tokyo)

「背景」近年、世界規模で増加し続ける肥満は、メタボリックシンドロームの原因の 1 つである。この予防には、食欲をコントロールして過食しないだけでなく、何を食べるかということ（食の嗜好・選択）も重要である。その一方、食欲と嗜好性の関係は未だ不明な点が多い。
脳基底部の視床下部弓状核に局在する、アグーチ関連ペプチド産生神経(AgRP 神経)は食欲を惹起するうえで必須であり、その役割が急速に解明されつつある。この神経のユニークな特徴として AgRP とニューロペプチド Y（NPY）という摂食亢進効果を有する 2 種の神経ペプチドを分泌することが知られている。これまでの研究から AgRP の受容体欠損マウスは野生型マウスに比べ、脂質を糖質より好むこと、NPY を投与したラットは炭水化物の摂取量が増加することが知られている。

「目的」本研究では、これら AgRP 神経由来の神経ペプチドが食の選択に及ぼす影響を包括的に検証するため、マウスに AgRP、NPY を脳室内投与して、カロリー摂取量と脂質・糖質の嗜好性を評価した。

「実験方法」C57BL6J 雄マウスの側脳室に薬剤を投与できるよう、脳定位装置を用いカニューレを装着した。このマウスに高脂肪食（脂肪含量 60%）と高スクロース食（スクロース含量 35%）の両者を 1 週間提示し、自由摂取させた。その後、明期に AgRP または NPY を脳室内投与し、投与後 4 時間まで(短期)と 2 日目までの(長期)における 2 種のエサの摂取量を測定した。

「結果」脳室内投与前の 1 週間の間、マウスは高脂肪食を高スクロース食より好んで摂取した。一方、NPY を投与したマウスは、高スクロース食の摂取が数時間にわたり選択的に上昇した。この変化は 2 日目には元に戻る可逆的なものであった。これに対し、AgRP を投与したマウスは、脂肪食への好みは通常と同様であったものの、1 日当たりの摂取カロリーが有意に上昇した。

「考察」AgRP、NPY の脳内投与によって、摂食量に加え、食嗜好性が変化することが明らかになった。AgRP 神経由来の神経ペプチドによって食物選択行動が制御される可能性が示唆された。
本研究は，総合科学技術・イノベーション会議の SIP（戦略的イノベーション創造プログラム）「次世代農林水産業創造技術」およびロッテ重光学術賞の助成により実施された。

food preference, appetite, neuropeptide

講演番号：4F45p07
講演日時、会場：3 月 29 日 15:16～ F 校舎 45 会場

離乳期ラットの摂食変化が脳幹カテコールアミンニューロンの活動に及ぼす影響

The suckling and feeding affect activation of catecholamine neurons in brainstem of rat during weaning period

○宮田 徹、須山 勝光、白木 裕夏、石井 由実恵 (玉川大農)
○Tohru MIYATA, Katsuhisa Suyama, Yuka Shiraki, Yumie Ishii (Tamagawa Univ.)

哺乳動物は出生後母乳を栄養源として成長するが、離乳期にラットでは脂質の多い母乳の摂取から炭水化物の多い固形飼料の摂食へと食餌が移行する。私たちは Wistar 系ラットを用いて、離乳行動の過程と摂食調節に関する脳神経系との関係について以前より研究している。本研究では離乳期の摂食変化が、脳幹におけるカテコールアミンニューロンの活動に与える影響について試験した。

実験は離乳期である生後 18, 20, 22, 24 および 26 日齢に行った。仔ラットに摂食を誘発させるため、6 時間絶食した。その仔ラットを母ラットと固形飼料のあるケージに 2 時間おいた後、灌流固定し脳と胃を摘出した。この 2 時間の摂食を含めた行動は記録し、哺乳行動と摂食行動との時間を計測した。また胃内容物から母乳と固形飼料の摂食量を算出した。脳は延髄および視床下部の切片を作成し、ニューロン活性化を観察するために c-Fos 免疫組織化学を、またカテコールアミンニューロンを検出するために、チロシンヒドロキシラーゼ(TH)免疫組織化学を、単染色または二重染色した。

絶食後 2 時間の哺乳および摂食行動を観察すると、生後 18 日齢の仔ラットは固形飼料の摂取をほとんど行わないが、日齢が進むにつれ固形飼料の摂食時間が増加し、哺乳行動は減少した。胃内容物における母乳割合は日齢に伴って減少し、これは通常飼育しているラットの離乳過程と同様であったことから、空腹時の母乳あるいは固形飼料摂取選択が、離乳時期の成長過程に付随したものであることが示唆された。

脳幹における c-Fos 発現は絶食後ほとんど観察されず、摂食の 2 時間後に顕著に増加した。舌咽神経や迷走神経の入力部である孤束核および最後野において、生後 18 日齢の摂食後に c-Fos が見られ、発現細胞数は日齢に伴い増加した。孤束核と最後野では TH 陽性細胞すなわちノルアドレナリンニューロンの約半数が、c-Fos を発現していた。ドーパミンニューロンの分布する腹側被蓋野において、c-Fos 発現は摂食後に観察され、特に生後 18 日齢と 24、26 日齢において顕著であった。これらの c-Fos 発現細胞はほとんどドーパミンニューロンであったが、わずかに見られた黒質の c-Fos 発現細胞はドーパミンニューロンと異なっていた。視床下部においては離乳後期の 24、26 日齢に c-Fos が室傍核や外側野などで観察された。以上の結果から離乳期の母乳から固形飼料への摂食変化が、脳内の摂食制御系や報酬系の神経活動に影響を与えていることが示された。

weaning, catecholamine, c-Fos

講演番号：4F45p08
講演日時、会場：3 月 29 日 15:27～ F 校舎 45 会場

フェルラ酸のアミロイド前駆体タンパク質分解に対する作用の二相性
Biphasic effect of ferulic acid on amyloid precursor protein proteolysis
○木野内 忠稔[1]、北波 利雄[2]、藤井 紀子[1] ([1]京大原子炉実験所、[2]社会福祉法人きたば会)
○Tadatoshi KINOUCHI[1], Toshio KITABA[2], Noriko FUJII[1] ([1]Research Reactor Institute, Kyoto Univ., [2]Kitaba-kai, Social Welfare Corporation)

【背景】フェルラ酸は、植物の細胞壁リグニンを構成する低分子化合物で、他のフェノール構造を含むフィトケミカルと同様に強い抗酸化作用を持ち、様々な生理活性を示すことが知られている。実際にフェルラ酸をアルツハイマー型認知症の軽度～中度罹患者に投与すると、その症状の進行抑制、認知機能の改善に有効であり、すでにサプリメントとして製品化されている。しかしながらその詳細な作用機序については、報告例が少なく不明な点が多い。アルツハイマー型認知症モデルマウスにフェルラ酸を経口投与することによって、有意に原因タンパク質のβアミロイド（Aβ）の生成量が減少することが示されているが、その分子レベルでの作用機序は不明である。そこで、本研究ではヒト由来グリオブラストーマ A172 細胞を用いて、フェルラ酸の生理作用とその作用機序について解明することにした。
【方法と結果】まず A172 細胞を通常のウシ胎仔血清（FBS）を全容の 10%含む DME 培地で培養したときと、FBS を含まない DME 培地、それらにフェルラ酸を添加（1, 10, 100 μM）したときの細胞の成長速度を調べた。FBS を 10%含む DME 培地で～20% confluent に A172 細胞を増殖させ、種々の条件の培地に交換した。その後、3 日目を境に FBS もフェルラ酸も無添加の条件下では、A172 細胞の脱落が顕著になったが、FBS 無添加であってもフェルラ酸が添加（10, 100 μM）されていれば、脱落を防ぐことが示された。しかも A172 細胞の脱落を効果的に抑制したのは、フェルラ酸を 10 μM 添加したときであった。そこで、FBS 無添加におけるβアミロイド前駆体タンパク質（APP）の代謝量の変化に対するフェルラ酸の影響を調べた。フェルラ酸の濃度を 0 から 3, 10, 30, 100 μM まで段階的に変えて培養液中に分泌される正常分解型の APP（sAPP）の増減を調べたところ、フェルラ酸の濃度が 10 μM のときに、最も sAPP の分泌量が増えていることが示された。これらの結果は、貧栄養下における A172 細胞に対して、適量のフェルラ酸が保護的に作用し、APP の代謝を正常寄りにしていることを示唆している。現在、フェルラ酸が APP 代謝に対する影響について、分子レベルでの検討を行っている。

ferulic acid, ß-amyloid protein, amyloid precursor protein

講演番号：4F45p09
講演日時、会場：3 月 29 日 15:38～ F 校舎 45 会場

2 型糖尿病併発型アルツハイマーモデルマウスにおけるカルノシンの認知記憶障害に対する予防・改善作用

The prevention/ improvement effect against cognitive impairment by Carnosine in a type 2 diabetes-Alzheimer's disease model mice.

○金子 順、芝原 恵、木村 康太、エルクラーノ ブルーノ、久恒 辰博（東京大学）
○Jun KANEKO, Megumi SHIBAHARA, Kohta KIMURA, Bruno HERCULANO, Tatsuhiro HISATSUNE (Tokyo Univ.)

【序論】高機能食品成分による脳の機能老化ひいては認知症の予防に期待が寄せられている。当研究室の先行研究により高脂質飼料(High Fat Diet, HFD)をアルツハイマー病モデルマウス(Tg, APPswe/PS1⊿E9)に食餌することにより、早期にアルツハイマー病の症状である記憶機能の低下を誘導することを報告した。さらに、このモデルマウスを用いた研究から肉類に多く含まれる高機能ジペプチドである Carnosine (Car)が記憶機能の低下を抑制する効果があることを見出してきた。本研究においては、この Car の記憶機能の低下を抑制するメカニズムを明らかにする事を目的とした。アルツハイマー病の記憶機能の低下に、海馬における GABA 回路の変調が関与していることが報告されているため、我々はこの GABA 回路の変調に関わる調節因子として Diazepam Binding Inhibitor (DBI)に着目し、Car の投与による DBI を中心とした GABA 回路への影響を解析した。

【方法】実験には糖尿病併発型認知症モデルマウスとして、この Tg マウスに 2 ヶ月間、HFD を投与した。Car の投与は HFD 投与開始時期の 2 週間後から 6 週間投与した。これらの Tg マウスを用いて、海馬における DBI の発現状態を定量的免疫染色画像評価法により解析した。さらに GABA の入力は記憶機能に関与するニューロン新生を制御することが知られているため、ニューロン新生に対する Car の作用を比較した。

【結果】DBI の発現を比較した結果、記憶障害を示す HFD を与えた Tg マウスの海馬領域における有意な DBI の発現の上昇が見られた。その一方で認知記憶障害が改善される Car を投与した群では、DBI 発現が抑制されていた。さらにニューロン新生に対する作用を比較した結果、分化過程において Car が有意な作用していることが示された。

【考察】記憶障害を示すマウスでは海馬領域において炎症反応が起こっており、この炎症反応により GABA 回路の調節因子である DBI の発現が誘導されたと推察される。これにより GABA 回路の変調が生じたと考えられ、これはニューロン新生の変化からも示唆される。この GABA 回路の変調が記憶機能の低下を誘導すると考えられる。さらに Car 投与マウスでは、この脳内炎症反応が抑制されたため、DBI の発現誘導が抑えられた。その結果、認知機能の低下が抑制したものと推察される。

Carnosine, Diazepam Binding Inhibitor, Alzheimer's disease

講演番号：4F45p10
講演日時、会場：3 月 29 日 15:49～ F 校舎 45 会場

高機能ジペプチドを摂取した中高齢者の拡散 MRI 解析を介した脳老化予防に関する研究

A diffusion MRI research for the prevention of brain aging by functional dipeptides

○貴田 潤平[1]、金子 順[1]、今林 悦子[2]、松田 博史[2]、久恒 辰博[1] ([1]東京大学、[2]国立精神・神経医療研究センター)
○Junpei Kida[1], Jun Kaneko[1], Etsuko Imabayashi[2], Hiroshi Matsuda[2], Tatsuhiro Hisatsune[1] ([1]Tokyo Univ., [2]NCNP)

<序論> 高齢社会が進行している我が国では、加齢による脳機能低下に対する予防法の開発に、多くの期待が寄せられている。当研究室では、アルツハイマーモデルマウスを用いた先行研究において、高機能ジペプチドの一種であるカルノシンには、脳内の炎症反応を抑制し、認知機能低下を抑制する効果があることを見出してきた。さらにその知見から、40-70 代の健常ボランティアの参加による高機能ジペプチドの３ヶ月摂取試験を行ったところ、プラセボ食摂取群に比べ認知機能の低下が、有意に改善することが認めた。しかし依然として、高機能ジペプチドの作用機序には不明な点が多い。本研究では、高機能ジペプチドの脳内における作用機序を検証することを目的とした。認知機能低下には、炎症反応が関与していることが知られており、また高機能ジペプチドには抗炎症作用があることが知られている。そこで我々は脳内の炎症反応に着目し、炎症に伴う神経線維の変化を、拡散 MRI を用い評価することで、高機能ジペプチドの炎症に対する作用を検証した。

<方法> 研究室ホームページなどで公募した健康な中高齢者を第三者機関により試験食群、プラセボ群に割り付けを行い、三ヶ月間試験食を一日二回摂取して頂いた(プラセボ群はプラセボ食)。初回検査と最終検査時に、記憶機能を評価する試験と各種の MRI 画像検査（脳組織内の水分子の拡散状態を測定する拡散 MRI を含む）を行った。なお、これらの検査は、国立精神・神経医療研究センターにおいて実施した。撮像した画像データから、白質線維の構造変化の指標になる fractional anisotropy(FA)値を算出し、試験食群、プラセボ食群間での 60 歳以上の被験者における比較を行った。

<結果> 今回、６０～７０代の試験食群（１０名）・プラセボ食群（１２名）の各群において、食品摂取前後の記憶機能と MRI 画像を比較した。まず、記憶機能に関して、試験食群で有意に改善していることを認めた。また、拡散 MRI 解析からの FA 値（神経線維の炎症状態を反映）を比較したところ、試験食群において、外包(External Capsule、Extreme Capsule)及び下側頭回(Inferior Temporal Gyrus)領域で FA 値の改善が確認された。これらの領域は記憶機能に深く関わっている。また、FA 値の変化は、炎症などによる神経線維の脱ミエリン化によって引き起こされることが知られており、神経線維の損傷は、認知機能を低下させる要因となっている。これらのことから、イミダゾールジペプチドの継時的摂取は、炎症反応を抑制し神経線維変化を改善することで、認知機能低下を防いでいる可能性がある。

Carnosine, aging, cognitive function

講演番号：4F45p11
講演日時、会場：3 月 29 日 16:10～ F 校舎 45 会場

Tg2576 マウスにおけるロスマリン酸による脳内 Aβ凝集抑制効果のトランスクリプトーム解析

Transcriptome analysis of the inhibition of amyloid-β aggregation by rosmarinic acid in the brain of Tg2576 mice

○宍戸 駿[1]、豊田 集[1]、濱口 毅[2]、篠原 もえ子[2]、小野 賢二郎[2]、山田 正仁[2]、阿部 啓子[1,3]、小林 彰子[1] ([1]東大院農、[2]金沢大医、[3]神奈川科学技術アカデミー)

○Shun SHISHIDO[1], Tsudoi TOYODA[1], Tsuyoshi HAMAGUCHI[2], Moeko SHINOHARA[2], Kenjoro ONO[2], Masahito YAMADA[2], Keiko ABE[1,3], Shoko KOBAYASHI[1] ([1]UTokyo., [2]Kanazawa Univ., [3]KAST)

【目的】ポリフェノールにはアルツハイマー病(AD)を含む認知症の予防に有用である疫学的知見が示唆されている。AD の主病態は脳のアミロイドβタンパク質（Aβ）の沈着である。これまでに我々は、Aβを用いた *in vitro* のスクリーニングにより Aβの凝集を抑制するポリフェノールを探索した結果、シソ科ハーブに含まれるロスマリン酸 (RA)に Aβ凝集抑制効果があることを見出した（Ono K, et al., *J Neurosci Res*. 2004）。また AD モデルマウスとして Sweden 型変異を有するヒト Aβ前駆体タンパク質を遺伝子導入したトランスジェニックマウス（Tg2576）が広く用いられているが、この Tg2576 に RA を摂食させたところ、コントロール食群と比較し脳内における Aβ 沈着の有意な減少が認められた（Hamaguchi T, et al., *Am J Pathol*. 2009）。本研究では *in vivo* 試験でみられた RA 摂食による Aβ凝集抑制機構を探るために、RA 摂食により Aβ凝集が抑制したマウスの脳のトランスクリプトーム解析を行い、脳内の遺伝子発現プロファイルを明らかにすることを目的とした。

【方法】5 か月齢の Tg2576 を基本飼料である CRF-1 を摂食させたコントロール群（C 群、n=9）、および 0.5% RA 含有 CRF-1 を摂食させたロスマリン酸群 (R 群、n=8)の 2 群に分け飼育した。10 ヶ月の飼育後 R 群では脳内 Aβ凝集量が C 群と比較し有意に減少した（Hamaguchi T, et al., *Am J Pathol.* 2009）。C 群および R 群それぞれの個体の脳から Total RNA を抽出し、DNA マイクロアレイ分析に供した。

【結果】DNA マイクロアレイによって得られた CEL ファイルを DFW 法で正規化した後、Rank Products 法による二群間比較を行った。有意に発現変動した遺伝子として FDR<0.01 を満たすプローブセットを抽出した結果、発現上昇したものは 367 個、発現低下したものは 636 個であった。これらのプローブセットをウェブ解析ツールの Ingenuity Pathway Analysis を用いて機能分類した。機能亢進に分類されたカテゴリーは 6 個、機能抑制と分類されたカテゴリーは 20 個であった。抑制に分類されたカテゴリーには、細胞の刺激および活性化、細胞死、神経細胞の脱分極、および細胞内 Ca^{2+}濃度の上昇などが含まれていた。これらの結果により RA 摂食により Aβの沈着が抑制されたメカニズムの 1 つとして、マウスの脳内では、神経細胞の脱分極や細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇が抑制され、その結果アポトーシスなどの細胞死を抑制している可能性が考えられた。現在さらに詳細な遺伝子の解析を行っている。

本研究の一部は，総合科学技術・イノベーション会議の SIP（戦略的イノベーション創造プログラム）「次世代農林水産業創造技術」及び（公財）飯島藤十郎記念食品科学振興財団の助成によって実施された。

Transcriptomics, Alzheimer's disease (AD), Rosmarinic acid

講演番号：4F45p12
講演日時、会場：3 月 29 日 16:21～ F 校舎 45 会場

MKP-1 発現調節を介したロズマリン酸の抗うつ薬様効果

Antidepressant-like effect of rosmarinic acid through mitogen-activated protein kinase phosphatase-1

○近藤 真司[1]、HAN Junkyu[2,3]、礒田 博子[2,3] ([1]筑波大院生命環境、[2]筑波大院生命環境系、[3]筑波大北アフリカ研究センター)
○Shinji KONDO[1], Junkyu HAN[2,3], Hiroko ISODA[2,3] ([1]Graduate school of life and environmental sciences, University of Tsukuba, [2]Faculty of life and environmental sciences, University of Tsukuba, [3]Alliance for Research on North Africa(ARENA))

【目的】
抗うつ薬は脳内のシナプス間隙の神経伝達物質レベルを増加させるために一般的に処方される。しかし一方で抗コリン作用を持ち、自律神経失調をもたらすなど副作用を示す。天然由来ポリフェノールの中には脳内の神経伝達物質レベルを増加させ副作用を減じるものがある。先行研究でローズマリーなどに含まれるポリフェノールであるロズマリン酸(RA)が神経細胞モデル PC12 細胞で脳由来神経栄養因子（BDNF）の転写に関わる ERK1/2 のリン酸化を促進し、さらに神経伝達物質生成関連酵素 tyrosine hydroxylase (TH)と ATP 生成酵素 pyruvate carboxylase (PC)の発現を促進することが明らかになった。また近年、mitogen-activated protein kinase phosphatase-1（MKP-1）が ERK1/2 リン酸化の負の調節因子として作用することが報告された。本研究では、MKP-1 を介した RA の抗うつ薬様効果とそのメカニズム解析を行った。

【方法】
RA をマウスに経口投与した。投与後、尾部懸垂試験（TST）にてマウスの無動時間を測定した。無動時間の延長はうつ行動を示唆する。TST 後、マウス血中のストレスホルモンであるコルチコステロン（CORT）レベルを測定した。またマウス脳の神経伝達物質レベルを測定した。さらにメカニズム解析のためリン酸化 ERK1/2 及び ATP の発現解析、MKP-1、BDNF、TH 及び PC の遺伝子発現解析を行い、CORT 分泌調節に関わる脳下垂体-視床下部-副腎軸（HPA 軸）調節ホルモンの発現解析を行った。

【結果と考察】
マウスへの RA 経口投与は TST の無動時間を短縮させた。RA 経口投与マウスの HPA 軸調節ホルモン発現、血中 CORT レベルは減少し、また脳内の神経伝達物質レベルは増加した。さらに脳内のリン酸化 ERK1/2 発現及び ATP 発現は増加、MKP-1 遺伝子発現は減少し、BDNF、TH, PC 遺伝子発現は増加した。RA によるうつ行動の抑制は以下の効果によるものと考えられる。RA は脳内の TH 発現を増加させたことにより神経伝達物質レベルを増加させたことが示唆される。また HPA 軸調節を介し、血中 CORT レベルを減少させたことにより、脳内の MKP-1 発現を減少させたことが示される。これによる ERK1/2 リン酸化促進を介し、BDNF 発現を増加させたことが示唆される。さらに BDNF 発現増加には PC 発現増加による ATP 生成増加も関与するものと考えられる。

Rosmarinic acid, Depression, MKP-1

講演番号：4F45p13
講演日時、会場：3 月 29 日 16:32～ F 校舎 45 会場

大豆由来の情動調節ペプチド 1 －大豆タンパク質酵素消化物の抗うつ薬様作用

Soy-derived neuromodulatory peptide. Part 1: Antidepressant-like effect of enzymatic digest of soy protein

○森 薫葉[1]、山本 あかね[1]、金本 龍平[1]、鈴木 秀幸[2]、柴田 大輔[2]、大日向 耕作[1]([1]京大院農食品生物、[2]公益財団法人かずさ DNA 研究所)
○YUKIHA MORI[1], AKANE YAMAMOTO[1], RYUHEI KANAMOTO[1], HIDEYUKI SUZUKI[2], DAISUKE SHIBATA[2], KOUSAKU OHINATA[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Kazusa DNA Lab.)

【目的】超高齢社会を迎えるわが国において、活力ある健康長寿社会の実現が期待されている。現在、加齢による神経機能の低下に着目し意欲向上、ストレス緩和作用を示す機能性素材の開発を目指している。本研究では、大豆の主要貯蔵タンパク β-conglycinin（β-CG）を産業利用可能な微生物由来酵素で処理した消化物が抗うつ薬様作用や抗不安薬様作用などの情動調節作用を示すか否かを複数の行動試験により評価した。また、各種受容体のアンタゴニストを用いて検討を行った。
【方法】実験動物は ddY 雄性マウスを用いた。大豆 β-CG を微生物由来酵素で消化し、得られたサンプルをマウスに経口投与し、30 分後に各種行動試験で評価した。抗うつ薬様活性は、強制水泳試験(8 分間)および尾懸垂試験(6 分間)で評価した。無動時間が減少した場合に抗うつ薬様活性がありと判定した。抗不安薬様活性は、高架式十字迷路試験およびオープンフィールド試験で 5 分間評価した。それぞれオープンアームおよび中心円での滞在時間が増加した場合に抗不安薬様活性がありと判定した。なお、各種アンタゴニストは消化物と同時に経口投与して用いた。
【結果および考察】β-CG のサーモリシン消化物を経口投与したところ、強制水泳試験(100 mg/kg)および尾懸垂試験(30 mg/kg)における無動時間の減少が認められ、抗うつ薬様活性を示すことが明らかになった。その他の消化物では活性が認められなかった。またサーモリシン消化物の経口投与により、高架式十字迷路試験(10 mg/kg)およびオープンフィールド試験(3 mg/kg)におけるオープンアームおよび中心円での滞在時間が増加し、抗不安薬様活性を示すことを見出した。さらに、情動調節に関与する受容体のアンタゴニストを用いて作用機構を検討した。サーモリシン消化物の尾懸垂試験における抗うつ薬様活性は、WAY100135、SCH23390、bicuculline(それぞれ、セロトニン 5-HT_{1A}、ドーパミン D_1、$GABA_A$受容体アンタゴニスト)により阻害され、5-HT_{1A}、D_1、$GABA_A$受容体の活性化を介すると考えられる。
【結論】大豆 β-conglycinin のサーモリシン消化物は、経口投与により抗うつ薬様作用および抗不安薬様作用を示すことを新たに見出した。また、その抗うつ薬様作用機構はセロトニン 5-HT_{1A}、ドーパミン D_1、$GABA_A$受容体の活性化を介することが明らかとなった。

本研究は、農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業を活用して実施した。

Beta-Conglycinin, Oral administration, Antidepressant-like effect

講演番号：4F45p14
講演日時、会場：3 月 29 日 16:43～ F 校舎 45 会場

大豆由来の情動調節ペプチド 2 －酵素消化により生成する新しい抗うつペプチド

Soy-derived neuromodulatory peptide. Part 2: Novel antidepressant-like peptide released after enzymatic digestion

森 薫葉[1]、山本 あかね[1]、金本 龍平[2]、鈴木 秀幸[2]、柴田 大輔[2]、○大日向 耕作[1]（[1]京大院農、[2]かずさ DNA 研究所）
Yukiha Mori[1], Akane Yamamoto[1], Ryuhei Kanamoto[2], Hideyuki Suzuki[2], Daisuke Shibata[2], ○Kousaku Ohinata[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Kazusa DNA Res. Inst.)

【目的】大豆の主要な貯蔵タンパク β-conglycinin（β-CG）のサーモリシン消化物の経口投与により、抗うつ薬様作用および抗不安薬様作用など情動調節作用を示すことを明らかにした。酵素消化により情動調節作用を示すペプチドが生成している可能性が考えられる。そこで本研究では、サーモリシン消化により生成するペプチドを網羅的に分析するとともに、その作用本体の同定を試みた。
【方法】β-CG の酵素消化物を nanoLC-Orbitrap-MS を用いてペプチド一斉分析を行った。この網羅的ペプチド情報と、これまでに得られた構造－活性相関情報を利用し、候補ペプチドを探索した。得られた候補ペプチドを化学合成し、HPLC 精製したものをマウスに投与し、各種行動実験（強制水泳試験、尾懸垂試験、高架式十字迷路試験、オープンフィールド試験）を行った。また、候補ペプチドの類縁体を合成し、構造－活性相関を検討した。さらに、メディエーターを検討するために、各種アンタゴニストを経口投与し、ペプチドの生理作用が阻害されるか否かを検討した。
【結果および考察】β-CG サーモリシン消化物の nanoLC-Orbitrap-MS 分析による網羅的ペプチド情報に基づき情動調節ペプチド候補を探索したところ、10 残基ペプチド LSSTQAQQSY が得られた。そこで、ペプチドを化学合成し、その情動行動に及ぼす影響を各種行動試験により検討した。その結果、本ペプチドは経口投与により抗うつ薬様作用（尾懸垂試験、強制水泳試験）および抗不安薬様作用（高架式十字迷路試験、オープンフィールド試験）を示すことが明らかとなった。尾懸垂試験における抗うつ薬様活性の構造－活性相関を検討したところ、N 末端および C 末端アミノ酸の欠失により活性は減弱し、全長の 10 残基ペプチドが最も強力な作用を示した。また、LSSTQAQQSY の抗うつ安薬様作用は、サーモリシン消化物の場合と同様に WAY100135、SCH23390、bicuculline（それぞれ 5-HT_{1A}、D_1、$GABA_A$ 受容体アンタゴニスト）により阻害され、サーモリシン消化物と共通の作用機構を介すると考えられた。興味深いことに LSSTQAQQSY は経口投与により医薬品並みの低用量で（0.3 mg/kg）抗うつ薬様活性を示す一方、腹腔内投与では効果を示さなかった。さらに、本ペプチドは、抗うつ薬様活性を示すサーモリシン消化物にのみ検出されたことから、作用本体である可能性が考えられた。
【結論】大豆 β-conglycinin のサーモリシン消化物から抗うつ薬様作用および抗不安薬様作用を示す新規の経口投与で有効なペプチドを見出した。

本研究は、農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業を活用して実施した。

Global analysis, Structure-activity relationship, Neuromodulatory peptide

シンポジウムプログラム

3 月 29 日（日）9:00〜12:05，または 13:30〜16:30

4SY01　異分野融合による天然物創薬〜生理活性物質から医薬品シーズへ〜

3 月 29 日（日）9:00〜12:05　A21 会場（一般教育棟 A 棟　2 階）
世話人：井本正哉（慶應大理工），長田裕之（理研・環境資源センター），田代　悦（慶應大理工）
座　長：井本正哉（慶應大理工），長田裕之（理研・環境資源センター），田代　悦（慶應大理工）

9:00　はじめに……◦井本正哉（慶應大理工）
9:05　4SY01–1　微生物由来天然化合物の治療薬シードへの展開 ……◦井本正哉，田代　悦（慶應大理工）
9:32　4SY01–2　破骨細胞を標的とするリベロマイシン A……◦長田裕之（理研・環境資源センター）
9:59　4SY01–3　がん治療薬開発のソースとしての漢方薬―漢方薬とがん転移― ……◦済木育夫（富山大和漢医薬研）
10:26　4SY01–4　ゼブラフィッシュの化学遺伝子を利用した抗がん剤シード探索と毒性予測
……◦西谷直之（岩手医大薬）
10:53　4SY01–5　エストロゲン受容体制御分子 **BIG3** を標的とした新規ホルモン依存性乳がん治療法の開発
……◦片桐豊雅[1]，吉丸哲郎[1]，小松正人[1]，田代　悦[2]，井本正哉[2]，長田裕之[3]
（[1]徳島大疾患プロテオゲノム，[2]慶應大理工，[3] 理研・環境資源センター）
11:20　4SY01–6　バイオイメージング技術の開発と医学研究・創薬応用……◦今村健志（愛媛大医）
11:47　総合討論……◦長田裕之（理研・環境資源センター）
12:00　おわりに……◦長田裕之（理研・環境資源センター）

4SY02　天然物ケミカルバイオロジー研究の新展開

共同主催：日本学術会議食料科学委員会農芸化学分科会
3 月 29 日（日）13:30〜16:30　A21 会場（一般教育棟 A 棟　2 階）
世話人：桑原重文（東北大院農），清田洋正（岡山大院環境生命），上田　実（東北大院理）
座　長：清田洋正（岡山大院環境生命），桑原重文（東北大院農）

13:30　はじめに……◦清水　誠（日本学術会議第 2 部，東農大応生科）
13:35　4SY02–1　イネ科植物の鉄イオン取り込み機構に関する有機化学的研究……◦難波康祐（徳島大薬）
14:05　4SY02–2　タンパク質膜挿入・膜透過に関与する糖脂質酵素（**Glycolipozyme**）**MPIase** の構造と機能
……◦西山賢一[1]，前田将秀[2]，Moser Michael[1]，楠本正一[2]，徳田　元[3]，島本啓子[2]
（[1]岩手大・農・寒冷バイオ，[2]サントリー生命科学財団・生有研，[3]盛岡大・栄養科学部）
14:35　4SY02–3　二フッ化シアル酸：インフルエンザ・シアリダーゼの機構解明と共有結合阻害剤の開発
……◦清田洋正[1]，バブリチカ クリストファー[1,2]，田中皓祐[3]，
鈴木康夫[4]，桑原重文[3]，大類　洋[5]，高　　福[2]
（[1]岡山大院環境生命，[2]中国科学アカデミー，[3]東北大院農，[4]中部大，[5]横浜薬科大）
15:05　4SY02–4　疾患シグナルに作用する天然物スクリーニング研究 ……◦石橋正己（千葉大院薬）
15:35　4SY02–5　ケミカルゲノミクス：生理活性物質標的同定に向けた網羅的アプローチ
……◦吉田　稔[1]，八代田陽子[1]，松本　健[2]（[1]理研・環境資源，[2]理研・化学遺伝）

4SY03　皆に知って欲しい（意外と知らない）〜酵素の産業利用

協　賛：酵素工学研究会
3 月 29 日（日）9:00〜12:05　A41 会場（一般教育棟 A 棟　4 階）
世話人：廣瀬芳彦（天野エンザイム），上田　誠（小山高専），高木　忍（ノボザイムズ ジャパン㈱）
座　長：廣瀬芳彦（天野エンザイム），上田　誠（小山高専），高木　忍（ノボザイムズ ジャパン㈱）

9:00　はじめに……◦高木　忍（ノボザイムズ ジャパン㈱）
9:05　4SY03–1　微生物由来の消化酵素の新しい展開 ……◦廣瀬芳彦（天野エンザイム株式会社）
9:27　4SY03–2　身近な産業用酵素－洗剤用酵素を中心に ……◦鈴木陽一（ノボザイムズ ジャパン㈱）
9:49　4SY03–3　シクロデキストリン合成酵素の反応の多様性と澱粉糖化への利用
……◦山本拓生（㈱林原 研究開発本部）
10:11　4SY03–4　意外と知らない油脂加工における酵素の利用と可能性……◦木田晴康（不二製油㈱）
10:33　4SY03–5　酵素製剤化による食品製造への利用拡大 ……◦熊澤義之（味の素 食品研究所）
10:55　4SY03–6　化学プロセスにおける酵素利用……◦八十原良彦（株式会社カネカ）
11:17　4SY03–7　酵素反応と代謝工学的手法を活用した有用化合物製造法の開発〜 **KAITEKI** の実現に向けて
……◦川端　潤（三菱化学科学技術研究センター）
11:39　4SY03–8　分子生物学研究用酵素の開発とそのアプリケーション分野への展開
……◦北川正成（タカラバイオ株式会社）
12:01　おわりに……◦上田　誠（小山高専）

4SY04　糖質関連酵素の新潮流

3 月 29 日（日）13:30〜16:30　A41 会場（一般教育棟 A 棟　4 階）
世話人：後藤正利（九大院農），伏信進矢（東大院農）
座　長：伏信進矢（東大院農）：1–3，後藤正利（九大院農）：4–6

13:30　はじめに……◦後藤正利（九大院農）
13:35　4SY04–1　糸状菌に特異なガラクトフラノース（$\mathbf{Gal}_f$）糖鎖の生合成
……◦岡　拓二[1]，後藤正利[2]（[1]崇城大生物生命，[2]九大院農）
14:00　4SY04–2　リゾチーム遷移状態アナログの設計に基づく反応機構の検証
……◦尾形　慎[1]，碓氷泰市[2]，梅本尚之[3]，大沼貴之[3]，深溝　慶[3]，沼田倫征[4]
（[1]福島高専・物質工，[2]静岡大・創科技，[3]近畿大院農・バイオ，[4]産総研）
14:25　4SY04–3　糖質加水分解酵素ファミリー **97** における触媒機構と多様性……◦奥山正幸（北大院農）
15:00　4SY04–4　反転型糖質ホスホリラーゼの立体構造と基質認識……◦伏信進矢（東大院農）
15:25　4SY04–5　**α–1, 3**–グルカン分解酵素とその応用
……◦矢野成和[1]，若山　守[2]，立木　隆[2]（[1]山形大院理工，[2]立命館大生命科学）
15:50　4SY04–6　微生物のエンドグリコシダーゼを用いた生理活性物質の合成……◦山本憲二（石川県大生物資源研）
16:15　おわりに……◦伏信進矢（東大院農）

4SY05　「細菌が放出する膜小胞（**membrane vesicle**）を知っていますか？」〜異分野融合を基に推進された細菌膜小胞研究：細菌細胞表層から放出される膜小胞の発見，構造・生合成機構解析，そして応用〜

3 月 29 日（日）9:00〜12:05　E11 会場（一般教育棟 E 棟　1 階）
世話人：渡部邦彦（京都府大院生命環境），野村暢彦（筑波大院生命環境）
座　長：渡部邦彦（京都府大院生命環境），野村暢彦（筑波大院生命環境），橋本　渉（京大院農）

9:00　はじめに……◦渡部 邦彦（京都府大院生命環境）
9:15　4SY05–1　細菌が能動的に生産する膜小胞，メンブランベシクル
……◦豊福雅典[1]，エベールレオ[2]，野村暢彦[1]（[1]筑波大院生命環境，[2]チューリッヒ大学）
9:45　4SY05–2　窒素固定細菌の膜小胞による多糖輸送……◦橋本　渉[1]，村田幸作[2]（[1]京大院農，[2]摂南大・理工）
10:15　4SY05–3　微生物間の宅配便　－メンブランベシクルの分泌機構と選択的細胞融合－
……◦田代陽介（静岡大院工）
11:45　4SY05–4　グラム陽性細菌のメンブランベシクルと動物細胞への作用
……◦尾花　望[1]，中尾龍馬[2]，中村幸治[1]，泉福英信[2]，野村暢彦[1]
（[1]筑波大院生命環境，[2]感染研細菌一）
11:15　4SY05–5　膜小胞に局在する酵素タンパク質の応用―難分解性タンパク質トリ羽毛分解を行うケラチン分解性プロテアーゼの研究から
……◦渡部邦彦[1]，川崎一則[2]，増村威宏[1]（[1]京都府大院生命環境，[2]産総研健康工学）
11:45　まとめ……◦野村暢彦（筑波大院生命環境）

4SY06　分子構造多様性創出を指向した二次代謝生合成マシナリーの精密解析および合理的制御

共　催：新学術領域研究「生合成マシナリー：生物活性物質構造多様性創出　システムの解明と制御」
3 月 29 日（日）13:30〜16:30　E21 会場（一般教育棟 E 棟　2 階）
世話人：荒川賢治（広島大院・先端研），岩下和裕（酒類研）
座　長：荒川賢治（広島大院・先端研），岩下和裕（酒類研）

13:30　4SY06–1　放線菌シグナル制御系の分子基盤解析および複合的代謝改変による潜在的二次代謝産物の発掘
……◦荒川賢治（広島大院・先端研）
14:00　4SY06–2　遺伝子ターゲティングによる糸状菌二次代謝産物生合成経路の全容解明
……◦加藤直樹，高橋俊二，長田裕之（理研 CSRS・ケミカルバイオロジー）
14:30　4SY06–3　情報解析の真菌二次代謝研究への応用
……◦小池英明，玉野孝一，梅村舞子，森田友岳，町田雅之（産業技術総合研究所）
15:00　4SY06–4　アフラトキシン，トリコテセンの代謝制御におけるミトコンドリアの機能
……◦作田庄平，古川智宏，山本利義（東大農）
15:30　4SY06–5　リボソームと新規ペプチドリガーゼによる協調的ペプチド生成機構……◦大利　徹（北大院工）
16:00　4SY06–6　マクロラクタム抗生物質生合成マシナリーの精密解析……◦江口　正（東京工業大学院理工）

4SY07　合成生物学的なアプローチが次世代の農芸化学をどう変えるか

共　催：一般財団法人バイオインダストリー協会
3 月 29 日（日）9:00～12:05　E21 会場（一般教育棟 E 棟　2 階）
世話人：赤田倫治（山口大医系），阪井康能（京大院農）
座　長：赤田倫治（山口大医系），阪井康能（京大院農）

9:00　4SY07–1　“合成生物学”から再考するメタノール酵母遺伝子発現系……○阪井康能（京大院農）
9:25　4SY07–2　細胞の持つタンパク質発現の キャパシティを測る
……○守屋央朗[1]，金高令子[2]，蒔苗浩司[1]（[1]岡山大異分野コア，[2]岡山大自然科学）
10:00　4SY07–3　メタノール資化性酵母 ***Ogataea minuta*** によるバイオ医薬品生産系の開発
……○野中浩一（第一三共株式会社）
10:35　4SY07–4　思い通りの DNA デザインを目指した遺伝子操作技術と合成生物学…○中村美紀子（山口大産学公）
11:10　4SY07–5　人工細胞モデルの実験進化……○四方哲也[1,2,3]（[1]大阪大，[2]東工大，[3]ERATO）
11:45　4SY07–6　農芸化学と合成生物学は何をもたらすか……○赤田倫治（山口大医系）

4SY08　微生物と電子と金属の複雑な関係を解き明かす微生物腐食研究の最前線

協　賛：腐食防食学会，電気化学会，日本鉄鋼協会，日本微生物生態学会，微生物腐食研究若手会
3 月 29 日（日）13:30～16:30　E11 会場（一般教育棟 E 棟　1 階）
世話人：若井　暁（神戸大自然），中村龍平（理研環境資源），加藤創一郎（産総研生物プロセス）
座　長：若井　暁（神戸大自然），中村龍平（理研環境資源），加藤創一郎（産総研生物プロセス）

13:30　はじめに……○若井　暁（神戸大自然）
13:35　4SY08–1　微生物・固体間電子移動に基づく酢酸生成反応とその鉄腐食への関与
……○加藤創一郎[1,2,3]（[1]産総研生物プロセス，[2]東大先端研，[3]北大院農）
14:05　4SY08–2　電気化学的代謝制御による嫌気微生物腐食の抑制
……○中村龍平[1]，岡本章玄[1]，川市智史[1]，茂木岳人[2]，橋本和仁[2]
（[1]理研環境資源，[2]東大院工）
14:35　4SY08–3　電子の流れを切り口とした発酵制御と微生物腐食研究
……○平野伸一，長岡　亨，松本伯夫（電力中央研究所）
15:05　4SY08–4　金属微細組織と微生物付着の相互作用の可視化に関する検討～微生物腐食を誘導する金属学的因子の影響解明にむけて～
……○宮野泰征[1]，稲葉知大[2]，野村暢彦[2]（[1]秋田大理工，[2]筑波大生命環境）
15:35　4SY08–5　**AFM** によるバイオフィルム生成挙動の解析
……○平井信充[1]，カームンマー[1]，ボジホン[1]，小澤ひかり[1]，生貝　初[1]，兼松秀行[2]
（[1]鈴鹿高専生物応用化学科，[2]鈴鹿高専材料工学科）
16:05　4SY08–6　日本発の腐食菌検出技術および防食技術の開発を目指して……○若井　暁（神戸大自然）

4SY09　生物生産の必須要素「培地・培養」を考える～微生物から植物・動物細胞まで

3 月 29 日（日）9:00～12:05　B33 会場（一般教育棟 B 棟　3 階）
世話人：大政健史（徳島大院 STS 研），川向　誠（島根大生資），小川　順（京大院農）
座　長：4SY09–1～3：小川　順（京大院農），4SY09–4～5：大政健史（徳島大院 STS 研），4SY09–6～7：川向　誠（島根大生資）

9:00　はじめに……○小川　順（京大院農）
9:05　4SY09–1　酵母の表現型に影響する培地成分の違い……○川向　誠（島根大生資）
9:30　4SY09–2　**CDMO** による微生物発酵の培養条件の最適化及びスケールアップ　－ケーススタディー
……○真岡宅哉[1]，中村雅哉[2]，大塚祐一郎[2]，片山義博[3]，小菅康孝[1]，山本泰司[1]，吹田喜数[1]
（[1]神戸天然物化学株式会社，[2]森林総合研究所，[3]日本大学）
9:55　4SY09–3　発酵醸造食品生産における培地・培養考……○宇多川　隆（福井県大生物）
10:20　4SY09–4　生食用スピルリナの最適培養法……○佐々木俊弥（株式会社タベルモ）
10:45　4SY09–5　発酵培地視点でのハラール，コーシャ要求事項
……○小川知成（天野エンザイム株式会社　品質保証本部）
11:10　4SY09–6　培養基材の世界動向について……○藤本　拓（長瀬産業㈱）
11:35　4SY09–7　培地から生産物品質を管理する：トレハロースによる抗体凝集
……○大政健史[1,4]，岩城完三[2]，岡　茂範[3]，鬼塚正義[1]
（[1]徳島大院 STS 研，[2]㈱林原，[3]長瀬産業㈱，[4]大阪大院工）
12:00　おわりに……○大政健史[1]，川向　誠[2]（[1]徳島大院 STS 研，[2]島根大生資）

4SY10　麹菌の機能性研究と育種開発の新潮流～和食への利用を目指して

後　援：糸状菌遺伝子研究会，日本生物工学会微生物共生活用発酵工学研究部会，日本醸造学会 若手の会
3 月 29 日（日）9:00～12:05　B41 会場（一般教育棟 B 棟　4 階）
世話人：丸山潤一（東大院農生科），北垣浩志（佐賀大農）
座　長：丸山潤一（東大院農生科），北垣浩志（佐賀大農）

9:00　はじめに……◦丸山潤一（東大院農生科）
9:05　4SY10–1　『国菌』麹菌の未来 ― ユネスコ無形文化遺産“和食”とともに……◦北本勝ひこ（東大院農生科）
9:25　4SY10–2　麹菌セラミド関連脂質の免疫・表皮・発酵への機能性……◦北垣浩志（佐賀大農）
9:55　4SY10–3　麹のスフィンゴ脂質の機能性について……◦光武　進（佐賀大農）
10:25　4SY10–4　染色体の大規模重複化による麹菌の機能解析と育種への応用……◦高橋　理（野田産業科学研究所）
10:55　4SY10–5　麹菌ゲノムの違いと清酒メタボライトとの関係……◦織田　健[1]，岩下和裕[1,2]（[1]酒総研，[2]広大先端研）
11:25　4SY10–6　麹菌の眠れる能力を拓く～有性生殖能力の開発と交配育種への試み……◦丸山潤一（東大院農生科）
11:55　おわりに……◦北垣浩志（佐賀大農）

4SY11　ポリアミン研究のさらなる発展と新たな展開をめざした農芸化学と医学薬学との融合

3 月 29 日（日）13:30～16:30　A37 会場（一般教育棟 A 棟　3 階）
世話人：鈴木秀之（京工繊大院工芸科学），栗原　新（石川県大・腸内細菌）
座　長：鈴木秀之（京工繊大院工芸科学）

13:30　はじめに……◦鈴木秀之（京工繊大院工芸科学）
13:35　4SY11–1　肝臓機能におけるポリアミン代謝の役割……◦植村武史[1,2,3]，高坂友和[2]，池谷　博[2]，五十嵐一衛[1,3]
（[1]株式会社アミンファーマ研究所，[2]京都府立医大院医，[3]千葉大院薬）
14:05　4SY11–2　ポリアミンによる大腸菌の生理機能の調節……◦照井祐介[1]，五十嵐一衛[2,3]，柏木敬子[1]
（[1]千葉科学大薬，[2]千葉大院薬，[3]株式会社アミンファーマ研究所）
14:35　4SY11–3　腸内細菌のポリアミン代謝・輸送系同定の重要性……◦栗原　新[1]，松本光晴[2]，鈴木秀之[3]
（[1]石川県大・腸内細菌，[2]協同乳業・技術開発，[3]京工繊大院工芸科学）
15:05　4SY11–4　ポリアミンによる哺乳類の寿命延長効果……◦早田邦康（自治医大さいたま医療センター）
15:35　4SY11–5　ポリアミンを含むダイズ胚芽抽出物の開発とスキンケアへの展開……◦春日部芳久（東洋紡株式会社）
16:05　4SY11–6　腸内常在菌が産生するポリアミンの健康寿命伸長効果……◦松本光晴（協同乳業研究所）

4SY12　微生物および植物の「耐熱性」と「耐熱化」

3 月 29 日（日）13:30～16:30　B33 会場（一般教育棟 B 棟　3 階）
世話人：山田　守（山口大院医），松下一信（山口大農），三角修己（山口大院医）
座　長：山田　守（山口大院医），松下一信（山口大農），三角修己（山口大院医）

13:30　はじめに……◦山田　守（山口大院医）
13:35　4SY12–1　酢酸菌の耐熱性育種および **Omics** 解析から見えてくる耐熱性関連遺伝子群
……◦東　慶直（近畿大学生物理工学部）
14:00　4SY12–2　耐熱性 ***Zymomonas mobilis*** の耐熱性および耐熱化
……◦高坂智之[1]，櫻田朋子[2]，白丸優貴[1]，吉田咲紀[2]，山下舞子[2]，
中島康之[2]，松谷峰之介[1]，村田正之[2]，山田　守[1,2]
（[1]山口大農，[2]山口大院医）
14:25　4SY12–3　**Genome and transcriptome analyses of ethanologenic thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* DMKU 3–1042**
……◦Noppon Lertwattanasakul[1], Tomoyuki Kosaka[2], Akira Hosoyama[3], Yutaka Suzuki[4], Nadchanok Rodrussamee[5], Minenosuke Matsutani[2], Masayuki Murata[6], Naoko Fujimoto[6], Suprayogi[6], Keiko Tsuchikane[3], Savitree Limtong[1], Nobuyuki Fujita[3], Mamoru Yamada[2,6]
([1]Kasetsart Univ., [2]Yamaguchi Univ., [3]NITE, [4]Tokyo Univ., [5]Chiang Mai Univ., [6]Yamaguchi Univ. Grad. Sch. of Med.)
14:50　4SY12–4　酵母 ***Kluyveromyces marxianus*** はなぜ高温を好むのか……◦星田尚司（山口大院医）
15:15　4SY12–5　高温，強酸性温泉からの極限環境紅藻の新規単離と有用形質の探索
……◦兼崎　友[1]，重信直人[2]，小田しおり[2]，齋藤夏帆[2]，宮澤和己[2]，渡辺　智[2]，吉川博文[1,2]
（[1]東京農大・NGRC，[2]東京農大バイオ）
15:40　4SY12–6　ナチュラルバリエーションを利用した植物の高温耐性付与遺伝子の探索
……◦太治輝昭[1]，有賀裕剛[1]，Luis Barboza[2]，井内　聖[3]
（[1]東京農大バイオ，[2]コスタリカ大，[3]理研 BRC）
16:05　4SY12–7　実験室高温適応進化した大腸菌からみた高温適応戦略
……◦岸本利彦[1]，四方哲也[2,3]（[1]東邦大理，[2]大阪大院情報科学，生命機能，[3]ERATO JST）
16:28　おわりに……◦松下一信（山口大農）

4SY13　生命恒常性の維持に寄与するケミカルリガンド受容機構の新展開

3 月 29 日（日）13:30〜16:30　B41 会場（一般教育棟 B 棟　4 階）
世話人：宗正晋太郎（岡山大院環境生命），浜本　晋（東北大院工），伊原　誠（近畿大農）
座　長：宗正晋太郎（岡山大院環境生命），浜本　晋（東北大院工），伊原　誠（近畿大農）

13:30　はじめに……宗正晋太郎（岡山大院環境生命）
13:35　4SY13–1　気孔孔辺細胞におけるアブシジン酸シグナル伝達機構の解明……○宗正晋太郎（岡山大院環境生命）
13:50　4SY13–2　ジャスモン酸類のケミカルバイオロジー……○上田　実，石丸泰寛，江越脩佑（東北大院理）
14:20　4SY13–3　酵母の刺激応答性 **TRP** チャネルの解析と **trp** 欠損酵母を用いたイオン輸送体測定系の構築
……○浜本　晋[1]，村西敏郎[1]，森　泰生[2]，矢部　勇[3]，Carpaneto Armando[4]，魚住信之[1]
（[1]東北大院工，[2]京大院工，[3]電機大工，[4]Inst. Biophysics CNR）
14:35　4SY13–4　カチオン・カルシウムチャネルを標的分子とした農薬開発の現状と可能性……○森　泰生（京大院工）
14:05　4SY13–5　ネオニコチノイド研究によって明らかとなったニコチン性アセチルコリン受容体のアゴニスト認識機構……○伊原　誠（近畿大農）
15:20　4SY13–6　植物によるかおり化合物受容……○松井健二（山口大院医）
15:50　4SY13–7　花成ホルモン受容体の構造と機能……○児嶋長次郎（阪大蛋白研）
16:20　総合討論……伊原　誠[1]，浜本　晋[2]（[1]近畿大農，[2]東北大院工）

4SY14　*S*–アデノシルメチオニンが関わる多彩な機能と生産

3 月 29 日（日）9:00〜12:05　D25 会場（一般教育棟 D 棟　2 階）
世話人：藤井　力（酒総研），水沼正樹（広島大院・先端研）
座　長：藤井　力（酒総研），水沼正樹（広島大院・先端研）

9:00　4SY14–1　酵母と *S*–アデノシルメチオニン……○家藤治幸（愛媛大農）
9:40　4SY14–2　清酒酵母の *S*–アデノシルメチオニン高蓄積機構に関する研究……○金井宗良（酒総研）
10:15　4SY14–3　酵母における *S*–アデノシルメチオニンによる寿命制御……○水沼正樹（広島大院・先端研）
10:50　4SY14–4　清酒酵母の新しい機能「睡眠の質の向上」……○物井則幸（ライオン株式会社）
11:25　4SY14–5　醸造副産物の機能性成分　—*S*–アデノシルメチオニンを中心に—
……○藤井　力[1,2]（[1]酒総研，[2]広島大院生物圏）

4SY15　海産生物に含まれる機能性糖鎖による地域活性化戦略

3 月 29 日（日）13:30〜16:30　A36 会場（一般教育棟 A 棟　3 階）
世話人：田村純一（鳥取大地域），大城　隆（鳥取大院工）
座　長：田村純一（鳥取大地域），大城　隆（鳥取大院工）

13:30　はじめに……○田村純一（鳥取大地域）
13:35　4SY15–1　魚介類廃棄部に含まれるコンドロイチン硫酸の微細構造……○田村純一（鳥取大地域）
14:00　4SY15–2　骨の形成者と破壊者を制御するコンドロイチン硫酸
……○保坂善真[1]，田村純一[2]（[1]鳥取大農共同獣医，[2]鳥取大地域）
14:30　4SY15–3　残存タンパクを低減化したキチンナノファイバーの開発
……○黒住誠司[1]，清瀬正敏[1]，高森吉守[1]，佐藤公彦[1]，伊福伸介[2]
（[1]甲陽ケミカル，[2]鳥取大院工）
15:00　4SY15–4　カニ殻由来の新繊維「キチンナノファイバー」の製造とその利用開発……○伊福伸介（鳥取大院工）
15:30　4SY15–5　高分子モズクフコイダンの新たな機能性について……○川本仁志（海産物のきむらや）
16:00　4SY15–6　海藻由来のユニークな酵素……○大城　隆（鳥取大院工）
16:25　おわりに……○大城　隆（鳥取大院工）

4SY16　多様性を基盤にした微生物研究の最前線

共　催：応用微生物研究協議会
3 月 29 日（日）13:30〜16:30　G41 会場（教育学部本館　4 階）
世話人：小林達彦（筑波大生命環境），西山　真（東大生物工学セ）
座　長：小林達彦（筑波大生命環境），西山　真（東大生物工学セ）

13:30　はじめに……◦小林達彦（筑波大生命環境）
13:33　4SY16–1　希少放線菌の「休眠と覚醒」に関する遺伝子発現制御機構 ……◦大西康夫（東大院農生科）
14:02　4SY16–2　アーキアにおける核酸分解機構の解明
……◦跡見晴幸[1,3]，青野　陸[1]，吉井祐太[1]，法土咲菜恵[1]，今中忠行[2,3]，佐藤喬章[1,3]
（[1]京大工，[2]立命館大生命科学，[3]JST）
14:31　4SY16–3　複合培養による微生物潜在機能の発掘……◦尾仲宏康（東大院農生科）
15:00　4SY16–4　水生植物と表層微生物の新しい共生メカニズム ……◦森川正章[1,2]（[1]北海道大環境，[2]JST-ALCA）
15:29　4SY16–5　ゲノムから解き明かすシロアリ腸内複合共生系 ……◦本郷裕一（東工大院生命理工）
15:58　4SY16–6　**Asian Microbiome Project**：アジア人の食と腸内フローラと健康に関する横断型コホート研究
……◦中山二郎[1]，東佳那子[1]，山本麻寿紗[1]，百田理恵[1]，本田倫子[1]，渡辺幸一[2]，リーユアンカン[3]
（[1]九大院農，[2]ヤクルト中研，[3]シンガポール国立大）
16:27　おわりに……◦西山　真（東大生物工学セ）

4SY17　酵母研究が先導する「ユビキチン」サイエンスとテクノロジーの新潮流〜分子認識から創傷治癒まで〜

共　催：酵母ユビキチン研究会
3 月 29 日（日）13:30〜16:30　D25 会場（一般教育棟 D 棟　2 階）
世話人：阿部文快（青山学院大理工），高木博史（奈良先端大バイオ）
座　長：高木博史（奈良先端大バイオ），佐伯　泰（東京都医学総合研），阿部文快（青山学院大理工）

13:30　はじめに……◦阿部文快（青山学院大理工）
13:35　4SY17–1　ユビキチン化による出芽酵母のアミノ酸・ペプチド輸送体の品質管理
……◦阿部文快（青山学院大理工）
14:00　4SY17–2　ユビキチンコードの全容解明を目指して……◦佐伯　泰（東京都医学総合研）
14:25　4SY17–3　細胞創傷治癒におけるユビキチンの役割 ……◦河野恵子，温　欣宜，中西　真（名市大院医）
14:50　4SY17–4　**Ubr** ユビキチンリガーゼによる生理機能の制御……◦北村憲司，藤本菜奈（広島大自然科学研セ）
15:15　4SY17–5　酵母ユビキチンリガーゼ **Rsp5** 変異株のストレス感受性を利用した新規生理活性物質の探索
…… 木村賢一[1,2]，◦渡辺大輔[3]，渡部　涼[1]，上杉祥太[2]，高木博史[3]
（[1]岩手大院農，[2]岩手大院連合農，[3]奈良先端大バイオ）
15:40　4SY17–6　ストレス下のタンパク質品質管理に関与する酵母ユビキチンリガーゼ **Rsp5** の機能解析と産業利用
……◦高木博史（奈良先端大バイオ）
16:05　おわりに……◦高木博史（奈良先端大バイオ）

4SY18　次世代資源：植物糖鎖の糖質科学

3 月 29 日（日）9:00〜12:05　A36 会場（一般教育棟 A 棟　3 階）
世話人：藤山和仁（大阪大生物国際交流センター），石水　毅（立命館大生命），前田　恵（岡山大院環境生命）
座　長：藤山和仁（大阪大生物国際交流センター），石水　毅（立命館大生命），前田　恵（岡山大院環境生命），

9:00　はじめに……◦藤山和仁（大阪大生物国際交流センター）
9:05　4SY18–1　植物は理想のバイオリアクター……◦新名惇彦（奈良先端大）
9:30　4SY18–2　植物細胞壁の構造と機能 ……◦西谷和彦（東北大生命科学）
9:55　4SY18–3　アラビノガラクタンタンパク質糖鎖の人為的操作に向けた新たな試み
……◦田中伸和[1]，小竹敬久[2]（[1]広島大自然センター，[2]埼玉大院理工）
10:20　4SY18–4　高等植物における膜結合型ポリガラクツロナーゼの酵素学的特性解析
……◦大橋貴生，ムスタファナビラーサリ，松下宗義，三崎　亮，藤山和仁
（大阪大生物国際交流センター）
10:45　4SY18–5　遊離 *N*–グリカンの生理機能解析：**ENGase** と **PNGase** の発現を制御した植物体の構築
……◦前田　恵，木村吉伸（岡山大院環境生命）
11:10　4SY18–6　植物細胞壁多糖合成に関わる糖転移酵素の連携
……◦石水　毅[1]，上原洋平[1]，田村峻佑[1]，鶴浜和奈[1]，加藤大詞[1]，
高田和拓[1]，出村　拓[2]，中野仁美[2]，大谷美沙都[2]
（[1]立命館大生命，[2]奈良先端大バイオ）
11:35　最終討論……◦木村吉伸（岡山大院環境生命）

4SY19　農芸化学から越境するメタボロミクス

後　援：ESI 友の会
3 月 29 日（日）13：30～16：30　F11 会場（教育学部講義棟　1 階）
世話人：松田史生（大阪大院情報），及川　彰（山形大院農），三浦大典（九州大レドックスナビ）
座　長：松田史生（大阪大院情報），及川　彰（山形大院農），三浦大典（九州大レドックスナビ）

13：30　4SY19–1　**農業・食品研究のための NMR メタボロミクス**……○関山恭代[1]，冨田　理[1]，根本　直[2]，池田成志[3]
([1](独)農研機構・食総研，[2](独)産総研・バイオメディカル，[3](独)農研機構・北農研)

14：00　4SY19–2　**LC–MS による大規模コホートメタボローム解析**
……○三枝大輔[1,2]，加藤恭丈[1,2]，小柴生造[1]，元池育子[1,3]，荻島創一[1,2]，本橋ほづみ[1,4]，菅原準一[1,2]，中谷　純[1,2]，寶澤　篤[1,2]，峯岸直子[1,2]，木下賢吾[1,3]，田邉　修[1]，山本雅之[1,2]
([1]東北大メガバンク，[2]東北大医，[3]東北大情報，[4]東北大加齢研)

14：30　4SY19–3　メタボロミクスと天然物化学の統合……○中林　亮（理研 CSRS）

15：00　4SY19–4　食品の安全を守るメタボロミクス　ー超臨界流体テクノロジーの残留農薬分析への応用
……○馬場健史（大阪大院工生命先端）

15：30　4SY19–5　地域農産物のメタボロミクス……○及川　彰（山形大農）

16：00　4SY19–6　質量イメージングの農芸化学・医学分野への応用……○三浦大典（九州大レドックスナビ）

4SY20　生体の発達・成長・維持における栄養とホルモン作用の分子機序

3 月 29 日（日）9：00～12：05　F22 会場（教育学部講義棟　2 階）
世話人：後藤　剛（京都大院農），亀井康富（京都府立大生命環境）
座　長：後藤　剛（京都大院農），亀井康富（京都府立大生命環境）

9：00　4SY20–1　外因性因子による褐色脂肪細胞機能亢進機構の解析
……○後藤　剛[1,2]，高橋信之[1,2]，河田照雄[1,2]（[1]京都大院農，[2]京都大生理化学ユニット）

9：30　4SY20–2　ケトジェニックダイエットが生体に及ぼす影響……○山本祐司，小林謙一，鈴木　司（東京農大）

10：00　4SY20–3　構造－活性相関情報に基づいた食品タンパク質由来ペプチドの機能性予測とその実際
……○大日向耕作（京都大院農）

10：30　4SY20–4　**Molecular mechanisms of endocrine hormones in human and animal homeostasis**
……○Simon. J Rhodes（Indiana University）

11：00　4SY20–5　線虫を用いた分子栄養学的アプローチ……○松本晋也（京都女子大家政）

11：30　4SY20–6　核内受容体転写共役因子による生体の外部・内部の環境変化に対する適応の分子機序
……○亀井康富[1]，三浦進司[2]（[1]京都府立大生命環境，[2]静岡県立大食品栄養）

4SY21　ロコモティブシンドロームとメカニカルストレス～農芸化学が貢献できること～

3 月 29 日（日）9：00～12：05　A37 会場（一般教育棟 A 棟　3 階）
世話人：木岡紀幸（京大院農），深田　尚（大阪府大院生命）
座　長：木岡紀幸（京大院農），深田　尚（大阪府大院生命）

9：00　はじめに……○木岡紀幸（京大院農）

9：03　4SY21–1　生体恒常性維持における「善玉」メカニカルストレスと「悪玉」メカニカルストレス
……○澤田泰宏[1,2]，原田伊知郎[2]
([1]国立障害者リハビリテーションセンター研究所運動機能系障害研究部，[2]名戸ヶ谷病院ロコモティブシンドローム研究所メカノメディスン部)

9：30　4SY21–2　細胞外基質の硬さを感知するメカノセンサー……○木岡紀幸（京大院農）

9：52　4SY21–3　旋回振とうによる流体刺激が **MG–63** 骨肉腫細胞株に引き起こす力学応答の特性について
……○深田　尚，杉本憲治（大阪府大生命）

10：14　4SY21–4　無重力による筋細胞のシグナルトランスダクションと筋萎縮
……○二川　健[1]，越智ありさ[1]，高木麻理奈[1]，北畑香菜子[1]，安倍知己[1]，真板(大野)綾子[1]，近藤(手嶋)茂忠[1]，赤間一仁[2]
([1]徳島大医栄，[2]島根大生物資源)

10：41　4SY21–5　転写調節因子 **PGC–1α** および **FOXO1** と骨格筋機能
……○三浦進司[1]，亀井康富[2]（[1]静岡県大食品栄養，[2]京都府大生命環境）

11：08　4SY21–6　ロコモティブシンドロームにおける細胞内スーパーオキサイドの病態生理学的意義
……○清水孝彦（千葉大院医）

11：35　4SY21–7　サルコペニアとアミノ酸……○小田嶋文彦，小林久峰（味の素株式会社）

12：02　おわりに……○深田　尚（大阪府大院生命）

4SY22　農業に貢献する環境バイオテクノロジー～古くて新しい『堆肥化技術』複雑系から環境保全・資源循環に向けて～

共　催：環境バイオテクノロジー学会
3 月 29 日（日）13:30～16:30　F22 会場（教育学部講義棟　2 階）
世話人：加藤純一（広島大院先端物質），宮内啓介（東北学院大工），木邑敏章（トヨタ自動車・バイオ・緑化研）
座　長：宮内啓介（東北学院大工）(4SY22–1, 2)，加藤純一（広島大院先端物質）(4SY22–3, 4)，
野尻秀昭（東大生物工学セ）(4SY22–5, 6)

13:30　はじめに……○遠藤銀朗（東北学院大工）
13:35　シンポジウム趣旨説明……○木邑敏章（トヨタ自動車・バイオ・緑化研）
13:40　4SY22–1　複雑微生物系－ひとつの生態系としての理解と利用－……○春田　伸（首都大）
14:05　4SY22–2　堆肥化施設の苦悩と現場ニーズに対応したシステム開発……○宮竹史仁（帯畜大）
14:30　4SY22–3　畜産廃水処理システム由来の固形廃棄物の堆肥化における環境負荷低減化
……○大坪和香子[1]，上田英代[2]，上田裕一[2]，渡辺　昭[3]，宮内啓介[1]，遠藤銀朗[1]
([1]東北学院大工，[2]有限会社日本ライフセンター，[3]水 ing 株式会社)
15:10　4SY22–4　畜産農家をレスキューする堆肥化促進・消臭資材……○木邑敏章（トヨタ自動車・バイオ・緑化研）
15:35　4SY22–5　家畜ふん堆肥の肥料代替を進めるためのペレット成型と窒素付加
……○荒川祐介（農研機構・九州沖縄農研）
16:00　4SY22–6　硝酸発酵・・・根と土壌を解明するブレークスルー……○篠原　信（農研機構・野茶研）
16:25　おわりに……○加藤純一（広島大院先端物質）

4SY23　地域資源で東北を元気にするグローカルな農芸化学～食品から機能性研究へ～

3 月 29 日（日）9:00～12:05　G41 会場（教育学部本館　4 階）
世話人：木村賢一（岩手大農），長澤孝志（岩手大農）
座　長：木村賢一（岩手大農），長澤孝志（岩手大農）

9:00　はじめに……○木村賢一（岩手大農）
9:03　4SY23–1　久慈産琥珀と山菜のシドケ（モミジガサ）の生物活性物質のケミカルバイオロジー
……○木村賢一（岩手大農）
9:33　4SY23–2　ヤマブドウの健康機能性……○長澤孝志[1]，小浜恵子[2]（[1]岩手大農，[2]岩手県工業技術センター）
10:03　4SY23–3　水産物（ナマコ）および農産物（雑穀）の機能成分を活用した地域産業支援
……○矢野　明[1]，岸　光男[2]（[1]岩手生工研，[2]岩手医科大）
10:33　4SY23–4　理論に基づく水産加工食品の製造方法の開発……○三浦　靖（岩手大農）
11:03　4SY23–5　サメの丸ごと利用で震災復興を……○野村義宏[1]，上原一貴[1]，渡部睦人[1]，今井直也[2]，高橋　滉[2]
([1]東京農工大農，[2]中華・高橋)
11:33　4SY23–6　サケ氷頭由来プロテオグリカンの機能性食品への応用……○加藤陽治（弘前大教）
12:03　おわりに……○長澤孝志（岩手大農）

講演番号：4SY01-1
講演日時、会場：3 月 29 日 9:05～ A 校舎 21 会場

がん治療薬開発のソースとしての漢方薬　－漢方薬とがん転移－

Kampo medicine as a source for developing new anticancer therapies.　- Kampo medicines and cancer metastasis -

○済木 育夫（富山大和漢医薬研）
○Ikuo SAIKI (Univ. Toyama, Inst Nat. Med.)

漢方薬のがん治療における守備範囲としては、通常の標準治療における副作用の防止、術後の体力回復、効果の増強、日和見感染の防止、再発・転移の予防、がん体質の改善など多くの報告がある。本発表では、がん細胞の転移に及ぼす漢方薬の効果とその作用機序に関する私どもの基礎研究の一部を紹介するとともに、がん治療薬の開発のソースとしての可能性についても触れる。

臨床特性を反映したがん転移の病態モデルにおいて、十全大補湯、補中益気湯などの漢方薬：補剤が、明らかに異なった免疫系細胞の活性化を介した転移抑制のメカニズムを示し、その効果発現には漢方薬中の構成処方や個々の生薬の役割分担と組み合わせが重要な役割を果たしていることを明らかにしてきた。また、自然免疫系に関わるシグナル伝達分子 NF-κB, p38 のリン酸化を増強し、JNK, ERK のリン酸化を低下するなどの成果も得ており、多成分系の漢方薬による新たな展開の手がかりを得つつある。

漢方医学的な病態認識としての「証」に影響しうる因子の一つとして、腸内細菌の存在などがあげられ、漢方薬の効果発現に大きく影響している。漢方薬の主要な構成生薬の一つである人参に含まれるサポニン成分によるメラノーマ細胞の肺転移の抑制効果の発現は、腸内細菌によるその代謝産物 (M1 あるいは M4) を介して起り、サポニンを代謝分解できる能力の高い（腸内細菌を有する）マウスは、低いマウスに比較して転移の抑制効果が高く、良く相関していることを明らかにした。

漢方生薬：黄連や黄柏の主成分であるベルベリンは止瀉、抗炎症、抗菌作用、抗コレステロール作用などを有し、同所性移植した肺がんの縦隔リンパ節転移を抑制し、塩酸イリノテカン(CPT-11)との併用により移植部位の腫瘍増殖ならびにリンパ節転移を相乗的に抑制した。その転移抑制の機序として，転移関連分子の発現に関わる転写因子 AP-1 の活性抑制の関与を明らかにした。

また、漢方生薬：牛蒡子中のアルクチゲニンがヌードマウスを用いた実験で顕著な膵癌細胞増殖抑制効果があることも見出され，この成果を踏まえ、現在臨床試験が実施されている。

kampo medicine, cancer metastasis, new drug

講演番号：4SY01-2
講演日時、会場：3 月 29 日 9:32～ A 校舎 21 会場

ゼブラフィッシュの化学遺伝学を利用した抗がん剤シード探索と毒性予測

Chemical genetics in zebrafish identifies anticancer drug seeds and predicts toxicity

○西谷 直之（岩手医大薬）
○Naoyuki Nishiya (Iwate Medical University)

モデル生物を用いた遺伝学は、種を超えて保存された重要な生命現象の発見をもたらしてきた。特に、エンハンサー変異体やサプレッサー変異体の同定が、これらの制御系シグナル伝達経路の解明に大きく貢献した。受容体型チロシンキナーゼから MAPK カスケードに至る経路は、その典型例である。我々は、遺伝学的手法を薬理学的手法に置き換え、「医薬品候補のスクリーニング」や「薬物相互作用の予測」への応用を試みている。

体長数 mm のゼブラフィッシュ胚は、96 穴プレート中で脊椎動物の *in vivo* 評価を可能とする。胚発生に寄与するがん原遺伝子機能の抑制を指標にすると、個体にがんを発生させることなく *in vivo* でがん化シグナルに対する抑制活性を評価できる。例えば、ゼブラフィッシュ受精卵を GSK3 阻害剤で処理すると、Wnt/beta-catenin 経路が活性化され、特徴的な「眼の形成不全（eyeless）」表現型を誘導する。そこで、eyeless 表現型を正常に回復させる化合物を探索することによって、大腸がんをはじめとする多くのがんで活性化している Wnt/beta-catenin 経路の阻害剤が同定できる。すなわち、遺伝学のサプレッサー変異体の探索と類似した概念による化学サプレッサーの探索である。

我々は、天然物由来ライブラリーや FDA 承認済み医薬品などを評価し、複数の化合物を Wnt/beta-catenin 経路阻害剤として同定してきた(1)。これらの化合物は、哺乳類細胞中で beta-catenin の分解誘導や核移行阻害を引き起こし、beta-catenin 依存性転写活性を低下させた。さらに、Wnt/beta-catenin 経路に依存するがん細胞株の増殖やマウスモデルでの造腫瘍性に対して抑制効果を示した。したがって、eyeless 表現型に対する化学サプレッサーの探索は、新規生理活性物質の発掘や既存医薬品への Wnt/beta-catenin 経路阻害剤としての新機能の付加に寄与すると考えられる。さらに、これらの化合物を用いることによって、胚発生を人為的に操作することができるため、再生医療分野への応用も期待される。

ゼブラフィッシュ胚は、脊椎動物での毒性評価にも有用なツールである。遺伝学のエンハンサー変異体の探索と類似した概念を用い、薬物の組み合わせの影響を評価する方法として化学エンハンサー探索への展開も試みている。薬物の相加・相乗作用を検出することによって、毒性発現の危険因子となり得る薬物相互作用や遺伝的バックグラウンドを特定し、臨床で問題となる副作用の予測法に応用できる可能性がある。

参考文献　(1) Nishiya, N. *et al*., *Chemistry and Biology*, **21**, 530-540 (2014).

chemical genetics, beta-catenin, toxicity

講演番号：4SY01-3
講演日時、会場：3 月 29 日 9:59～ A 校舎 21 会場

エストロゲン受容体制御分子 BIG3 を標的とした新規ホルモン依存性乳がん治療法の開発

Novel therapeutic strategy for estrogen-dependent breast cancer targeting BIG3-PHB2 interaction

○片桐 豊雅[1]、吉丸 哲郎[1]、小松 正人[1]、田代 悦[2]、井本 正哉[2]、長田 裕之[3]([1]徳島大疾患プロテオゲノム、[2]慶應大理工、[3]理研)
○Toyomasa Katagiri[1], Tetsuro Yoshimaru[1], Masato Komatsu[1], Etsu Tashiro[2], Masaya Imoto[2], Hiroyuki Osada[3] ([1]Univ. Tokushima, [2]Keio Univ., [3]RIKEN)

われわれは、これまで乳がん特異的に発現亢進を認める新規エストロゲン受容体（ERα）活性化制御分子 BIG3 を同定し、ERα陽性乳がん細胞において BIG3 が細胞質内で PHB2（Prohibitin 2）と結合し、PHB2 のエストロゲン（E2）依存性 ERα活性抑制機能を封じ込めることで ERα の恒常的な活性化を導くという、新たな E2 依存性 ERα活性化機構を提唱している。さらに、新たな治療法開発の観点から、PHB2 の ERα活性化抑制機能に着目し、BIG3-PHB2 相互作用を標的とした結合阻害ドミナントネガティブ・ペプチド（ERAP ペプチド）を開発し、このペプチドにより BIG3 から解放された PHB2 が ERα に結合することで E2 依存性の活性化を抑制し、ERα陽性乳がんに対して抗腫瘍効果を導くことを明らかにした。次に、ERAP ペプチドよりも安定的に抗腫瘍効果を導くことができる化合物による治療薬開発を目的に、PHB2 と結合を認める天然化合物 A に着目し、その ER 陽性乳がんに対する抗腫瘍効果を検討した。その結果、天然化合物 A は、ERAP ペプチドと同様に、BIG3 と PHB2 の結合を効率的に阻害して PHB2 の ERα活性の抑制機能を誘導し、E2 依存性乳がん細増殖の顕著な抑制を示すことがわかった。以上の成果は、BIG3-PHB2 相互作用阻害薬はホルモン依存性乳がん、特に、内分泌療法耐性を獲得した難治性乳がんに対して新たな治療薬になりえる可能性を示唆するものである。

Breast cancer, estrogen, tumor suppressor

講演番号：4SY01-4
講演日時、会場：3 月 29 日 10:26～ A 校舎 21 会場

バイオイメージング技術の開発と医学研究・創薬応用

Development and application of fluorescence imaging technology for medical research and drug discovery

○今村 健志（愛媛大医）
○Takeshi Imamura (Ehime Univ. Grad. Sch. of Med.)

近年の科学技術の進歩により、医学・医療は飛躍的に発展し、さまざまな病態の分子メカニズムの明らかにされ、分子標的治療薬などの新規治療法の開発が進んだ。一方で、最先端の医学研究の成果は、われわれに疾病の病態の複雑さと創薬の難しさを教えてくれた。すなわち、複雑な病態を持つ疾病の分子メカニズムの解明と創薬には、従来の細胞をすり潰す *in vitro* の生化学的解析や組織を固定する病理解析のみでは限界があり、*in vivo* で動物が生きたまま細胞や分子を解析することが必須である。このような医学研究と創薬を取り巻く環境の中、蛍光タンパク質・蛍光有機小分子の発見や開発、顕微鏡やカメラなどの機器の性能の向上により、蛍光イメージング技術を用いて生きている動物の中で起こっている現象を分子レベルでイメージングする革新的技術が台頭し、その医学研究・創薬研究への応用が急速に進んでいる。

本発表では、蛍光技術を駆使して生体内で細胞や分子を解析するイメージング技術について、がん研究分野におけるわれわれの最近の知見、特に技術革新と研究の進歩について紹介する。具体的には、蛍光タンパク質の遺伝子を導入したがん細胞とさまざまな蛍光有機小分子プローブを用いたマウスがん移植モデルにおけるがん新生血管のイメージング、抗 vascular endothelial growth factor (VEGF)抗体のがん血管新生に対する効果評価における蛍光生体イメージングの有用性を示す。また、複数の蛍光有機小分子プローブを用いた、血管、プロテアーゼ活性とがん細胞などの多元的蛍光イメージングの例を紹介する。さらに、細胞周期をイメージングする Fluorescent Ubiqutination-based Cell Cycle Indicator (Fucci)システムを用いて、骨に転移したがん細胞の細胞周期のイメージングをおこなった実験結果を紹介する。

さらに、より生体深部のイメージングのためのわれわれが開発した新たなイメージング技術、特に非線形光学を駆使した蛍光観察について、新規補償光学型長波長２光子励起顕微鏡開発の例を示し、蛍光生体イメージングの技術革新の現状と今後、さらにその医学研究・創薬応用の可能性について考察する。

fluorescence imaging, medical research, drug discovery

講演番号：4SY01-5
講演日時、会場：3 月 29 日 10:53～ A 校舎 21 会場

微生物由来天然化合物の治療薬シードへの展開

Drug seed generation based on natural product chemical biology

○井本 正哉、田代 悦（慶應大理工）
○Masaya Imoto, Etsu Tashiro (Keio Univ.)

疾患治療薬の開発の歴史において重要な役割を演じたのが天然化合物であった．実際に過去 20 年間で認可された医薬品のうち，天然化合物およびそれをリードとした化合物はおよそ 60%にものぼる．しかし，次第に医薬品リード化合物探索は合成化合物ライブラリーを用いたスクリーニングへとシフトするようになった．ただ，この方法からは期待されたほどの成果がほとんどあがっていないことが次第に明らかになってきており，再び治療薬シードとして構造多様性を有する天然化合物が見直されつつある．

一方，小分子化合物を用いて生命現象を解析するケミカルバイオロジー研究の展開の中から，ゲノムネットワークやタンパク質に作用する小分子化合物の標的分子が疾患関連分子である場合には疾患治療薬の新たな標的の提唱につながるだけでなく，その小分子化合物自身が分子標的治療薬のリード化合物になる可能性もある．このことから従来の天然物スクリーニングだけでなくケミカルバイオロジーからの創薬研究も今後ますます期待される．

本シンポジウムでは我々が取り組んでいる微生物由来天然化合物の探索研究と疾患治療薬シード開発への展開について述べる．

Natural product, Chemical biology, Drug seed generation

講演番号：4SY01-6
講演日時、会場：3 月 29 日 11:20～ A 校舎 21 会場

破骨細胞を標的とするリベロマイシンA
Reveromycin A targeting osteoclasts

○長田 裕之（理研・環境資源セ）
○HIROYUKI OSADA (RIKEN CSRS)

微生物代謝産物は、抗生物質など様々な有用生理活性物質の宝庫である。我々は、その中から目的の生理活性物質を探索するために、バイオアッセイ法を考案して新規化合物をスクリーニングしている。しかし、スクリーニングでヒットした化合物を精製してみると、期待した標的分子に作用するのではなく、別の標的分子に作用することを、しばしば体験する。以前、我々は、微生物代謝産物から新規抗がん剤を探索するために、細胞増殖因子（EGF）のシグナル伝達阻害剤をスクリーニングした。そのスクリーニング系で見出した reveromycin A（RMA）が、異分野交流の結果、破骨細胞の異常亢進に起因する様々な疾病（骨粗鬆症、がんの骨転移、多発性骨髄腫、歯周病）に顕著な治療効果を示したので紹介する。

放線菌 *Streptomyces reveromyceticus* から単離された RMA は、三つのカルボン酸を有する酸性化合物であるため、通常の細胞には取り込まれにくい。放射性同位体標識した RMA を用いて、RMA は、酸性環境を形成する成熟破骨細胞に、選択的に取り込まれることを明らかにした。卵巣摘出マウスでは、破骨細胞の機能が異常亢進して、骨粗鬆症にかかるが、RMA を皮下投与したマウスでは、骨密度の低下が顕著に抑制された。また、SCID マウスに多臓器転移能を有するがん細胞を注入し、がんの転移を観察したところ、RMA 投与群では、がんの骨転移がほぼ完全に抑制された。多発性骨髄腫モデルマウスでは、既存薬のボルテゾミブよりも強力な治療効果を有することが示された。歯周病モデルマウスでも、RMA は、強力な予防効果を示すことが明らかになった。

bone, osteoclast, inhibitor

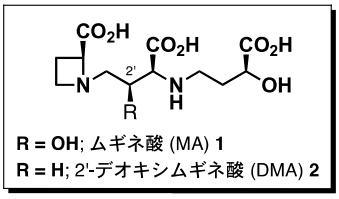
講演番号：4SY02-1
講演日時、会場：3 月 29 日 13:35～ A 校舎 21 会場

イネ科植物の鉄イオン取り込み機構に関する有機化学的研究

Organic Chemistry Research on Iron Acquisition in Graminaceous Plants

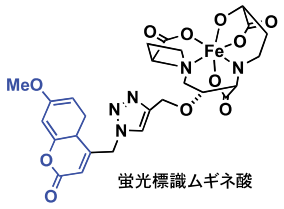
○難波 康祐（徳島大薬）
○Kosuke Namba (Tokushima Univ.)

アルカリ性不良土壌において鉄は水不溶態となっており、通常の植物は根から鉄を吸収できず正常に生育しない。これに対してオオムギは根からムギネ酸（MA）**1** を分泌し、不溶態鉄をムギネ酸・鉄錯体として可溶化しトランスポーター（HvYS1）を介して取り込む鉄欠乏耐性メカニズムを備えている。我々は、オオムギの鉄取り込み機構の分子レベルでの解明およびムギネ酸類の土壌改良剤としての大量供給を目指している。



我々はこれまでに、ムギネ酸と同等の鉄輸送活性を有する 2'－デオキシムギネ酸 **2**（DMA）の実践的合成法を確立した。[1] 本法により必要量の DMA が合成出来たことから、DMA を実際にイネのアルカリ性培地に添加したところ、通常のイネがアルカリ性培地においても非常に良く生育することが分かった。この実用化を進めれば世界的な食糧問題の解決に大きく貢献できるものと期待されることから、現在 DMA の更なる大量供給を目指している。

また、イネ科植物の鉄イオン取り込み機構を分子レベルで解明するために、ムギネ酸のプローブ化法の開発も行ったので併せて報告する。本プローブ化法によって得られた蛍光標識ムギネ酸・鉄錯体を用いて鉄イオン取り込み実験を行ったところ、トランスポーターを発現させた細胞内で蛍光が観測された。これにより、ムギネ酸がトランスポーターを通過して細胞内に取り込まれることを実験的に証明することができた。[2] そこで、ムギネ酸類の組織内での挙動追跡を可能にする新たな蛍光素材の開発を行った結果、1,3a,6a-トリアザペンタレン（TAP）がコンパクトな構造ながらも優れた蛍光特性を有する画期的な蛍光分子であることを見出し、その一段階合成法を開発した。[3] 以上の研究成果として、本講演会では次の 3 点について詳細に解説する。



（１）ムギネ酸類の実用的合成法の確立
（２）ムギネ酸プローブ化法の開発
（３）新規蛍光分子 1,3a,6a-トリアザペンタレンの開発と蛍光標識試薬への展開

1) Namba, K.; Murata, Y.; Horikawa, M.; Iwashita, T.; Kusumoto, S. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2007**, *46*, 7060-7063.
2) Namba, K.; Kobayashi, K.; Murata, Y.; Hirakawa, H.; Yamagaki, T.; Iwashita, T.; Nishizawa, M.; Kusumoto, S.; Tanino, K. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49,* 9956-9959.
3) Namba, K.; Osawa, A.; Ishizaka, S.; Kitamura, N.; Tanino, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133,* 11466-11469.

mugineic acid, fluorescent chromophore, 1,3a,6a-triazapentalene

講演番号：4SY02-2
講演日時、会場：3 月 29 日 14:05～ A 校舎 21 会場

タンパク質膜挿入・膜透過に関与する糖脂質酵素（Glycolipozyme）MPIase の構造と機能
Structure and function of MPIase, a glycolipozyme involved in membrane protein integration and preprotein translocation

○西山 賢一[1]、前田 将秀[2]、Moser Michael[1]、楠本 正一[2]、徳田 元[3]、島本 啓子[2] ([1]岩手大・農・寒冷バイオ、[2]サントリー生命科学財団・生有研、[3]盛岡大・栄養科学部)
○Ken-ichi Nishiyama[1], Masahide Maeda[2], Michael Moser[1], Shoichi Kusumoto[2], Hajime Tokuda[3], Keiko Shimamoto[2] ([1]CRC, Iwate Univ., [2]Bioorganic Research Institute, Suntory Foundation for Life Sciences, [3]The Univ. of Morioka)

分泌タンパク質や膜タンパク質は、細胞質で生合成された後、それぞれ生体膜を透過したり、膜挿入して、最終局在場所に輸送される。タンパク質膜挿入・膜透過の分子機構については、基本的な部分ではすべての生物で保存されていると考えられている。我々は、タンパク質膜挿入や膜透過の詳細な分子機構を明らかにするため、モデル生物大腸菌を用いてこれらの反応を試験管内で再構成することを試みてきた。その結果、ほぼすべての膜透過や膜挿入反応について、精製因子のみから再構成することに成功した。これらの反応には、タンパク質以外の因子が必須であった。この因子は糖脂質であることが判明し、構造を決定した（図 1）。一部の膜タンパク質はこの糖脂質のみに依存して膜挿入することから、この糖脂質を MPIase（*M*embrane *P*rotein *I*ntegr*ase*）と命名した。MPIase の糖鎖部分は、膜タンパク質と直接相互作用して凝集を防ぐ分子シャペロン様の機能をもち、この相互作用を経て膜挿入反応が触媒された。これらのことから、MPIase は、糖脂質でありながら酵素様の機能をもつ「糖脂質酵素（Glycolipozyme）」であるという概念を提唱した[1]。さらに、MPIase はタンパク質膜透過チャネル SecYEG に直接働きかけ、SecYEG の二量体構造を大きく変化させることも明らかになった。この構造変化により SecG の膜内配向性の反転サイクルの作動が可能となり、その結果、タンパク質膜透過活性は 10 倍以上に促進されることが明らかになった[2]。また、最近結晶構造が明らかになった YidC[3] は、タンパク質膜挿入に関与することが知られていながらその詳細な機能に関して議論が分かれていた。MPIase は YidC と協調的に作用し、MPIase 依存の膜挿入反応は YidC により加速することが明らかになった。このことは MPIase と YidC は直接相互作用することを強く示唆している。

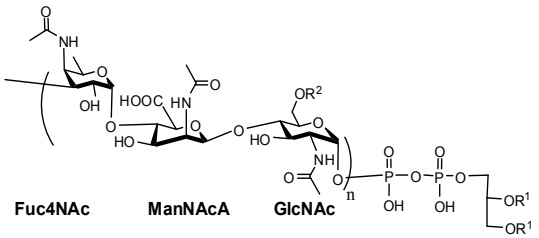


図 1 MPIase の構造。 n=9~11; R^1, C_{16} あるいは C_{18} の脂肪酸; R^2, Ac あるいは H.

1. Nishiyama, K. et al. *Nat. Commun.* 3, 1260 (2012).
2. Moser, M., et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110, 9734-9739 (2013).
3. Kumazaki, K. et al. *Nature* 509, 516-520 (2014).

membrane protein integration, preprotein translocation, MPIase

講演番号：4SY02-3
講演日時、会場：3 月 29 日 14:35～ A 校舎 21 会場

二フッ化シアル酸：インフルエンザ・シアリダーゼの機構解明と共有結合阻害剤の開発

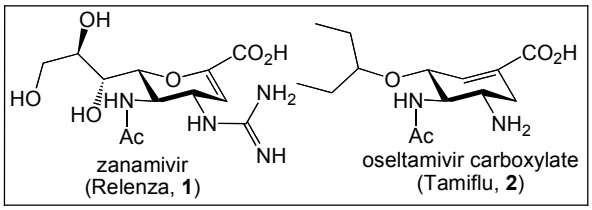
Difluorosialic acid: elucidation of nucleophilic mechanism and covalent inhibition of influenza sialidases

○清田 洋正[1]、バブリチカ クリストファー[1,2]、田中 皓祐[3]、鈴木 康夫[4]、桑原 重文[3]、大類 洋[5]、高 福[2] ([1]岡山大院・環境生命、[2]中国科学アカデミー、[3]東北大院農、[4]中部大、[5]横浜薬科大)
○ Hiromasa Kiyota[1], Christopher Vavricka[1,2], Kosuke Tanaka[3], Yasuo Suzuki[4], Shigefumi Kuwahara[3], Hiroshi Ohrui[5], Fu Gao[2] ([1]Okayama Univ., [2]Chinese Academy of Science, [3]Tohoku Univ., [4]Chubu Univ., [5]Yokohama College of Pharmacy)

新規なインフルエンザ治療薬の開発は、パンデミックに備えるために重要な課題である。これまで、ウィルスの出芽段階で機能するシアリダーゼを標的とした創薬が展開され、リレンザ (**1**)、タミフル (**2**) 等が上市されてきたが、頭痛、異常行動などの副作用や抵抗性株の出現が問題となっている。

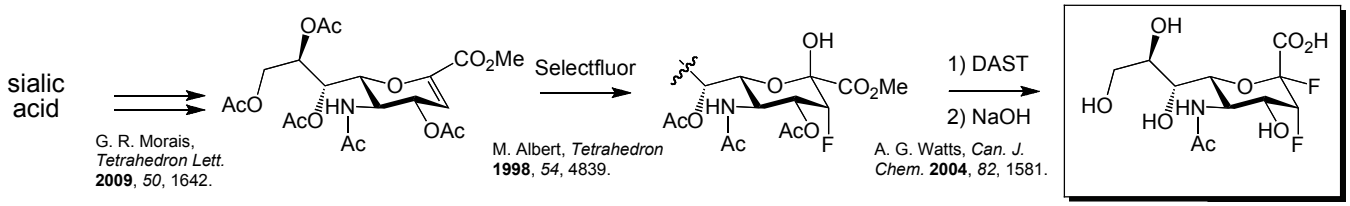
１．インフルエンザ・シアリダーゼの酵素触媒機構の解明

アジアインフルエンザ･シアリダーゼの活性中心部にあるチロシン残基 Tyr406 のヒドロキシ基が、糖鎖加水分解において求核的に働き、二重反転（保持）機構であることを 3'-sialyllactose をアナログ基質とした酵素反応実験により明らかにした[1]。



２．共有結合形成型阻害剤の開発

Try406 が求核攻撃に関与する機構を確定するため、トリパノソーマ・シアリダーゼに用いられた 2α,3α-difluorosialic acid (**3**)を、安定な共有結合形成を狙って合成した[2]。即ち、2 位 F 基は良い脱離基であり、3 位 F 基は、中間体として生成するオキソニウムカチオンの不安定化を図るものである。酵素と **3** との共結晶 X 線解析で Tyr406 残基と **3** のアノマー位（2 位）との間に共有結合形成が確認されたことから、本酵素における二重反転機構を確定した。



３．シアリダーゼ阻害試験

各種インフルエンザウィルスのシアリダーゼに対する阻害活性試験を行った。最初の共有結合型阻害剤である **3** は、B 型ウィルスではリレンザ・タミフルと同等の活性を示した。またタミフル耐性株に対しても阻害活性を保持していた。同時に合成した 2β,2β型の異性体には殆ど活性はなかった。

[1] C. J. Vavricka, Y. Liu, H. Kiyota, N. Sriwilaijaroen, J. X. Qi, K. Tanaka, Y. Wu, Q. Li, Y. Li, J. H. Yan, Y. Suzuki, G. F. Gao, *Nat. Commun.* **2013**, *4*, 1491. [2] A. G. Watts *et al.*, *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 4149.

influenza sialidase, organofluorine, sialic acid

講演番号：4SY02-4
講演日時、会場：3 月 29 日 15:05～ A 校舎 21 会場

疾患シグナルに作用する天然物スクリーニング研究

Natural products screening study on disease signaling pathways

○石橋 正己 (千葉大学)
○Masami Ishibashi (Chiba Univ.)

当研究室では，種々の疾患に関連する細胞内シグナルに作用する天然物スクリーニングを基盤として，天然資源コレクションの構築，活性化合物（低分子天然物）の探索，合成化合物ライブラリー構築，細胞アッセイ，細胞応答解析，活性作用発現に関する分子機構の解析等の一連の包括的研究を行っている．とくに最近では，日本国内の土壌や海水・海泥から採取した放線菌，タイやバングラデシュ産の薬用植物など種々の天然資源をスクリーニング材料として，次のような疾患や幹細胞の制御に関わる細胞内シグナルをスクリーニング対象として取り上げた研究を行っている．

1) TRAIL (Tumor necrosis factor (TNF)-Related Apoptosis-Inducing Ligand)はがん細胞選択的にアポトーシスを誘導するデスリガンドである．そこで，この TRAIL の有効性を高めるために，デス受容体発現誘導作用および TRAIL 耐性克服作用に関するスクリーニングを行った．
2) Wnt シグナルは細胞の発生，分化，増殖等において重要な役割を担っているが，一方で本シグナルの異常亢進が大腸がん等の発生や拡大の原因となることが知られている．そこで，本シグナル経路における転写因子 TCF/β-カテニンに着目し，その転写活性を阻害する天然物のスクリーニングを実施した．
3) Hh シグナル伝達経路は，胚発生における形態形成において重要な役割を果たしているが，一方で本シグナルの異常亢進が膵臓がん等の発生や拡大に関与することが報告されている．当研究室では本経路における転写因子 GLI1 の転写阻害活性に関する細胞アッセイ系を構築し，スクリーニング研究を行った．
4) bHLH (basic-helix-loop-helix) 転写因子は，神経幹細胞の分化および維持増殖を制御するシグナル分子である．当研究室では，抑制型 bHLH 転写因子 Hes1 に注目した種々のタンパク質および細胞アッセイシステムを構築し，天然物および天然物基盤構造をもつ合成化合物ライブラリーを活用したスクリーニング研究を行ってきた．

本シンポジウムでは，これら疾患関連シグナルに作用する天然物スクリーニング研究の概要について紹介する．

natural products, screening, disease

講演番号：4SY02-5
講演日時、会場：3 月 29 日 15:35～ A 校舎 21 会場

ケミカルゲノミクス：生理活性物質標的同定に向けた網羅的アプローチ
Chemical Genomics: A global approach to target identification of bioactive compounds
○吉田 稔[1]、八代田 陽子[1]、松本 健[2] ([1]理研・環境資源、[2]理研・化学遺伝)
○Minoru Yoshida[1], Yoko Yashiroda[1], Ken Matsumoto[2] ([1]CSRS, RIKEN, [2]Chem. Genet., RIKEN)

天然生理活性物質（天然物）の活性発現メカニズムの解明は、医薬品開発の応用面にとどまらず、生命現象の根幹となる分子機構を解明し、新しい創薬標的を生み出す点で重要な研究分野である。その研究プロセスは突然変異の原因遺伝子を明らかにする遺伝学と類似性が高い。遺伝子と表現型の因果関係を分子レベルで明らかにする分子遺伝学が突然変異を出発点として、表現型の原因となる遺伝子を研究対象とするのに対し、演者らが取り組んできた低分子生理活性物質の作用機序研究は、突然変異の代わりに特異な生理活性（表現型）を示す化合物を出発点とし、その原因となる標的分子を同定し、機能を明らかにする「化学遺伝学」である。化学遺伝学では、突然変異を用いる遺伝学と異なり、標的遺伝子塩基配列にダメージを与えず、迅速、可逆的に遺伝子機能阻害を誘導できることから複雑で冗長性のある高等動物の遺伝子機能解析に優れている。しかし、生理活性物質の作用機構研究は従来、生化学的に試行錯誤を繰り返し、研究の成否は研究者の経験と勘にゆだねられる部分が大きかった。そこで我々は、分子遺伝学を基盤にポストゲノムツールと合成化学的アプローチを組み合わせ、論理的、組織的に薬剤標的分子を同定する方法論を確立することを目指している。

我々は Leptomycin B の作用機構解析の経験から、出芽酵母に比べて薬剤感受性が高い分裂酵母が薬剤作用機構解析の良いモデルになると考え、分裂酵母を用いたケミカルゲノミクスの確立を目指した。まず、ゲノムにコードされる全 ORF のクローン化を達成し(1)、次にこれを用いて遺伝子過剰発現による薬剤感受性変化を網羅的に観察するプロファイリング法を確立した(2)。これにより、海洋天然物 Theonellamide の作用標的が 3β-hydroxysterol であり、結合によって過剰なグルカン合成が引き起こされることを明らかにした。また、多剤感受性の酵母遺伝子破壊株コレクションを作成し、遺伝子破壊による薬剤超感受性株の高速バーコードスクリーニング法を確立した。これらの解析法により、最終的には化合物と標的候補因子との直接結合を確かめる必要があるものの、標的候補やその機能経路の迅速な推定が可能となった。さらに、バーコードつき shRNA ライブラリーを用いて薬剤感受性に関与するヒト遺伝子をバーコードシークエンスによって同定する系の確立にも成功した。本シンポジウムでは、我々が取り組んでいるこれらの新しい方法論を紹介し、長短を議論したい。

(1) Matsuyama et al. Nature Biotechnol., 24: 841-847, 2006.
(2) Nishimura et al. Nature Chem. Biol., 6: 519-526, 2010.

Natural products, Barcode sequencing, Mode of action

講演番号：4SY03-1
講演日時、会場：3 月 29 日 9:05～ A 校舎 41 会場

微生物由来の消化酵素の新しい展開

New development based on evidences of digestive enzymes

○廣瀬 芳彦（天野エンザイム株式会社）
○Yoshihiko Hirose (Amano Enzyme Inc.)

１）　はじめに

1894 年、初めて高嶺譲吉先生により微生物由来のタカヂアスターゼが消化酵素として世に出されて以来、消化不良、食欲不振、食べ過ぎや胃もたれなどの不快感に対する改善薬として広く用いられてきた。本シンポジウムでは、消化酵素という古くから使用されている医薬品に対し、新たに治療における有効性を明確にし、エビデンスに基づくグローバル市場への展開について述べてみたい。

２）　消化酵素の現状

現在、消化酵素製剤は医療用と一般用で販売されており、消化不良等の改善として広く用いられている。リパーゼ類の脂肪消化力、プロテアーゼ類のタンパク消化力、アミラーゼ類のデンプン糖化力、セルラーゼ類の繊維素糖化力が含まれた複合消化酵素剤であり、さらにこれらの酵素活性を併せ持つ動物由来の膵酵素を配合して、販売されている例が多い。これらの消化酵素の有用性データを再確認する中で、改めて、消化酵素の有効性を示すデータが得られてきている。国内においても、膵がんや慢性膵炎などの疾病数の増加に伴い、膵外分泌機能不全（PEI）の患者数が増加しており、それぞれの目的に合わせた治療薬として消化酵素の投与の機会が広がっている。QOL の観点からは、健常者であっても高齢者における栄養改善に対し、適切な消化酵素剤の使用は有効な治療と考えられる。一方で消化酵素をグローバル展開する中、主要国での酵素医薬品の法規制の違いにも注意が必要である。

３）　消化酵素の補充療法

特定の疾患に対する消化酵素の有用性を明確にしていくことは必然の展開であり、医療用消化酵素の新たな市場を形成している。たとえば、ゴーシェ病やファブリー病などのライソゾーム病における先天的な酵素欠損患者に対する酵素補充療法は、それぞれの消化酵素の理に適った治療法である。

４）　消化酵素の今後の展開

微生物消化酵素は、近年盛んに研究されているバイオ医薬品の中でも最も古いタンパク医薬品の一つであるが、酵素の持つ特異性を解明していく中で新たな医療用途への展開が期待でき、酵素の産業利用の一役を担っている。

digestive enzyme

講演番号：4SY03-2
講演日時、会場：3 月 29 日 9:27～ A 校舎 41 会場

身近な産業用酵素－洗剤用酵素を中心に

Industrial enzymes in our daily life focusing on detergent application

○鈴木 陽一（ノボザイムズ　ジャパン）
○Yoichi SUZUKI (Novozymes Japan)

一般に、産業利用される酵素は生産現場で反応を触媒するため、最終製品が棚に並んだときにはその役目を終えていることが多い。そんな中、洗剤用途は消費者が洗濯機という加水分解の反応系に自らの手で酵素を（洗浄成分の一部として）投入する極めてまれな応用分野である。

洗剤用酵素の歴史を簡単に振り返ると、1960 年代に微生物由来のプロテアーゼが発売されて以来、衣類に付着した汚れを選択的に分解するその機能から、主として衣料用洗剤の洗浄力向上を目的に使用されてきた。その後アミラーゼ、リパーゼ、セルラーゼなどが洗剤用途で相次いで開発され、対応する汚れの幅も広がり、酵素は洗剤に不可欠な成分として一般にも広く認識されるまでになった。その一方で、“酵素の対応する基質への作用（汚れの加水分解）＝洗浄力”という枠を超えた働きを求められる機会も増えてきている。環境負荷低減を意図した酵素の活用という観点では、80 年代前半からの無リン化やコンパクト化への寄与に始まり、近年においてもさらに石油由来の洗浄成分の一部をマルチエンザイム（複数種の酵素）で置換する洗剤成分最適化などがある。これによって洗浄力を向上、あるいは維持したままコストをコントロールすることも可能となる。他にも、酵素の新たな機能として、セルラーゼを効果的に用いることでコットンの自然な白さを実現する、風合いや色調を再生するといったアプローチがある。

また、酵素がその機能を日々の洗濯で十分に発揮するためには、洗剤が消費者の手元に届くまで酵素活性が維持されることが必然的に求められる。特に近年、粉末が主体であった洗剤市場において、溶け残らない等の理由から、液体へのシフトが先進国を中心に急速に進行している。酵素が直接水分子に接する液体洗剤組成中でその活性を安定に保つことは、洗浄剤メーカーにとって大きな技術課題となっている。このような背景から、当社では、粉末洗剤向けの酵素顆粒の継続的な改良に加え、液体洗剤向けには可逆的な阻害剤を安定化剤としてあらかじめ配合したプロテアーゼ製剤を展開している。

本シンポジウムでは、当社の酵素製剤をいくつか取り上げながら、洗浄力プラスアルファの付加価値を提供する事例や、酵素の機能改変や阻害剤活用技術が洗剤という身近な日用品に応用される例を挙げ、洗剤用酵素の性質と効果について紹介する。

sustainability, multi-enzyme solution, stabilizing technology

講演番号：4SY03-3
講演日時、会場：3 月 29 日 9:49～ A 校舎 41 会場

シクロデキストリン合成酵素の反応の多様性と澱粉糖化への利用

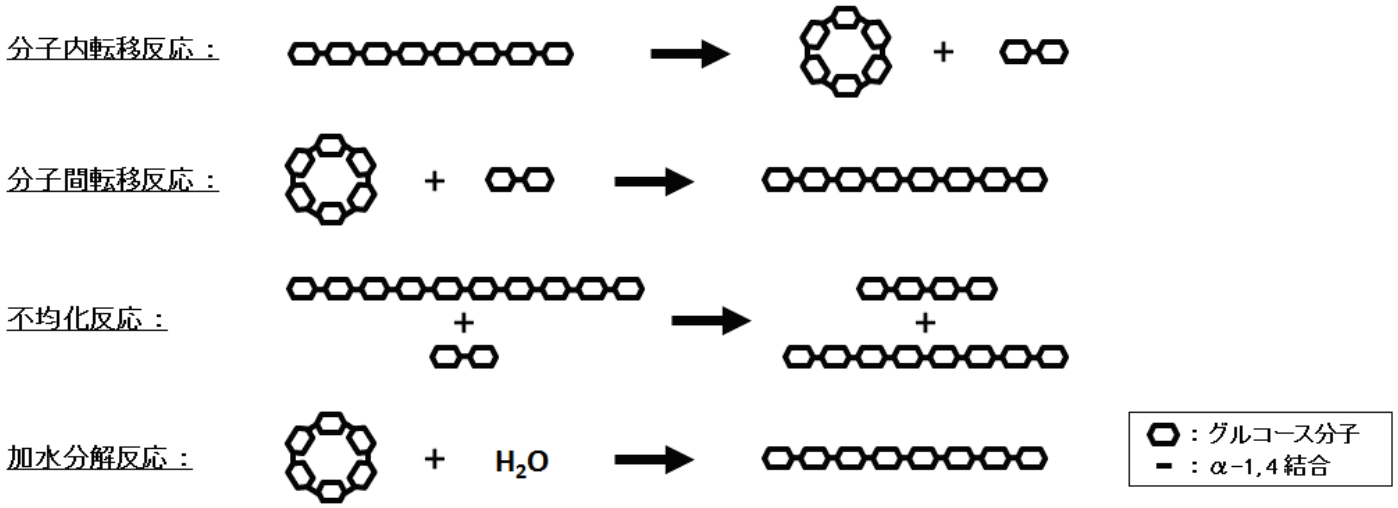
Variety of the catalytic reaction of CGTase and its utilization for starch saccharification

○山本 拓生（（株）林原　研究開発本部）
○Takuo YAMAMOTO (HAYASHIBARA CO., LTD. R&D Center)

シクロデキストリン合成酵素（以下 CGTase と略す。EC 2.4.1.19）は、澱粉からグルコース分子がα-1,4 結合で 6～8 個環状に連なったオリゴ糖、シクロデキストリン（CD）を生成する分子内転移反応、澱粉を糖供与体として適当な受容体分子へグリコシル基を転移する分子間転移反応、さらには不均化反応や加水分解反応を触媒する多機能酵素である。CGTase は、1939 年に Tilden と Hudson が *Bacillus macerans* から、1972 年に Okada らが *B. megaterium* から見出して以来、活発に検索されてきた。現在では 30 種類以上の細菌中でその存在が確認されている。

CGTase は *B. stearothermophilus* や *B. macerans* 等で工業的に製造され、その反応の多様性を利用して、CD、グリコシルスクロース(カップリングシュガー)、ステビア配糖体、アスコルビン酸２グルコシドおよびヘスペリジングリコシドなどの工業的製造に利用されている。分子内転移反応により製造される CD は、多くの分子(ゲスト化合物)と包接物を形成する能力を有し、ゲスト化合物の化学的・物理的・生理的諸性質を変化させることから、食品、医薬、農薬、化粧品、日用雑貨、化成品分野等において非常に有用である。また、分子間転移反応により製造される糖転移化合物は元の化合物に比べて、新規機能の付与、甘味度、安定性および水溶性などが大幅に改善・改良されている。

本シンポジウムでは、林原における CGTase の澱粉糖化への利用について紹介したい。



CGTase, Cyclodextrin, Starch saccharification

講演番号：4SY03-4
講演日時、会場：3 月 29 日 10:11～ A 校舎 41 会場

意外と知らない油脂加工における酵素の利用と可能性

The usage and possibility of Enzyme in oil and fats processing

○木田 晴康（不二製油（株））
○Haruyasu Kida (FUJI OIL CO.,LTD)

１．　はじめに

油脂類を基質とする酵素の代表的なものは、油脂の加水分解酵素であるリパーゼやリン脂質類の加水分解酵素であるホスホリパーゼ類があげられるが、最も広く用いられている用途は油脂類のエステル交換用途に用いられるリパーゼである。本発表では、リパーゼのエステル交換反応の利用を中心に述べる事とする。

２．　構造脂質の生産

リパーゼには、トリグリセリドの１、３位に選択性の高いものと、選択性の無いものに分類されるが、酵素によるエステル交換の特徴を活かす用途は構造脂質の生産である。最も早く実用化された用途は、ココアバター代用脂の分野であり、例えば、オレイン酸系油脂とステアリン酸を反応させることによるＳＯＳ型トリグリセリド（Ｓ：ステアリン酸、Ｏ：オレイン酸）が代表的な用途であるが、ほぼ同じプロセスにて、チョコレートの耐ブルーム剤であるＢＯＢ脂（Ｂ：ベヘン酸）や育児粉乳用油脂であるＯＰＯ脂（Ｐ：パルミチン酸）等が生産され使用されている。

３．　トランス脂肪酸問題による酵素エステル交換油脂の拡大

近年、欧米で始まったトランス脂肪酸問題により、油脂の加工もトランス脂肪酸が生成する部分硬化（水素添加）から、エステル交換反応の利用に主流が移っており、その中でも従来の化学触媒ではなく酵素（リパーゼ）を利用することが広がっている。化学触媒に比べて、酵素利用は割高ではあるが、環境負荷（廃水等）・油脂の品質（風味・色調等）の点で優れており、特に欧米では、ノンケミカルの動きもあり、酵素の使用が拡大している。

４．　油脂における酵素利用の将来

現在、油脂加工に酵素が用いられる用途は、まだまだ一部ではあるが、今後環境に優しい加工プロセスとして広がると共に、油脂中のリン脂質の除去（ホスホリパーゼ）や部分グリセリドの除去（部分グリセリド選択性リパーゼ）等の新しい用途の拡大も期待されている。

oil and fat, lipase, inter-esterification

講演番号：4SY03-5
講演日時、会場：3 月 29 日 10:33～ A 校舎 41 会場

酵素製剤化による食品製造への利用拡大

Expansion of food application by enzyme preparation technologies

○熊澤 義之 (味の素 食品研究所)
○Yoshiyuki Kumazawa (Inst. of Food Sci. & Tech., Ajinomoto Co)

酵素利用は食品製造において古くから用いられている非常に効果的な加工手段である。味噌、醤油等の発酵食品の製造、乳製品製造における凝乳、ベーカリー分野における生地物性改質など食品の製造に直接かかわっているものや、製糖、エキス製造、フレーバー製造などの他様々な食品原料の製造に用いられているなど多種多様にわたっている。酵素の利点は、例えば反応の特異性が高く、副反応が少ない、反応効率が極めて高い、高温や高圧などが不要で省エネルギーで環境フレンドリーであったり、ナチュラルなどの表現が挙げられる。食品分野での酵素の利用は、使い方次第で極めて有効な手段である。

当社では 20 年来、タンパク質架橋酵素であるトランスグルタミナーゼ（TG; EC 2.3.13.2）の研究開発、製品発売を行ってきた。先に列記した酵素の利用は、主に基質の分解による低分子化による機能発現と言えるが、TG は基質の高分子化により機能を発揮する酵素である。現在、TG は食肉加工、水産加工、成型（接着）、製麺、乳、豆腐など様々な分野の食品製造に用いられている。一般に酵素は原体そのままではなく、何らかの副原料、例えば澱粉、デキストリン、塩類、タンパク質など、と混合された状態（製剤）でユーザーへ提供されている。TG においては、各分野においてユーザーが最も使いやすく、また最も効果的に機能が発揮できるよう研究開発を進めている。その際、重要なことは酵素製剤利用にあたっての課題が何であるのかの把握と課題解決のための技術開発である。また、それら設計された配合や規格を正確に満たす製剤を安定的に製造する生産技術である。

本発表においては、酵素利用拡大の為に、酵素原末自体の安定性付与やアプリケーションとして食肉加工分野、水産練り製品、乳分野などで、これまで我々が直面してきた技術課題とその解決のための技術事例を紹介する。また、併せて TG 以外の酵素についてもその利用事例や課題について述べてみたい。

enzyme, Transglutaminase, food

講演番号：4SY03-6
講演日時、会場：3 月 29 日 10:55～ A 校舎 41 会場

化学プロセスにおける酵素利用

Application of enzymatic reaction to chemical industry

○八十原 良彦（株式会社カネカ）
○Yoshihiko Yasohara (Kaneka Corporation)

化学工業は、物質変換反応により有用化合物を作り出す工業分野である。基礎化学品から精密化学品までその範囲は極めて多岐にわたり、その影響は我々の生活のあらゆる場面に及んでいる。物質変換のための化学反応を起こす工業用触媒のほとんどは人工物である。微生物や酵素といった生体酵素が利用され始めたのは、２０世紀初頭、合成医薬品の原料調達への応用とされる。以来、いわゆるバイオコンバージョンは、そのときどきの先端技術を巧みに取り込みながらさまざまなイノベーションを達成してきた。

酵素反応では、一般の化学反応では困難な高い選択性（位置選択性、立体選択性）を実現できるため、医薬品合成などの比較的付加価値の高い産業領域で活用されてきた。しかし、これはその低い経済性の裏返しでもあり、工業生産の現場ではその低生産性を克服することが技術開発上のメインテーマである。新たな機能をもった酵素の発見や創製は、工業プロセスの刷新に直ちに貢献できるとともに、新たなアイデアやビジネスの原点でもある。微生物の多様性を背景とした地道なスクリーニングや近年めざましい進歩をみせている酵素改変技術が、その大きな原動力となる。また、酵素反応は、水性溶媒中、常温常圧で行なえることが大きな特徴である。全体から見ればまだごく一部とは言え、遺伝子組換え技術の普及によって、低生産性の克服に一定の確実性が見込めるようになってきていることから、近年では省資源、省エネルギー、安全性といった酵素のもつ環境面での重要性が世界的にクローズアップされつつある。

本シンポジウムでは、演者らが取り組んできた酵素反応を用いる光学活性化合物製法の工業技術開発を中心に、化学プロセスにおける酵素反応の価値やその将来について議論できればと考えている。

chemical process, enzymatic reaction, chiral compound

講演番号：4SY03-7
講演日時、会場：3 月 29 日 11:17～ A 校舎 41 会場

酵素反応と代謝工学的手法を活用した有用化合物製造法の開発～KAITEKI の実現に向けて

Application of enzymatic reaction and metabolic engineering to the process development for valuable compounds ~ To realize "KAITEKI"

○川端 潤（三菱化学科学技術研究センター）
○Hiroshi Kawabata (Mitsubishi Chemical R. C.)

単離酵素もしくは休止菌体を触媒として利用し、一段～数段の反応を実施する「酵素法」と、生菌体の生命活動を利用してグルコース等の原料から多数の代謝経路上の酵素を利用して特定の化合物を生産する「発酵法」が、旧来より酵素を活用した物質生産として活用されている。三菱ケミカルホールディングスグループにおいては、それぞれの方法を活用し、各種アミノ酸、アクリルアミド、コハク酸、医薬原薬・中間体などの製造プロセスを開発・実施してきたが、必要な技術基盤としては酵素探索、改良、ルート探索など共通する部分が多く、また、それぞれの方法も複雑化、高度化しており、それに伴い必要な要素技術の深化も求められている。

本講演では三菱ケミカルホールディングスにおけるこれまでの事例を中心に、それに伴う技術開発について、また、今後の展望について紹介したい。

enzymatic reaction, metabolic engineering, biocatalysis

講演番号：4SY03-8
講演日時、会場：3 月 29 日 11:39～ A 校舎 41 会場

分子生物学研究用酵素の開発とそのアプリケーション分野への展開

The development of enzymes for molecular biology research, and its deployment to the application field.

○北川 正成（タカラバイオ株式会社）
○Masanari Kitagawa (TAKARA BIO Inc.)

タカラバイオ株式会社は、2002 年 4 月に前身である宝酒造株式会社（現・宝ホールディングス株式会社）・バイオ事業部門から分社独立して発足しましたが、そのバイオ事業の開始以来、国産初の制限酵素の発売など、一貫して遺伝子・DNA に係る事業を中心に展開してきました。また、これも国産初の *Taq* DNA Polymerase の製造を行って以来、PCR のリーディングカンパニーとして研究者の様々なニーズに応えるべく、常に新製品の開発に努めてきました。開発された「PCR 製品」の中には、現在も広く利用されている *Taq* DNA polymerase を様々な形に発展させた製品群があり、LA（Long and Accurate)テクノロジーを生かした「長くかつ正確に」増幅する Ex-Taq や LA-Taq といった PCR 酵素もあります。また、様々な好熱性菌株コレクションからスクリーニングされた DNA polymerase 遺伝子をクローン化し、さらにその変異体を取得し、あるいは DNA 複製装置のパーツ酵素遺伝子を単離し、PCR 反応のブラッシュアップを繰り返して、現在の PrimeSTAR®シリーズや MightyAmp®、*Tks* Gflex™ DNA polymerase といった製品ラインアップを生み出してきました。PCR 技術はその後、定量 PCR 法へ発展し、単に DNA を増幅する技術から、検出測定技術としてのアプリケーションの開発に進み、たとえば環境病原微生物等の検出と定量などの当社製品へと発展しており、食品分析、環境分析、分子診断等向けの製品として、腸管出血性大腸菌、サルモネラ菌やノロウイルス等の食中毒菌を迅速・簡便・頑健に検出できる研究用試薬キットを開発してきました。また、PCR の弱点である「死菌」の DNA でも増幅が起きるという問題点を解決するために EMA-PCR を利用した「生菌」検出キットの製品化も実現しています。
一方、次世代シーケンサー時代に求められる試薬酵素の性能と品質の追求して、たとえば性能面では、増幅バイアスの低減や増幅制度の向上を実現し、また品質面では PCR 系全体に混入する DNA レベルを下げ、そのうえで真の PCR 感度を保持した試薬の開発なども行ってきました。
このような試薬としての酵素開発とその応用についての紹介が、酵素の利用に関する理解の一助となればと思います。

PCR, DNA polymerase, Next-generation sequencer

講演番号：4SY04-1
講演日時、会場：3 月 29 日 13:35～ A 校舎 41 会場

糸状菌に特異なガラクトフラノース（Gal*f*）糖鎖の生合成

Biosynthesis of galactofuranose-containing glycans in filamentous fungi

○岡 拓二[1]、後藤 正利[2] ([1]崇城大生物生命、[2]九大院農)
○Takuji OKA[1], Masatoshi GOTO[2] ([1]Sojo Univ., [2]Kyushu Univ.)

生物には，様々な環境中で生き抜くための戦略の一つとして，多糖を主成分とする細胞壁を保有する細胞からなるものが存在する．我々が研究対象としているアスペルギルス属糸状菌は，麹菌などの醸造分野で重要な有用菌や，医療分野で問題となっている病原菌，カビ毒生産菌などが含まれ，人類の食と安全，健康に密接に関わっている．アスペルギルス属糸状菌の細胞壁は，主に β1,3-グルカン，α1,3-グルカン，マンナン，キチン，真菌タイプのガラクトマンナン (GM) および *N*-グリカンや *O*-グリカンによって修飾されたガラクトマンノプロテイン (GMP) から構成されている．このうち真菌類で共通に存在する構成糖鎖であるキチンや β1,3-グルカンの生合成に関わる糖転移酵素の多くは既に同定され，それらの機能解析により細胞壁形成における役割が明らかにされつつある．また，一部の糸状菌の GM および GMP には，ガラクトフラノース（Gal*f*） が付加されていることが知られている．この Gal*f* 糖鎖は，細菌類，トリパノソーマや線虫類に認められるものの，その構造は異なっており，動物や植物には存在していないため，新規な抗真菌剤の標的となることが期待されている．

真菌類に見られる高マンノースタイプ *N*-グリカンの非還元末端には，1,2-結合 (α/β 未同定) で 1 つの Gal*f* 残基が付加されており，*O*-マンノースグリカンの非還元末端側には β1,6-結合で β1,5-Gal*f* オリゴ糖が付加されている． GM は，全てα1,2-で結合したマンノテトラオースユニットが互いに α1,6 結合で 9-10 ユニット重合したマンナンコア構造に，β1,5-テトラガラクトフラノシドが β1,3- もしくは β1,6- 結合した多糖構造をしている．

これまでに，糸状菌においては Gal*f* 糖鎖生合成に必要な糖ヌクレオチド合成酵素および糖ヌクレオチド輸送体に関する研究が進められており，遺伝子が同定されていた．しかし，糸状菌の独特な Gal*f* 糖鎖合成を担う糖転移酵素の同定については，細菌由来の Gal*f* 転移酵素遺伝子のオルソログが糸状菌ゲノム上に見いだされなかったため，報告されていなかった．

我々の研究グループでは，新規な遺伝子を発見するためには，近年流行りのゲノム情報中のアミノ酸配列の類似性に頼る手法では成されないと考え，逆遺伝学的手法と生化学的手法を組み合わせた手法により，Gal*f* 転移酵素遺伝子の同定を試みた．その結果，*gfsA* 遺伝子が糸状菌の Gal*f* 生合成に関わっており、その遺伝子産物 GfsA は，*O*-グリカンの末端 Gal*f* 合成を担う糖転移酵素であることを明らかにした。本講演では，最近発見したアスペルギルス属糸状菌の Gal*f* 転移酵素 GfsA に関する知見を中心に，糸状菌の Gal*f* 含有糖鎖の生合成について紹介したい．

galactofuranose, filamentous fungi, cell wall

講演番号：4SY04-2
講演日時、会場：3 月 29 日 14:00～ A 校舎 41 会場

リゾチーム遷移状態アナログの設計に基づく反応機構の検証

Molecular design of lysozyme transition-state analogue and the elucidation of hydrolytic mechanism

○尾形 慎[1]、碓氷 泰市[2]、梅本 尚之[3]、大沼 貴之[3]、深溝 慶[3]、沼田 倫征[4]([1]福島高専・物質工、[2]静岡大・創科技、[3]近畿大院農・バイオ、[4]産総研)
○Makoto Ogata[1], Taichi Usui[2], Naoyuki Umemoto[3], Takayuki Ohnuma[3], Tamo Fukamizo[3], Tomoyuki Numata[4] ([1]Fukushima NCT, [2]Shizuoka Univ., [3]Kinki Univ., [4]AIST)

ニワトリ卵白リゾチーム（hen egg white lysozyme; HEWL）は、1965 年 Phillips らによってタンパク質としては 3 番目、酵素としては初めて X 線結晶構造解析によりその立体構造が明らかにされた。この発見以降、HEWL は阻害剤との複合体構造解析などの多くの研究が行われ、現在ではその反応機構が非常によく理解されている酵素の一つである。それにもかかわらず、HEWL の触媒機構に関しては 50 年以上もの長きに渡り様々な提案がなされ、未だ議論の対象になっていることは興味深い。一般的に、酵素は基質の化学変化をもたらすものであるので、酵素と基質の複合体は不安定であり、それを直接的手段により観測することは困難である。しかし、酵素の立体構造や反応機構（反応中間体）に基づいて設計された競争阻害剤は、酵素の基質結合部位で安定な構造をとることから、今日に至るまで酵素反応機構を解明する強力な研究ツールとなっている。

近年我々は、HEWL の触媒反応機構として提案されている 2 つの有力な説（Phillips 機構と Koshland 機構）それぞれに対応する新規遷移状態アナログ阻害剤（GN_3L および GN_3M）の合成に成功している（図）。[1-3] 本シンポジウムでは、2 種類の HEWL 遷移状態アナログ阻害剤の分子設計および合成と、これら阻害剤を用いた HEWL 触媒機構の再検証について紹介する。また、本阻害剤の設計原理を他の糖質加水分解酵素に適用した最近の知見についても紹介する。[4]

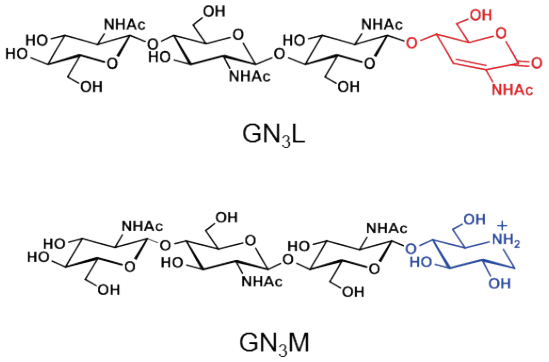


図　HEWL 遷移状態アナログ阻害剤

【参考文献】

1) Ogata, M. et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 76, 1362-1366 (2012).
2) Ogata, M. et al., *J. Biol. Chem.*, 288, 6072-6082 (2013).
3) Osada, M. et al., *RSC Adv.*, 4, 33651-33657 (2014).
4) Shinya, S. et al., *Glycobiology*, 24, 945-955 (2014).

lysozyme, transition-state analogue, covalent glycosyl-enzyme intermediate

講演番号：4SY04-3
講演日時、会場：3 月 29 日 14:25～ A 校舎 41 会場

糖質加水分解酵素ファミリー97 における触媒機構と多様性

Divergence of catalytic mechanism in glycoside hydrolase family 97

○奥山 正幸（北大院農）
○Masayuki Okuyama (Hokkaido Univ.)

糖質加水分解酵素はそのアミノ酸配列の類似性から糖質加水分解酵素ファミリー（glycoside hydrolase family, GH）に分類される．あるファミリーに含まれる酵素群はアミノ酸配列類似性から分類されている性格上、分子進化的に共通な祖先を有し、それらの立体構造、触媒機構は保存されているのが一般的である．糖質加水分解酵素の触媒機構はこれまでいくつか報告があるが、大きく分別すればアノマー反転型もしくアノマー保持型に分類される．すなわち、ファミリー内の酵素群の触媒機構はアノマー保持型、もしくは反転型で保存されているのが一般的である．しかし、これはあくまで経験則であり、例外があっても不思議ではない．GH97 はその例外なファミリーであり、アノマー反転型酵素とアノマー保持型酵素が混在している．すなわち、アノマー反転型の α-グルコシド結合加水分解酵素、保持型の α-ガラクトシド結合加水分解酵素が含まれる．GH97 酵素の触媒ドメインは$(\beta/\alpha)_8$バレルフォールドをとり、活性中心は β-バレルの C 末端に位置する．グリコシド結合にプロトンを転移する触媒残基（アノマー反転型酵素では一般酸触媒、アノマー保持型酵素では一般酸塩基触媒）はいずれの触媒機構を有する酵素でも β-ストランド 6 の C 末端に位置している．一方、2 つの触媒機構で、基質の β 面に位置する触媒残基の位置が異なっている．アノマー反転型酵素では β-ストランド 5 に位置する Glu 側鎖が一般塩基触媒として働き、アノマー炭素を求核攻撃する触媒水を活性化する．アノマー保持型酵素では β-ストランド 4 に位置する Asp 側鎖が求核触媒残基として働き、アノマー炭素を攻撃する．すなわち GH97 酵素における触媒機構の違いは基質のアノマー炭素を攻撃する求核種の違いに起因することがわかる．

GH97 酵素の特徴として、活性中心にカルシウムイオンを有していることを挙げられる．EDTA で処理したアノマー反転型酵素ではカルシウムイオンに代わってナトリウムイオンに触媒残基が配位しており、その触媒活性は大幅に減少する．速度論的解析の結果から、カルシウムイオンはアノマー反転型機構の一般塩基触媒の働きを安定化し、また基質の脱離基の脱離を促す働きを担っていることが示唆されている．

glycoside hydrolase, catalytic mechanism

講演番号：4SY04-4
講演日時、会場：3 月 29 日 15:00～ A 校舎 41 会場

反転型糖質ホスホリラーゼの立体構造と基質認識

Structure and substrate recognition of inverting sugar phosphorylases

○伏信 進矢（東大院農）
○Shinya Fushinobu (Univ. of Tokyo)

糖質ホスホリラーゼは、水ではなくリン酸を用いてグリコシド結合を切断（加リン酸分解）する酵素の総称である。その反応産物である糖リン酸エステル結合の持つエネルギーは、糖転移酵素が基質とする糖核酸のリン酸ジエステル結合ほど高くないために、糖質ホスホリラーゼの反応は可逆的となる。従って、供与体基質としての糖１リン酸と適切な受容体基質を用いれば、特定のオリゴ糖を高い立体特異性で高効率に合成することが可能となる。１０年ほど前までは限られた数の糖質ホスホリラーゼしか知られていなかったが、近年、新しい基質特異性を持つ糖質ホスホリラーゼが徐々に見つかってきており、この酵素を用いて合成できるオリゴ糖のバリエーションも増えている (Nakai et al., *Curr. Opin. Chem. Biol.* **17**, 301-309, 2013)。

糖質ホスホリラーゼは、反応機構や立体構造の面から３種類に大別できる。①保持 GT 型：糖転移酵素と似た立体構造（GT-B フォールド）を持つアノマー保持型酵素であり、ピリドキサールリン酸を補酵素とするものが含まれる。グリコーゲンホスホリラーゼ（GT35）が古くから知られているが、トレハロースホスホリラーゼにもこのタイプの酵素（GT4）がある。②保持 GH 型：糖質加水分解酵素と似た立体構造を持つアノマー保持型酵素であり、保持型加水分解酵素における脱グリコシル化反応にあたる段階で、水の代わりにリン酸を利用する。アミラーゼと同じファミリーに属するスクロースホスホリラーゼ（GH13）などが知られている。③反転 GH 型：糖質加水分解酵素と似た立体構造を持ち、反応機構としては、反転型加水分解酵素の水の代わりにリン酸を用いる。マルトースホスホリラーゼ（GH65）やセロビオースホスホリラーゼ（GH94）が古くから知られていたが、近年、両ファミリー内に新たな基質特異性を持つ酵素が続々発見されている。基本的には、GH65 はα-グルコシドに、GH94 にはβ-グルコシドに作用する。さらに、新たなファミリー（ガラクトシドに作用する GH112 とマルトシドに作用する GH130）も見つかっている。

我々のグループでは、反転型ホスホリラーゼを中心に構造生物学的研究を行ってきており、これまでに、GH94 セロビオースホスホリラーゼとキトビオースホスホリラーゼ、GH112 ガラクト *N* ビオース/ラクト *N* ビオースホスホリラーゼの立体構造を報告してきた。本講演では、近年立体構造を決定した GH65 コージビオースホスホリラーゼ、GH65 グルコシルグリセロールホスホリラーゼを中心に、それらの構造と機能について紹介する。

Carbohydrate-Active enZymes, Sugar phosphorylase, X-ray crystallography

講演番号：4SY04-5
講演日時、会場：3 月 29 日 15:25～ A 校舎 41 会場

α-1,3-グルカン分解酵素とその応用

α-1,3-Glucanase: Properties and Application

○矢野 成和[1]、若山 守[2]、立木 隆[2] ([1]山形大院理工、[2]立命館大生命科学)
○Shigekazu YANO[1], Mamoru WAKAYAMA[2], Takashi TACHIKI[2] ([1]Yamagata univ., [2]Ritsumeikan Univ.)

α-1,3-グルカンは不溶性の高分子多糖であり、口腔内に棲息する *Streptococcus* 属細菌が生産する菌体外ポリマー（ムタン）として、あるいは真菌類の細胞壁構成多糖として存在する。α-1,3-グルカンを加水分解する酵素（α-1,3-グルカナーゼ； EC 3.2.1.59）は、アミノ酸配列に基づくグリコシドヒドロラーゼ（GH）分類に従うと、GH71 型と GH87 型の酵素に大別される。GH71 型酵素は、*Trichoderma* 属、*Aspergillus* 属、*Penicillium* 属や *Schizosaccharomyces* 属 などの真菌類にその存在が報告されており、真菌類型酵素と言うことができる。もう一方は、GH87 型酵素であり、*Paenibacillus* 属 や *Bacillus* 属などに由来する細菌型酵素である。

α-1,3-グルカナーゼに関する研究は、齲蝕予防の観点で行われたものと細胞壁溶解に関わる酵素を解析したものに分けられ、それらは個別に進められてきた。*Streptococcus* 属細菌が生産する α-1,3-グルカンと真菌細胞壁に含まれる α-1,3-グルカンは、側鎖の分枝構造などが異なると考えられるが、両分野で GH71 型と GH87 型の酵素がともに得られている。GH71 型と GH87 型酵素の比較研究や構造学的な視点での研究が進むことで、齲蝕予防用 α-1,3-グルカナーゼや細胞壁溶解用酵素を見出すことが可能になると考えている。

近年の研究で、いくつかの動・植物に感染する真菌は、宿主に感染する際に積極的に細胞壁表層に α-1, 3-グルカンを生成し、これを宿主免疫システムからの攻撃を回避するのに利用していることも分かってきた。このような背景から、α-1,3-グルカナーゼ研究の重要性はさらに高まっており、早急な進展が求められている。

我々は、真菌細胞壁溶解酵素を研究する過程で、細胞壁を誘導基質として GH87 型 α-1,3-グルカナーゼを生成する *Bacillus circulans* KA-304 を分離した。本菌の α-1,3-グルカナーゼ（Agl-KA）は、マルチドメイン構造を有していたので、それぞれのドメイン機能を解析し、複数のドメインが α-1,3-グルカン結合に関与していることを明らかにした [1)]。また、*Paenibacillus* 属細菌由来の新規 GH87 型酵素を単離することにも成功しており [2)]、これら酵素を比較することで、GH87 型酵素のドメイン構造の最適化と反応機構の解明を目指して研究を行っている。今回は、Agl-KA の研究成果を報告するとともに、α-1,3-グルカナーゼ研究の現状についても解説する。

1) Biosci. Biotechnol. Biochem., 77(3), 639-647, 2013. 2) J. Biosci. Bioeng., 118(4), 378-385, 2014.

α-1,3-glucanase, fungal cell-wall, *Bacillus circulans* KA-304

講演番号：4SY04-6
講演日時、会場：3 月 29 日 15:50～ A 校舎 41 会場

微生物のエンドグリコシダーゼを用いた生理活性物質の合成

Synthesis of bioactive compound by use of microbial endoglycosidase

○山本 憲二（石川県大生物資源研）
○Kenji Yamamoto (Ishikawa Prefectural University)

生体内のさまざまな生命現象において多彩な働きをする複合糖質の糖鎖は核酸やタンパク質と共に「生命における第三の鎖」と呼ばれている。糖鎖の生合成は真核細胞の小胞体やゴルジ体で行われ、ATP などの高エネルギー化合物の関与により生合成された糖ヌクレオチドを基質として、糖転移酵素の働きによって行われ、その反応には多数の酵素反応が関わっている。

我々は土壌より単離同定した糸状菌 *Mucor hiemalis* が生産し、糖タンパク質の N-グリコシド結合糖鎖を加水分解して遊離するエンド型グリコシダーゼの endo-β-*N*-acetylglucosaminidase が加水分解活性のみならず、糖転移活性も有することを見出し、その糖転移活性を活用することによって、さまざまな化合物に糖鎖が付加できることを明らかにした。すなわち、本酵素（Endo-M）は糖転移活性によって、水酸基を有する化合物に糖鎖供与体から糖鎖を付加することができるユニークな酵素である。我々は Endo-M のこの特異的な活性を利用することにより、生理活性ペプチドに糖鎖を付加した糖ペプチドやインフルエンザウイルス感染阻害剤などの化学−酵素合成（chemo-enzymatic synthesis）を行い、さまざまな機能性糖鎖化合物を合成している。

グリコシダーゼの糖転移反応は拮抗する加水分解反応が優先して起こるため、生成物の量は少なく、さらに、一度生成した糖転移生成物もグリコシダーゼの基質となるため、再び加水分解され、糖転移生成物の収率はさらに減少する。すなわち、グリコシダーゼの糖転移活性によって糖転移生成物を高収率で得るためには糖転移反応を促進して糖転移生成物の加水分解反応を抑制することが重要である。我々は Endo-M が substrate-assisted catalysis という機構によって働く酵素であることを見出しているが、このような酵素は酸塩基触媒残基のみを有し、基質部分の *N*-acetylglucosamine 残基の 2-acetoamide 基が求核残基として機能して、オキサゾリン反応中間体の形成を介して反応が進行する。そこで、オキサゾリン反応中間体の形成に関与すると考えられる Asn-175 を部位特異的変異した酵素を作成して、糖鎖のオキサゾリン化合物を基質とした糖転移反応を行った結果、いくつかの変異酵素は長時間反応を行っても糖転移生成物がほとんど加水分解されずに増加し高収率で得られた。すなわち、「グライコシンターゼ」様に機能することが明らかになった。中でも、Asn 残基を Gln 残基に置換した変異酵素 N175Q は高マンノース型糖鎖およびシアロ複合型糖鎖のオキサゾリン化合物を供与体基質とした糖転移反応によって生成物が高収率で得られることが明らかになった。これらの成果によって、Endo-M による糖鎖化合物の大量調製が実用化レベルで行えることが現実的になった。

Endoglycosidase, Transglycosylation, Oxazoline compound

講演番号：4SY05-1
講演日時、会場：3 月 29 日 9:15～ E 校舎 11 会場

細菌が能動的に生産する膜小胞，メンブランベシクル

Membrane vesicles actively produced in bacteria

○豊福 雅典[1]、エベール レオ[2]、野村 暢彦[1] ([1]筑波大生命環境、[2]チューリッヒ大学)
○Masanori Toyofuku[1], Leo Eberl[2], Nobuhiko Nomura[1] ([1]Univ. Tsukuba, [2]Univ. Zurich)

高等生物においてベシクルは生命システムを維持するために，根幹の役割を担っている．実は細菌も同様にベシクルを生産することが分かってきている. 細菌では, これらはメンブランベシクル（MV）あるいはアウターメンブランベシクル(OMV)と呼ばれる数十から数百nmの膜小胞である. MVは細胞外に分泌され，周囲の細菌や宿主細胞に付着・融合することから，細胞間での様々な物質の輸送に関わることが推定されている. MVは現在のところ，グラム陰性細菌とグラム陽性菌で生産が確認されており，細菌が普遍的に保持しているシステムではないかと考えられている．さらに, MVは海洋などの実環境中からも同定されている．これらの報告は，我々が現在把握している以上にMVを介して細菌間あるいは細菌-宿主間相互作用が活発に行われていることを示唆しており，今後MVは微生物制御のターゲットとしても高いポテンシャルを秘めている.

MV生産が多くの細菌で確認されるなかで，その生産機構や生物学的役割については未知な部分が多い．これまでの研究から，MV形成に至る経路は何種類も存在し，それらは細胞内部や外部の環境，刺激に応じて誘導されることが分かっている．また，その結果生産されるMVは誘導機構に応じて中身が変わることも明らかとなった．つまりは，環境に応じたオーダーメイドなMVが生産され，それぞれの環境にあった役割を担っていると推察される.

当研究室では，ストレスに応じてMVが生産されることを見出しており，そのMV誘導機構には細菌間で保存性の高い遺伝子が携わっていることを明らかにした．このようなMV形成機構の解明により，MV生産がなぜ細菌間で一般的に観察されることを説明できる可能性がある．本シンポジウムでは，上記の研究例を紹介しつつ，MVを理解することで，既知の生物学的システムにどのような新たな視点，インパクトをもたらすのか議論していきたい.

Membrane vesicle, Bacterial interaction, Biofilm

講演番号：4SY05-2
講演日時、会場：3 月 29 日 9:45～ E 校舎 11 会場

窒素固定細菌の膜小胞による多糖輸送

Polysaccharide transport through membrane vesicle in a nitrogen-fixing bacterium

○橋本 渉[1]、村田 幸作[2] ([1]京大院・農、[2]摂南大・理工)
○Wataru Hashimoto[1], Kousaku Murata[2] ([1]Kyoto Univ., [2]Setsunan Univ.)

グラム陰性の単生窒素固定細菌 *Azotobacter vinelandii* は、空気中の分子状窒素（ガス）を窒素源として利用できる。その窒素固定反応はニトロゲナーゼによって触媒されるが、本酵素は酸素によって不可逆的に失活する。本菌はバイオプラスチックの素材となるポリヒドロキシ酪酸（PHB）や増粘多糖類として有用なアルギン酸を生産することが知られており、菌体外に分泌されるアルギン酸が莢膜としてニトロゲナーゼの酸素に対する防御に機能することが示唆されている。

本講演では、*A. vinelandii* の窒素ガスレベルに応答して細胞表層に形成される膜小胞の実体と機能を中心に、最近得られた知見を紹介する。

(1) 酸素に対する細胞挙動：*A. vinelandii* の酸素に対する感受性を解析するため、空気（窒素 78%:酸素 21%）を対照として種々の人工混合ガスを用いて窒素源非含有培地における本菌の生育を調べた。*A. vinelandii* は酸素 25%や 50%の酸素高分圧下でも生育を示したが、酸素 75%では生育しなかった。アルギン酸合成欠損株を作製し、その生育を野生株と比較した。その結果、欠損株は野生株と同等の酸素耐性を示すため、アルギン酸がニトロゲナーゼの酸素保護に必須でないことが明らかになった。

(2) 膜小胞を介したアルギン酸分泌：窒素分圧を変えて（75%, 50%, 5%）、*A. vinelandii* の生育を調べたところ、本菌は窒素 5%でも良好に生育した。一方、窒素分圧が低くなるにつれて、培養濾液のアルギン酸濃度が上昇した。その細胞切片構造を電子顕微鏡で解析した結果、窒素低分圧下で生育した細胞の表層には多数の突起状の小胞状構造体が形成され、かつ小胞として細胞表層から遊離し莢膜の多層化を促すことが認められた。抗アルギン酸抗体を用いた免疫電子顕微鏡解析から、この小胞状構造体の中にはアルギン酸が濃縮されていることが分かった。一方、アルギン酸合成欠損株は小胞状構造体を形成しない。以上のことから、膜小胞を介した新規な多糖分泌機構の存在が実証された。

(3) バイオポリマー発酵生産菌への応用：*A. vinelandii* は、有用物質生産菌として優れた潜在能力をもっている。しかし、バイオディーゼル油の製造の際に副生するグリセロールに対する本菌の資化性や有用物質生産は不明である。そこで、グリセロールを炭素源として培養したところ、本菌がグリセロール資化性を示し、グリセロール脱水素酵素を初発酵素として発現することが分かった。その培養菌体を電子顕微鏡で解析すると、小胞状構造体の形成と PHB に相当する脂肪滴の蓄積が認められたため、*A. vinelandii* によるグリセロールからのバイオポリマー生産の可能性が見出された。

本研究は、生研センターと日本石鹸洗剤工業会の研究助成により行われた。

alginate, *Azotobacter vinelandii*, membrane vesicle

講演番号：4SY05-3
講演日時、会場：3 月 29 日 10:15～ E 校舎 11 会場

微生物間の宅配便　－メンブランベシクルの分泌機構と選択的細胞融合－

Delivery service among microbes -Secretion system and selective cell fusion of membrane vesicles-

○田代 陽介（静岡大院工）
○YOSUKE TASHIRO (Shizuoka Univ.)

細胞外膜小胞（メンブランベシクル）は直径 20~200 nm の粒子であり、グラム陰性細菌、陽性菌、さらには古細菌を含む原核生物が細胞外に分泌する。膜小胞には病原因子が高濃度に含有されており、宿主細胞に効率良く運搬する媒体として機能していることから、医学的側面においてその基礎的研究が多くなされてきた。しかし、膜小胞には DNA や溶菌酵素等も内包されており、微生物間の捕食-被食関係や同種間のシグナル伝達としての役割も近年提唱されている。そのため、環境中での微生物間の相互作用を理解する上でその機能解析は非常に重要である。本講演では、グラム陰性菌を中心に膜小胞の分泌メカニズムと、微生物細胞への融合について紹介する。

これまでに、グラム陰性菌の膜小胞分泌には少なくとも 5 つの要素が存在する事を提唱してきた。具体的には、1) 外膜・内膜結合タンパクの欠如、2) 細胞表層の電荷の反発、3) ペリプラズムにおける物質の蓄積、4) 膜の流動性低減によるストレスへの耐性低下、5) 曲率の高いリン脂質の蓄積、が複合的に関与していると推測される。

一方、このように分泌された膜小胞は環境中でどのような微生物細胞に融合していくのかはこれまで明らかにされていなかった。我々は様々な細菌を対象に、分泌されたベシクルと微生物細胞への吸着性を網羅的に解析した。多くの細菌から分泌される膜小胞は多種多様の細菌に普遍的に結合または融合したのに対し、膜小胞生産能が最も高かった *Buttiauxella agrestis* JCM1090 株の膜小胞は自身の細胞に選択に吸着する事が示された。さらに、膜小胞は細胞表面に吸着しているだけではなく、細胞へ融合してその内部の DNA を伝播する事も示唆された。以上の事から、分泌された膜小胞はその内部の情報を標的細胞に送り届ける「宅急便」としての機能を有すると考えられる。このような種特異的融合のメカニズムを解明する事が出来れば、複合微生物系において標的の微生物細胞のみに目的の物質を送り届ける微生物版ドラッグデリバリーシステムの構築が期待される。

membrane vesicles, outer membrane, horizontal gene transfer

講演番号：4SY05-4
講演日時、会場：3 月 29 日 10:45～ E 校舎 11 会場

グラム陽性細菌のメンブランベシクルと動物細胞への作用

Membrane vesicles in Gram-positive cells and its effect on mammalian cells

○尾花 望[1]、中尾 龍馬[2]、中村 幸治[1]、泉福 英信[2]、野村 暢彦[1]([1]筑波大生命環境、[2]感染研細菌一)
○Nozomu Obana[1], Ryoma Nakao[2], Kouji Nakamura[1], Hidenobu Senpuku[2], Nobuhiko Nomura[1]
([1]Tsukuba Univ., [2]Natl. Inst. Infect. Dis.)

多くの微生物はナノスケール（10-300 nm）の球状構造体であるメンブランベシクル（MV）を産生し、放出する。MV 放出はグラム陰性細菌において保存された現象であると考えられており、病原細菌における病原因子の輸送や、タンパク質分泌、遺伝子の水平伝播及び細胞間コミュニケーション等の様々な生物学的なプロセスに関与している。近年グラム陰性細菌における MV 研究の進歩は目覚ましく、その生合成や機能といった知見は蓄積してきている。一方、グラム陽性細菌は外膜をもたず、厚く堅い細胞壁が存在することから、近年までグラム陽性菌では MV 産生はあまり着目されてきていなかった。しかしながら、近年、様々なグラム陽性細菌もまた機能性の MV を産生していることが明らかになりつつある。つまり、MV は微生物属種に関わらず産生放出され、広くその生命現象に寄与していると考えられる。本演題ではグラム陽性の病原細菌が生産する MV について紹介する。

グラム陽性偏性嫌気性のウェルシュ菌（*Clostridium perfringens*）は食中毒等の感染症の原因となる病原細菌である。我々は本菌が核酸、タンパク質を含有する MV を産生することを明らかとした(1)。ウェルシュ菌 MV （CpMV）をマウスマクロファージ様細胞へ添加すると、炎症性サイトカインの誘導を引き起こしたことから、ウェルシュ菌は MV を介して宿主細胞の自然免疫を誘導すると考えられた。さらに、CpMV をマウスの鼻腔に接種したところ、血清 IgG や IgA 産生を引き起こすだけでなく、分泌型の IgA 産生を全身に誘導することも明らかとなった。つまり、病原細菌が産生する MV は獲得性免疫の誘導能を有しており、効率的ワクチン開発のシーズとなり得る。

ウェルシュ菌は芽胞形成細菌であり、ある環境下では芽胞を形成し、様々なストレスに対する耐性を得る。我々はこれまでに芽胞形成開始因子が芽胞形成だけでなく、環境に応答したバイオフィルム形成を制御することを明らかとしている(2)。上述の芽胞形成開始因子の変異株では MV 産生が著しく低下し、さらに、上記因子を過剰発現させたところ、MV 産生が増強した。つまり、本菌の MV 産生は能動的に行われ、且つ厳密に調節がなされていることが示唆された。本演題ではグラム陽性細菌における環境に応答した MV 産生及びその機能について議論したい。

(1) Nakao R, Kikushima K, Higuchi H, Obana N, Nomura N, Bai D, Ohnishi M, Senpuku H. PLoS One. (2014) 9(5) e95137.
(2) Obana N, Nakamura K, Nomura N. Journal of Bacteriology. (2014) 196(8):1540-50.

Gram-positive bacterial membrane vesicles, environmental response, mammalian cell

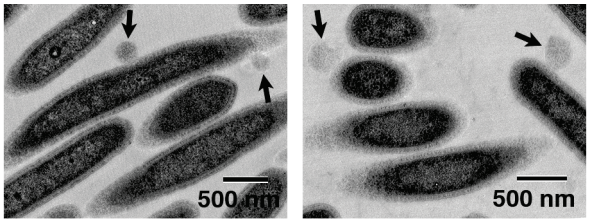
講演番号：4SY05-5
講演日時、会場：3 月 29 日 11:15～ E 校舎 11 会場

膜小胞に局在する酵素タンパク質の応用―――難分解性タンパク質トリ羽毛分解を行うケラチン分解性プロテアーゼの研究から

Application of proteins localized in membrane vesicles--- from the study of a keratinolytic protease degrading hard-to-degrade proteins and feathers

○渡部 邦彦[1]、川崎 一則[2]、増村 威宏[1] ([1]京都府大院生環、[2]産総研健康工学)
○Kunihiko Watanabe[1], Kazunori Kawasaki[2], Takehiro Masumura[1] ([1]Kyoto Prefectural Univ., [2]NAIST)

「膜小胞（membrane vesicle)」との出会いは、まったくの突然だった。それまで難分解性動物タンパク質を、独自に単離した好熱性細菌で行わせる研究を続けて来た中で[1)]、神戸・有馬温泉から単離した *Meiothermus ruber* H328 と同定したグラム陰性細菌が、特徴的なプロテアーゼ構造を持つことを見出したことに、膜小胞との出会いがあった[2)]。



H328 株は、生トリ羽毛を強力に分解し、巨大分子複合体として分泌されるケラチン分解性プロテアーゼが。主にこの分解を担う。このプロテアーゼは、60°C の高温で強力な変性剤 SDS 40%(w/v)共存下でも活性を失わず、ほぼすべての有機溶媒に対し 30%共存しても耐性を保持する驚異的なプロテアーゼであることが判ってきた[3)]。このケラチン分解性プロテアーゼ巨大分子複合体の研究に、電顕解析の専門家が加わることによって、この膜小胞構造が見出され、そこに含まれることを見出した（図参照)。

このケラチン分解性プロテアーゼは、培地上清を限外濃縮（排除分子量 50 万 Da）→ゲル濾過（ウイルス分離用）→超遠心／ショ糖密度勾配分離により精製を行っている。この精製サンプル（＝超遠心活性画分）に構造生物学的解析（フリーズレプリカ & TEM）を行うと、意外にも脂質二重膜構造を持つ膜小胞（membrane vesicle）を見ることが出来た。そこで元菌 H328 株に対しても TEM を実施したところ、細胞表面からこの膜小胞が放出されることを突きとめた（図参照）[4)]。

一方、プロテアーゼ巨大分子複合体のプロテオーム解析から、プロテアーゼとその関連遺伝子産物の２つがオペロン構成すること共に、ゲノム解析情報を元に同定された[5)]。この２つに対する抗体を利用した免疫電顕解析から、２つのタンパク質が共に膜小胞に局在することが判り、トリ羽毛分解のための膜小胞の重要性が示唆された。さらに、現在 H328 株に、相同組換えによる変異株作成し、膜小胞への輸送、トリ羽毛分解性等を変性剤耐性獲得の機構と共に調査している。

膜小胞の応用は、有用タンパク質を分泌と共に膜小胞表面に輸送し、新規な輸送および酵素反応キャリアーとして利用することが想定できる。さらに膜小胞の生合成機構解明から、ウイルス進化・発生の研究にも大きな知見を与えるものと期待している。

1) *化学と生物*, **48**, 751-756 (2010), 2) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **82**, 941-950 (2009),
3) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **98**, 2973-2980 (2014), 4) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **78**, 1623–1625 (2014),
5) *Genome Announcements* **1**, e00176-13 (2013)

membrane vesicle, keratinolytic protease, protease complex

講演番号：4SY06-1
講演日時、会場：3 月 29 日 13:30～ E 校舎 21 会場

放線菌シグナル制御系の分子基盤解析および複合的代謝改変による潜在的二次代謝産物の発掘

Understanding of the regulatory system in *Streptomyces* and mining of cryptic secondary metabolites by complex metabolic engineering

○荒川 賢治（広島大院・先端研）
○Kenji ARAKAWA (Hiroshima Univ.)

放線菌は微生物由来二次代謝産物の７割近くを生産する土壌細菌である。近年では生合成遺伝子の改変による非天然型抗生物質の創製も盛んに行われており、創薬の研究シーズとして期待される。我々が研究対象としている放線菌*Streptomyces rochei* 7434AN4株は２つのポリケチド抗生物質ランカサイジン(LC)・ランカマイシン(LM)を生産し、３つの線状プラスミドpSLA2-L, -M, -Sを保持している。その中でもpSLA2-Lは、LC, LM生合成遺伝子の他にこれらの制御遺伝子群も有していた。我々はLC, LM生合成マシナリーおよび制御カスケードの解析を行っており、「ものつくり」を指向した二次代謝と制御の相互理解を進めている。本シンポジウムではLC, LM生合成制御に関与するシグナル分子(SRB)制御システムについて概説し、「シグナル分子制御系」「主要二次代謝生合成」の人為的改変を通じて獲得した化合物の構造・生合成に関する研究成果について述べる。

(1) 抗生物質生産を誘導する新規シグナル分子 SRB の単離・構造決定・生合成：
放線菌シグナル分子はnMオーダーで抗生物質生産を誘導するが、生産量は極微であり、構造決定は困難を極める。我々は本菌を大量培養し、各種クロマトグラフィーによりSRB画分を精製した。なおSRB活性は、SRB合成酵素遺伝子*srrX*破壊株のLC, LM生産性回復により検出した。２つの活性化合物の存在が確認でき、それらの構造をNMRで解析したところ、いずれも2,3-二置換4-ヒドロキシブテノライド骨格を有する新規シグナル分子であった。また、分岐鎖のC-1'位水酸基の立体化学は化学合成により*R*と決定し、誘導活性は40 nMであることが分かった。本化合物は従来のγ-ブチロラクトン型分子と構造が異なっており、放線菌シグナル分子の構造多様性を示すことが出来た。

(2) 人為的代謝改変による潜在的二次代謝のゲノムマイニングと生合成
潜在的二次代謝の覚醒を目指し、我々は人為的代謝改変に注目した。シグナル分子制御系におけるリプレッサー遺伝子 *srrB* を破壊すると LC,LM 大量生産株が取得できた。さらに主要二次代謝の生合成遮断による代謝プロファイルを調べたところ、LC 生合成の NRPS-PKS ハイブリッド遺伝子 *lkcA* 破壊株において３つのポリケチド化合物 citreodiol, *epi*-citreodiol, ペンタマイシンの蓄積を見出した。さらに LC, LM 生合成遺伝子および *srrB* に対して変異を施した三重変異株を構築したところ、アゾキシアルケン化合物 KA57-A が得られた。これらはいずれも親株の通常培養では検出困難であり、非選択的ではあるものの潜在的二次代謝の覚醒に成功した。さらに上述の代謝物に関しては生合成遺伝子が同定されておらず、それらの生合成マシナリー、とりわけアゾキシ結合の形成機構は大変興味深い。

biosynthesis, regulatory gene, secondary metabolite

講演番号：4SY06-2
講演日時、会場：3 月 29 日 14:00～ E 校舎 21 会場

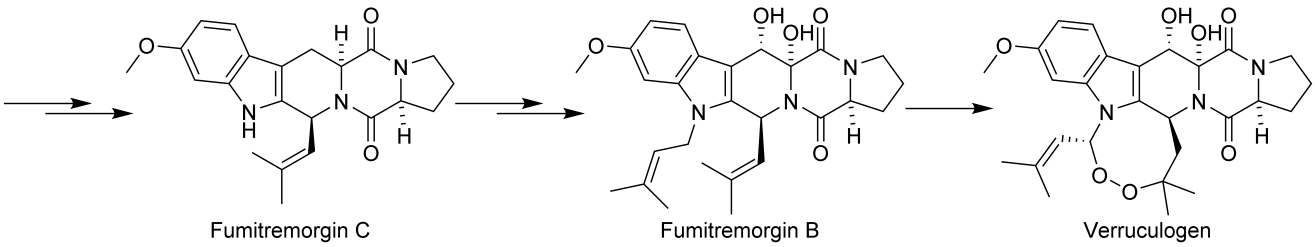
遺伝子ターゲティングによる糸状菌二次代謝産物生合成経路の全容解明

Elucidation of biosynthetic pathways of fungal secondary metabolites by gene targeting

○加藤 直樹、高橋 俊二、長田 裕之 (理研 CSRS・ケミカルバイオロジー)
○Naoki Kato, Shunji Takahashi, Hiroyuki Osada (RIKEN CSRS, Chemical Biology)

糸状菌や放線菌といった微生物の生産する二次代謝産物は重要な創薬探索源である。その生合成マシナリーに関する知見が蓄積し、ゲノム解読が迅速かつ安価に実施できるようになり、微生物が潜在的に保有する二次代謝産物生合成マシナリーへのアクセスが可能となってきた。そういったゲノム解読により見出された二次代謝産物生合成マシナリーを同定、解析するための様々な手法が考案され、未活用資源の探索研究が加速している。

本講演では、二次代謝産物生合成マシナリーの解析手法の一つとして、生産菌を起点とした遺伝学的手法（とそれを相補する生化学的手法）による生合成マシナリー解析を、我々がこれまでに行ってきたヒト病原性糸状菌 *Aspergillus fumigatus* の生産するフミトレモルジンの生合成を例に紹介する。遺伝子クラスターに含まれるすべての酵素遺伝子についてそれぞれ破壊株を作製し、それらの代謝産物プロファイルを比較することで、各遺伝子の生合成経路における役割を同定することができる。この手法により、フミトレモルジン類の特徴的な構造形成とそれに付随する生物活性の賦与に深く関与するオキシゲナーゼ遺伝子の同定に成功し、主要生合成経路の解明に至っている。生産菌に由来する遺伝子改変株を利用することで、野生株（生産菌）における通常の生合成プロセスでは蓄積しないような中間産物（およびシャント代謝物）の効率的な収集ができるのもこの手法の利点である。さらには本解析により、α-ケトグルタル酸依存性ジオキシゲナーゼ FtmF が、verruculogen の分子内ペルオキシド架橋形成を触媒することを明らかにしている。結晶構造解析により、その立体構造を得ることに成功しており、そのユニークな触媒活性の詳細を明らかにすることで、さらなる構造多様化への展開が期待できる。



Biosynthesis, secondary metabolite, filamentous fungi

講演番号：4SY06-3
講演日時、会場：3 月 29 日 14:30～ E 校舎 21 会場

情報解析の真菌二次代謝研究への応用

Bioinformatic analysis on fungal secondary metabolism

○小池 英明、玉野 孝一、梅村 舞子、森田 友岳、町田 雅之（産業技術総合研究所）
○ Hideaki Koike, Koichi Tamano, Myco Umemura, Tomotake Morita, Masayuki Machida (National Inst. Adv. Indust. Sci. Tech.)

多くの糸状菌や担子菌酵母などの真菌は特定の化合物を大量に生産することが知られ、多様な産業に利用されてきた。醸造に使われる麹菌 *Aspergillus oryzae* は二次代謝を生産しないが、ゲノムが最初に解読された野生株をグルコース濃度が高い培地で生育させた場合は、対数増殖が終わった後に培地中の残存する炭素をコウジ酸に変換する。その生産物は培地中に多量に分泌される。一方で硝酸塩など無機態の窒素源が存在するとコウジ酸の生産は不可逆的に阻害される。この“培養条件によって生産性が大きく変化する”性質を利用して【生産/非生産】条件下での遺伝子発現を比較することにより、物質生産に関与する遺伝子を特定することが可能である。コウジ酸の場合では生産過程での遺伝子発現を経時的に比較することで、コウジ酸の生産に必須の遺伝子を見付けることができた。発現データは様々なノイズを含むため統計的な手法が必要となったが、最終的に 3 遺伝子から構成させる生産に必須の遺伝子クラスターを明らかにすることができた。

Aspergillus 属の数種は、窒素源を多く含む培地条件では抗生物質ペニシリンを生産する。二次代謝物は立体配座の特異性が高く、生理活性を持つものも多いので医薬などに応用されてきた。多くの二次代謝はポリケタイドや非リボゾームペプチドを骨格として持ち、それらの生合成には固有の配列を持つ遺伝子が関わっているため、関与する遺伝子を配列だけから推定することも可能である。しかしコウジ酸など上記の骨格を含まない物質も数多く、それらの遺伝子の同定は難しかった。その場合でも、二次代謝合成に関わる遺伝子がクラスターを作る事を利用した情報解析を使うことで、二次代謝に関わる遺伝子を効率的に同定する新規方法を示すことができた。真菌は、コウジ酸（*A. oryzae*）以外でも、クエン酸（*A. niger*）、糖脂質（担子菌酵母 *Pseudozyma*）、酵素（*Trichoderma*）などでは既に大量に分泌・蓄積する発酵生産が利用されている。今後も真菌の二次代謝を産業に利用する事例が増える事が期待される。近年、DNA 塩基配列を読む技術は飛躍的に進歩し、既に 700 を超える真菌ゲノムが公共データベースに登録された。次世代型シークエンシングを 有用物質を生産する真菌に対して活用することで、ゲノム塩基配列を短時間で新規に決定することが可能となった。また条件依存的に発現する遺伝子の情報も、RNA-seq 解析により得ることが可能である。今後は次世代型シークエンシングによるゲノム配列の比較解析や遺伝子発現解析が、ますます二次代謝生産に利用されると期待される。本発表では、ゲノム情報科学の活用を中心に、麹菌や担子菌酵母による物質生産の改良を試みてきた研究例を紹介します。

genome, fungi, secondary metabolism

講演番号：4SY06-4
講演日時、会場：3 月 29 日 15:00～ E 校舎 21 会場

アフラトキシン、トリコテセンの代謝制御におけるミトコンドリアの機能
Mitochondorial function in regulation of aflatoxin and trichothecene production

○作田 庄平、古川 智宏、山本 利義（東大農）
○Shohei Sakuda, Tomohiro Furukawa, Toshiyoshi Yamamoto (Univ. of Tokyo)

農作物の、*Aspergillus flavus* および *Aspergillus parasiticus* によるアフラトキシン汚染、*Fusarium graminearum* によるトリコテセン汚染は、食の安全を考える上で極めて深刻な問題である。汚染作物の破棄による経済的損失は甚大であり、また、アフラトキシン汚染で５億人が健康被害に晒されている。我々は、それらカビ毒の生産を選択的に阻害する天然物質を用いて、アフラトキシン、トリコテセンの生産制御機構の解明を試み、さらに、実用的なカビ毒汚染防除方法の開発を目指している。本シンポジウムでは、ミトコンドリアをターゲットとする阻害物質により得られた、アフラトキシン、トリコテセンの生産機構に関する最近の知見を紹介する。

精油成分であるプレコセンⅡは、*F. graminearum* のトリコテセン生産を特異的に強く阻害する。プレコセンⅡは、抗幼若ホルモン活性を示す物質として知られるが昆虫における標的分子は不明である。トリコテセン、幼若ホルモンともにメバロン酸経路で生合成されるセスキテルペン類に属する。プレコセンⅡは *F. graminearum* の菌体内アセチル CoA 量を減少させ、その減少は、ミトコンドリア由来のクエン酸を原料としてアセチル CoA を細胞質で生産する ATP-citrate lyase の発現抑制によることが示された。プレコセンⅡをプローブとして固定化した磁気ビーズを用いてプレコセンⅡ結合タンパク質の精製を試みた。その結果、ミトコンドリアにおいてスーパーオキシドアニオンの透過に関与する voltage-dependent anion-selective channel(VDAC)が結合タンパク質として同定された。スーパーオキシドアニオンの定量や各種阻害剤を用いた実験により、ミトコンドリアのスーパーオキシドアニオン量がトリコテセン生産に関与することが明らかになった。

呼吸阻害剤がアフラトキシン生産を抑制することを見出した。呼吸阻害活性を有する市販の農薬が存在することより、それらのアフラトキシン汚染防除剤としての実用化につながる可能性が考えられる。呼吸阻害剤の標的とアフラトキシン生産阻害活性との関係、アフラトキシン生産に関与する遺伝子の発現に対する影響を調べ、ミトコンドリアでの代謝回転がアフラトキシン生産量に強く影響を与えることが示唆された。

謝辞：本研究は、農林水産省委託プロジェクト研究「カビ毒の動態解明と産生低減技術の開発(カビ毒動態)」ならびに、農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業「ケミカルバイオロジーを基盤とした革新的な農薬等の探索研究」として行われているものである。

aflatoxin, trichothecene, mycotoxin

講演番号：4SY06-5
講演日時、会場：3 月 29 日 15:30～ E 校舎 21 会場

リボソームと新規ペプチドリガーゼによる協調的ペプチド生成機構

Peptide synthesis cooperated by ribosome and a novel peptide ligase

○大利 徹（北大院工）
○Tohru Dairi (Hokkaido Univ.)

【目的】　放線菌が生産するペプチド系抗生物質、pheganomycin（以下 PM）は、*N*-末の amidino-phenylglycine 誘導体（AFG）とタンパク性のアミノ酸から構成される 2 つのペプチド（NVKDR または NVKDGPT）がペプチド結合した 2 種類が知られている。*N*-末に非タンパク性の AFG を有することから、PM は non-ribosomal peptide synthetase（NRPS）で生合成されると推定されるが、一般に基質であるアミノ酸をアデニル化する NRPS の A-ドメインの基質認識は厳密であり、*C*-末のアミノ酸の長さ・種類の違いを説明できない。そこで、PM の生合成機構の解明を行った。

【方法と結果】　バンコマイシンの生合成において AFG の生成に関与することが証明されている DpgA（Type III PKS）遺伝子をドラフトゲノム配列中に探索した結果、生合成遺伝子クラスターを見出した。本クラスターには AFG の修飾に関与すると推定される酵素遺伝子群が存在したが、NVKDR と NVKDGPT を合成し得る巨大な NRPS は存在しなかった。そこで、クラスター内にペプチダーゼが存在したことも考慮し、コアペプチド部分がリボソームで合成される可能性を考え塩基配列を精査した結果、38 アミノ酸からなるプレカーサー遺伝子を見出した。本遺伝子は NVKDR と NVKDGPT の両方の配列をコードしており C-末の多様性を説明できた。さらに本遺伝子を欠失させた変異株では PM の生産が消失したことから、NVKDR と NVKDGPT はリボソームにより供給されると結論づけた。

次にこれらペプチドと AFG とのペプチド結合を触媒する酵素を探索した。既知のペプチド結合生成酵素は ATP を基質の活性化に用いる場合が多いことから、ATP 結合モチーフを持つ ORF を探索した結果、プレカーサー遺伝子の隣に ATP-grasp モチーフを持つ遺伝子を見出した。本遺伝子の破壊株は PM の生産性を消失し、また組換え酵素は、ATP、Mg^{2+}存在下で AFG と NVKD（または NVKDGPT）のペプチド結合形成を触媒した。本結果から、PM はリボソームとペプチドライゲースという全く異なる機構が協調して生合成されること、またその際、ペプチドを求核剤として利用する初めての例であることが分かった。興味深いことに本酵素は、2 から 18 アミノ酸からなる種々のペプチドを求核剤として受容した。この幅広い基質特異性の詳細を明らかにするため、結晶構造解析と変異酵素の作成も行った。本発表では、これらの結果の詳細について報告する。

【参考文献】　Noike et al., Nat. Chem. Biol., DOI; 10.1038/nchembio.1697

peptide ligase, peptide biosynthesis, pheganomycin

講演番号：4SY06-6
講演日時、会場：3 月 29 日 16:00～ E 校舎 21 会場

マクロラクタム抗生物質生合成マシナリーの精密解析
Molecular Analysis of Biosynthetic Machinery for Macrolactam Antibiotics

○江口 正（東京工業大学院理工）
○Tadashi Eguchi (Tokyo Institute of Technology)

マクロラクタム抗生物質はポリケチド化合物の 1 つであり、PKS や PKS-NRPS ハイブリッドによって生合成されている。ラクタム環形成に必須な窒素原子は主にアミノ酸に由来し、一次代謝経路では生合成されない種々の特異な構造のアミノ酸が取り込まれていることが多い（Figure 1）。

我々は、ビセニスタチンなどのマクロラクタム抗生物質の生合成に興味を持ち研究を進めてきており、これらは多様なアミノ酸スターターとポリケチド鎖が連結して構築されると考えられ、特にそのスターター生合成機構は非常に興味深い。これらマクロラクタム抗生物質スターター生合成を詳細に解明することで遺伝子のスワッピングなどによる新たな分子創製が期待できると考えている。既にビセニスタチン開始基質の生合成経路を酵素レベルで解明したが、スターター部の特徴的な保護、脱保護反応を経由してビセニスタチンが生合成されることを明らかにしている。これらの背景を基に、我々は同様のマクロラクタム抗生物質であるインセドニン、クレミマイシンおよびヒタチマイシンの生合成解析に取り組んできた。本シンポジウムでは、これらの研究の経緯について紹介する。

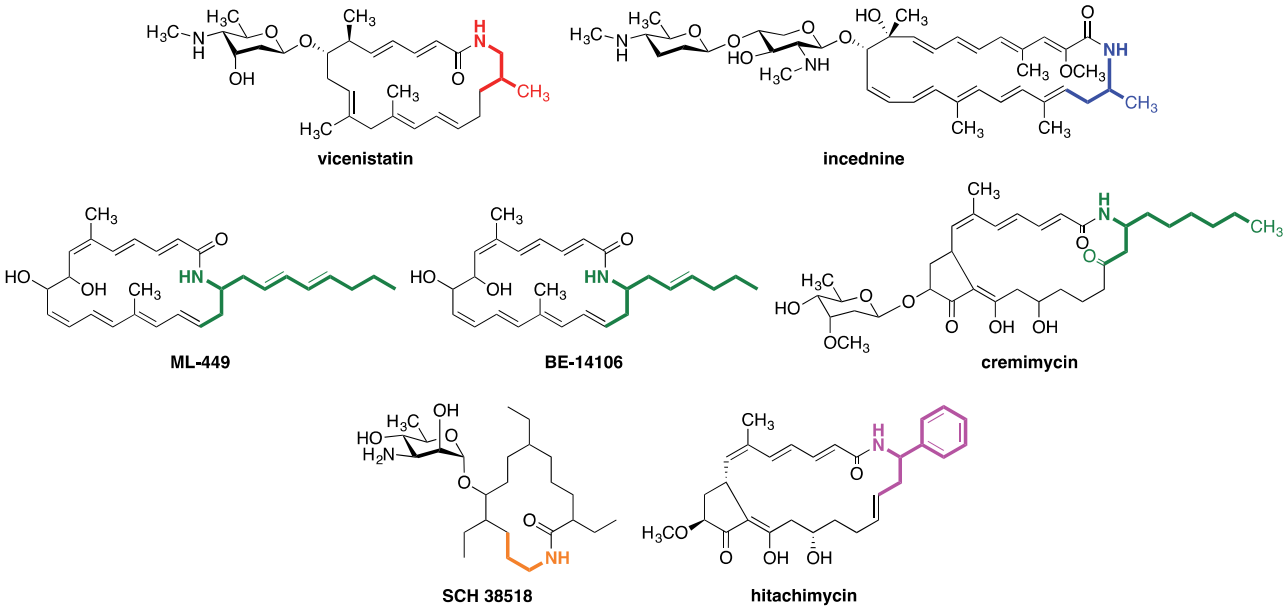


Figure 1. 種々のマクロラクタムの構造とスターター部

biosynthesis, antibiotics, macrolactam

講演番号：4SY07-1
講演日時、会場：3 月 29 日 9:00～ E 校舎 21 会場

“合成生物学”から再考するメタノール酵母遺伝子発現系
Recombinant Protein Production by the Methylotrophic Yeasts: Perspectives from "Synthetic Biology"
○阪井 康能（京都大学　院農）
○Yasuyoshi Sakai (Kyoto Univ.)

合成生物学は究極的には、設計とモデリングに基づく「生命現象の再構成」あるいは「応用を目的とした有用細胞の創生」として表現できるだろう。ただしそこには、機械や情報科学における設計・合成とは異なる側面がある。たとえば、仮説・設計に基づいて実験を行い、予想通りの結果が得られない場合、機械・プログラミングであれば欠陥部分を見つけることは比較的容易で、再設計やモジュールの交換など、技術的な解決策を見出すことがポイントとなる。しかし合成生物学の場合、その生命現象をアウトプットするまでのプロセスが複雑であればあるほど、その過程で起こる未知の分子の関与や相互作用など、予測できない因子が多すぎて、問題部分の特定すら難しい。このような生物のもつ複雑性の一つとして、真核細胞におけるコンパートメント化が挙げられよう。膜を介したシグナル伝達や物質輸送と各コンパートメントごとに独立した反応系を考慮に入れなければならない上、コンパートメントごとのメタボローム解析は現状では困難で、代謝工学が今後クリアーしなければならない大きなハードルの一つである。結局は、生産性の高い条件・変異株を探索するなど、改善されたアウトプットから演繹的に生命現象を解剖して、律速となっていた分子やシステムの同定へと戻ることになる。このように“やや工学的でない”研究プロセスを通して生命現象における新規システムや分子の発見が生まれてくることもまた事実である。

「異種有用タンパク質を生産する細胞を創生する」という意味において、大腸菌を用いた組換え技術による異種遺伝子発現は合成生物学の原点とも言える技術である。一方、真核細胞におけるタンパク質合成過程は、代謝産物の輸送に比較すると、合成・細胞内輸送・分解のマシナリーが分子レベルで明らかにされ、代謝物に比較するとタンパク質の各コンパートメントへの局在化は追跡可能で、分子細胞生物学との融合により今後、合成生物学の一分野にもなり得ると考えられる。本講演では、このような視点から、私達が行ってきたメタノール資化性酵母を用いた異種遺伝子発現系を用いたタンパク質生産について考えてみたい。1) 目的としたタンパク質を生産する場所・環境の設計・最適化とともに、2) メタノール誘導性に関わる分子メカニズムの解明と、センサー分子の改変により新しく強力な誘導性遺伝子発現系を構築するための試みなどを、今後の展望とともに紹介したい。

heterologous gene expression, compartmentalization, protein folding

講演番号：4SY07-2
講演日時、会場：3 月 29 日 9:25～ E 校舎 21 会場

細胞の持つタンパク質発現の キャパシティを測る

Measuring the capacity of protein production in the cell

○守屋 央朗[1]、金高 令子[2]、蒔苗 浩司[1] ([1]岡山大異分野コア、[2]岡山大自然科学)
○Hisao Moriya[1], Reiko Kintaka[2], Koji Makanae[1] ([1]RCIS, Okayama Univ., [2]Okayama Univ.)

細胞内に存在する数千から数万種類のタンパク質のそれぞれが、必要なときに必要な量作られることで細胞の機能は営まれている。細胞の機能を制御するために、これらの量を変える操作がよく行われるが、それぞれのタンパク質の量はそもそもどれだけ厳密に決められているのだろうか？どれだけ変化させると細胞の機能に変化が現れるのだろうか？また、それはそれぞれのタンパク質によって異なるのだろうか？このような疑問に答えるために、私たちは、「それぞれのタンパク質をどこまで過剰発現したら細胞が死ぬのか」を知ることができる遺伝子つなひき（gTOW）法を開発した。gTOW 法では、プラスミドを用いて人工的に遺伝子のコピー数を増やし、細胞が死ぬ直前のコピー数（限界コピー数）を測ることで、タンパク質の発現限界を評価することができる。私たちは、これまでに gTOW 法を用いて、出芽酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）の 6000 すべての遺伝子の限界コピー数限界を測っている（Makanae *et al.*, Genome Res. 2013）。

この研究の過程で、gTOW 法を用いれば、「そもそも酵母細胞がどれくらいのタンパク質を生産するキャパシティがあるのか」を測ることができる事に気がついた。具体的には、強力なプロモーターから、酵母の機能に不必要なタンパク質（GFP）を発現させる人工遺伝子のコピー数を上げてやり、それをどこまであげられるかを測ることで、酵母細胞が持つタンパク質生産のキャパシティを測ることができた。

最近この研究をさらに発展させ、GFP に核内、核外、ミトコンドリア、小胞、細胞膜などの輸送シグナルを付加してやることで、細胞内小器官への輸送のキャパシティを測定することにも成功している。その結果、酵母細胞の、ミトコンドリアや核外へタンパク質を輸送するキャパシティは、細胞質のそれに比べて非常に小さいことが見えてきている。さらに現在、過剰によってこのキャパシティを上げるような別のタンパク質の取得を行っている。このようなタンパク質を知ることで、細胞のタンパク質生産・輸送のキャパシティを決める要因を探るとともに、それらのキャパシティを向上させるような酵母株を作成できる可能性がある。

Yeast, Protein production, Protein expression

講演番号：4SY07-3
講演日時、会場：3 月 29 日 10:00～ E 校舎 21 会場

メタノール資化性酵母 *Ogataea minuta* によるバイオ医薬品生産系の開発
Development of biologics manufacturing system using methylotrophic yeast *Ogataea minuta*
○野中 浩一（第一三共株式会社）
○KOICHI NONAKA (DAIICHI SANKYO CO., LTD)

組換えタンパク質の生産系には、大腸菌などのバクテリアや、酵母、カビなどの真菌類、植物（細胞）、昆虫細胞、動物（細胞）が宿主として利用され、様々な発現系が開発されている。これらの中、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞は、Rituximab、Trastuzumab、Bevacizumab、Cetuximab などに代表される分子標的型抗がん剤としてのモノクローナル抗体の生産宿主として 1990 年代後半より用いられ、その後の培養技術の進歩と相まって、現在では数 g/L の分泌生産を可能とする宿主として揺るがない地位を確立している。一方で、抗体医薬は、抗がん剤を中心とした適応範囲から、骨代謝、循環代謝、免疫抑制、感染症、ワクチンの領域にも拡大され、抗体そのものだけでなく、抗体フラグメント、抗体の機能を mimic する機能性タンパク質や抗体薬物複合体なども開発されており、それぞれの製造に適した様々な生産系が要求されている。

これら様々な組換えタンパク質を治験薬として供給する際には、目的タンパク質の翻訳後修飾やプロセシングの必要性、製造設備の能力、カルタヘナ法に関わる大臣確認申請など、各種の課題を考慮した上で、生産系を選択することが必要となる。開発したいバイオ医薬品候補の分子特性と開発タイムラインを勘案しながら生産系を選択することが重要である。

我々は、単細胞生物で増殖が早く、培養管理も容易であり、産業用酵素や医薬品の分野で実績が多い酵母発現系に着目し、メタノール資化性酵母の１種である *Ogataea minuta* を宿主とする組換えタンパク質の発現系を開発してきた。宿主に対する各種のエンジニアリングを実施し、*Saccharomyces cerevisiae*、*Pichia pastoris*、*Schizosaccharomyces pombe* に並ぶ高い発現系を構築することが出来たため、本生産系について紹介する。

methylotrophic yeast, *Ogataea minuta*, biologics manufacturing

講演番号：4SY07-4
講演日時、会場：3 月 29 日 10:35～ E 校舎 21 会場

思い通りの DNA デザインを目指した遺伝子操作技術と合成生物学

Synthetic biology and genetic engineering technology for excellent DNA design

○中村 美紀子（山口大産学公）
○Mikiko NAKAMURA (Yamaguchi Univ.)

DNA 操作が可能になった分子生物学は、微生物に始まり動植物細胞や個体への遺伝子操作により、生命現象の解明、農産物の改良、バイオ医薬品などの有用物質の生産などに利用されてきた。基本的な遺伝子操作とは、それぞれの目的に応じて塩基配列を切ったり繋げたりする‘DNA デザイン’である。しかし、遺伝子が由来する生物の DNA 配列やタンパク質配列を利用することが基本なので微細な変化を与えるだけのものが多く、合成生物学と呼べるような完全な分子デザインを進めているものは少ない。新たな高機能分子をできるだけ生物に頼らずに創造する合成生物学こそ、これからの応用科学に求められているものではないだろろうか。つまり、どのように分子を創造するか、さらには、創造した分子が既存の生物機能を超えることが重要なのである。

しかし、新しい分子を創造するためには、思い通りの分子デザインを可能にする技術が必要である。DNA を改変するための従来の制限酵素と大腸菌を用いて構築するプラスミドクローニング法が使われている限り、自由自在に DNA デザインをすることは難しい。大腸菌のプラスミドが担ってきた分子生物学から脱却しない限り、今後の合成生物学の展開は困難であると考える。

そこで本講演では、PCR で様々なコンストラクトを作製し、PCR 産物を導入することで直接に発現解析できる技術を紹介する。要求されるものは、１）簡単にデザインされた DNA コンストラクトを作製すること、及び、２）そのまま DNA 断片を宿主に導入し発現させることである。この２つの条件をクリアできる操作技術が必要である。

きっかけは、耐熱性酵母 *Kluyveromyces marxianus* であった。この酵母の持つ高い非相同末端結合(Non-homologous end joining: NHEJ)を利用すると PCR 産物による遺伝子操作技術を別次元のレベルに上げることに成功した。さらに PCR 産物を利用して哺乳動物細胞の遺伝子操作に挑戦した。高効率遺伝子導入試薬と高発現を可能にするターミネータプライマーの開発に成功したことで、PCR で作製した遺伝子コンストラクトを哺乳動物細胞に導入して遺伝子操作できるようになった。現在は酵母と哺乳動物細胞を簡単にシャトルできる発現系構築に挑んでいる。

我々は PCR 産物という直鎖状 DNA を用いる遺伝子操作技術を、環状のプラスミド操作と区別し、‘リニア DNA テクノロジー’と呼んでいる。リニア DNA テクノロジーを用いて行った分子デザイン例を紹介し、本技術が自然界に存在しない新たな高機能分子を創造する合成生物学における基盤技術になることを示したい。

Linear DNA technology, PCR, Non-homologous end joining

講演番号：4SY07-5
講演日時、会場：3 月 29 日 11:10～ E 校舎 21 会場

人工細胞モデルの実験進化

Experimental evolution of an artificial cell model

○四方 哲也 [1,2,3] ([1] 大阪大、[2] 東工大、[3]ERATO)
○Tetsuya Yomo[1,2,3] ([1]Osaka Univ., [2]Tokyo Inst. Tech., [3]ERATO)

生命は、分子原子が集合して複雑な反応システムを作っている。多くの要素から構成される化学反応ネットワークと生命を分けている性質は何であろうか？その答えの一つは進化する能力である。現在の細胞型生命が誕生する直前には、脂質２重膜に包まれ小胞の中で、遺伝物質がタンパク質合成反応の触媒として働き、タンパク質が遺伝子の複製反応の触媒として働いていた。分子触媒の寄せ集めで進化能をもった細胞様システムは生じるのであろうか？

Qβファージの RNA 複製酵素の遺伝子（RNA）とタンパク質翻訳に必要な因子を個別に精製し、アミノ酸や ATP など低分子と共にμスケールの油中水滴に封入した。この人工細胞モデルの中では、RNA から合成された RNA 複製酵素が元の RNA を複製する（遺伝子複製）。複製反応後に、タンパク質翻訳因子と低分子だけを含んだエサ液滴と融合し分裂することによって、初期状態に戻る（自己再生産）。そして、RNA 複製酵素がその遺伝子を複製する際には突然変異を引き起こす。この人工細胞モデルの指数的増幅と希釈を、細胞の継代培養と同様に行うと、2 ケタ以上の遺伝子複製能の向上が見られた（進化能）。また、希釈率を下げて選択圧を弱くすると、寄生体 RNA が生じ、典型的なホストーパラサイト振動が現れた（寄生体感染）。このように分子の寄せ集めによって細胞の特徴が再構成された。

この分子の寄せ集めモデルが進化する条件はなんであろうか？上記の遺伝子複製システムでは、タンパク質が遺伝子合成の触媒であり、遺伝子がタンパク質合成の触媒である。よって、化学反応としては、それぞれの濃度が高いと全体の速度が上昇する。しかし、進化実験の結果は異なっていた。遺伝子複製系を脂質 2 重膜小胞（リポソーム）に封入して、人為選択による実験進化を行うと、リポソームあたり遺伝子が多分子であるより、約 1 分子であるほうがより高い進化能を示した。このことは、リポソームを用いた膜たんぱく質の実験進化でも同じである。複数の遺伝子がリポソームに封入されてしまうと、特定の遺伝子に生じた変異の効果がリポソームの表現型では小さく、進化が困難となった。分子の寄せ集めである反応ネットワークが進化するには、遺伝子が存在するだけでなく、その分子数が少数であることが必須である。

artificial cell, evolution, liposome

講演番号：4SY07-6
講演日時、会場：3 月 29 日 11:45～ E 校舎 21 会場

農芸化学と合成生物学は何をもたらすか
What do biotechnology and synthetic biology bring?

○赤田 倫治（山口大医系）
○Rinji AKADA (Yamaguchi Univ.)

異種遺伝子を他の宿主生物に導入し，発現させることから，遺伝子工学が始まった。歴史上存在しなかった生物が誕生したということで，生物学者が神の手を持ったように恐れられた（ている）が，生物学者は既に，１遺伝子程度を少々改変しても，それほど劇的な変化が現れるわけではないことを経験的に感じている。変異スクリーニングでもかなりの変化を持つ変異株を得ることが起こるし，逆に劇的な変化が起こる遺伝子を求めていても，なかなか取得できないのが現状である。遺伝子，タンパク質，細胞内代謝産物全部を扱うトランスクリプトーム，プロテオーム，メタボロームなど様々なオーム技術さえ日常化し，ゲノムサイズの DNA 合成も可能となった今，もしかしたら全く新しい生物が本当にできるのではないかと思わせてくれる。しかし，自然を越える人工創造物ははたして生まれているのだろうか。

自然を越えるためには，自然を理解し，模倣する方向だけでは得られないものがあると考えなければならない。あえて，自然を超えるためには自然に学ばない（学び過ぎない）態度が必要である。新たな潮流である合成生物学にも，自然をそのまま合成する考え方が多い。生物ゲノムを合成することは，その技術自体には価値があるが，合成されたものはそこにいる生物と同じものである。新しい生物機能を人工的に創造することができなければ自然を真似ているだけとなる。考え方を区別し，転換できる人たちが必要な時期に来ているのではないだろうか。

農芸化学などのバイオテクノロジーに従事する我々は，実用的に役に立つものを造ることが目的である。我々が，先陣をきって自然を越えた高いレベルを目指すことが使命なのではないだろうか。合成的なアプローチとバイオテクノロジーは，生物学を越えて‘新たな機能を創造する’方向に向かうことができる。合成生物学による人工創造物が神の手となることができるか，本シンポジウムで考えてみたい。

Genetic engineering, Biotechnology, Synthetic biology

講演番号：4SY08-1
講演日時、会場：3 月 29 日 13:35～ E 校舎 11 会場

微生物・固体間電子移動に基づく酢酸生成反応とその鉄腐食への関与

Microbial acetogenesis inducing biocorrosion via electron uptake from metallic iron

○加藤 創一郎 [1,2,3] ([1] 産総研生物プロセス、[2] 東大先端研、[3] 北大院農)
○Souichiro Kato[1,2,3] ([1]AIST, [2]Univ. of Tokyo, [3]Hokkaido Univ.)

微生物の中には鉱物や電極といった固体物質を呼吸の電子供与体、あるいは電子受容体として利用し生育可能なものが存在する。そのような微生物の特性を利用した、固体金属の溶解によるバイオリーチング、廃水中の有機物を分解し同時に電気エネルギーを生産可能な微生物燃料電池といったバイオテクノロジーが注目を集めている。その一方で、微生物・固体間電子移動反応が鉄の腐食（さび）にも関与していることが近年明らかにされつつある。鉄腐食は鉄表面に電位差が生じ、負電位箇所（アノード）での金属鉄酸化反応（$Fe[0] \rightarrow Fe^{2+} + 2e^-$）と正電位箇所（カソード）での還元反応が共役することで進行する。純粋に電気化学的なカソード反応としては、有酸素条件では酸素還元反応、無酸素条件ではプロトン還元（水素発生）反応が起こる。プロトン還元は非常に遅い反応であるため、無酸素条件での腐食は理論上ほとんど進行しない。しかしある種の微生物が無酸素環境下での金属腐食を大きく促進することが以前から報告されていた。近年の研究により、金属鉄中の自由電子を積極的に電子・エネルギー源として利用可能な微生物（硫酸還元菌・メタン生成菌の一部）がカソード反応を促進し腐食を引き起こす、との見方が強まってきた。しかし、鉄腐食を有意に促進する微生物の純粋分離例は数少なく、またその金属鉄 - 微生物間電子移動反応の分子メカニズムは不明である。

我々は鉄腐食を促進する新規微生物の取得を目的とし、水田土壌を微生物源、金属鉄粒子を唯一の電子供与体、CO_2 を唯一の電子受容体とした淡水無機培地、すなわち鉄腐食が生育の絶対条件である環境で微生物の集積培養をおこなった。その結果、鉄の酸化反応に伴う酢酸の生成が観察され、またその過程における鉄の酸化（すなわち鉄腐食）速度は微生物なしのコントロールよりも有意に高いものであった。集積培養物から酢酸生成菌 *Sporomusa* sp. GT1 株を分離し、金属鉄を唯一の電子源とした環境で培養したところ、既知の酢酸生成菌の 5-10 倍ほどの速度で鉄酸化・酢酸生成をおこない良好に生育することが確認された。通常の酢酸生成菌は水素と二酸化炭素から酢酸を作ることでエネルギー得て増殖をするが、この新規分離株は水素の代わりに鉄を電子源として酢酸を作ることで増殖し、またその結果鉄腐食を促進しているものと考えられる。本研究結果は微生物による酢酸生成が硫酸還元、メタン生成に次ぐ第 3 の鉄腐食促進代謝機構であることを初めて証明したものであり、今後実際の微生物腐食現場における寄与を解明していく必要がある。

biocorrosion, acetogenesis, extracellular electron transfer

講演番号：4SY08-2
講演日時、会場：3 月 29 日 14:05～ E 校舎 11 会場

電気化学的代謝制御による嫌気微生物腐食の抑制

Suppression of anaerobic microbial corrosion by electrochemical metabolic regulation

○中村 龍平[1]、岡本 章玄[1]、川市 智史[1]、茂木 岳人[2]、橋本 和仁[2]([1]理研環境資源、[2]東大院工)
○ryuhei nakamura[1], akihiro okamoto[1], satoshi kawaichi[1], taketo mogi[2], kazuhito hashimoto[2]
([1]RIKEN CSRS, [2]Univ. Tokyo)

現在、石油パイプラインなどの配管や船底などが微生物腐食にさらされ、その対策に莫大なコストとエネルギーが投入されている。微生物腐食の多くは嫌気環境で進行し、急速な腐食ならびに鋼管を貫通するような孔食と同時に黒色の沈殿物（硫化鉄）の生成が確認されていることから、硫酸還元細菌の関与が指摘されてきた。[1] 硫酸還元細菌による腐食促進の機構として、金属上で進行するプロトン還元により発生する水素を硫酸還元細菌が消費し、その結果カソード反応が促進される「カソード脱分極理論」が提唱された。[2] しかし近年、水素利用可能な硫酸還元細菌の多くは腐食促進を示さなかったという報告等、カソード脱分極理論に反する実験結果が確認されており、硫酸還元細菌の腐食への影響について議論が続いている。[2,3] 微生物腐食のメカニズムが未解明な現状においては、微生物腐食に対する防食法は殺菌剤を用いる高コストかつ環境負荷の高い方法が主流であり、腐食機構の解明に基づく、より有用な防食法の開発が期待される。

一方で、近年微生物電気化学の分野において電流を生産する微生物が発見され、これらの微生物は細胞外電子移動によって細胞外の不溶性ミネラル（酸化鉄、硫化鉄、酸化マンガン）と電子をやりとりすることが明らかとなってきた。[4] また、電極電位制御によって細胞外電子移動を行う微生物の代謝が制御されるという現象も発見されている。[5] そこで本研究では、微生物電気化学の知見を踏まえ、微生物腐食を引き起こす微生物も同様に細胞外電子移動を行うとすれば、電位制御により代謝活性を制御でき、微生物腐食に対する新規防食法の開拓に繋がるという仮説を立て、微生物腐食に対する新規防食法の開発を目指し、電位制御による防食の効果の検討、及びそのメカニズムの検討を行った。

[1]H.H.Uhlig, R.W.Revie, Corrosion and Corrosion Control 3rd Edn. Wiley-Interscience, New York, 1989 [2] D. Enning, et al. *Environ. Microbiol.* 2012, 14(7), 1772-1787 [3] K. Mori, et al. *J. Biosci. Bioeng*, 2010, 110(4), 426-430 [4]D.R.Lovley, *Nat. Rev. Microbiol.* 2006, 4(7), 497-508 [5]H.Liu, et al *ChemSusChem.* 2010, 3(11), 1253-6

extracellular electron transfer, mineral, corrosion

講演番号：4SY08-3
講演日時、会場：3 月 29 日 14:35～ E 校舎 11 会場

電子の流れを切り口とした発酵制御と微生物腐食研究

Analysis and control of electronflow in fermentation and biocorrosion

○平野 伸一、長岡 亨、松本 伯夫（電力中央研究所）
○Shin-ichi Hirano, toru Nagaoka, Norio Matsumoto (CRIEPI)

電気事業では発電−送電−配電といった一連の流れに関与する多様な設備を保有しており、それらの腐食対策は設備保守の観点から重要である。これまで腐食研究は材料の側面から主に進められてきたが、近年固体金属を電子供与体とする微生物による金属の溶解（減肉）現象[微生物腐食]が明らかとなってきている。電力設備の多くは多様な微生物が遍在する土壌・水域環境にさらされていることから、リスク評価・適正な対策立案のためには腐食現象を微生物活動の側面からも捉える必要が有る。

微生物の活動は呼吸（好気・嫌気）・発酵・光合成といったエネルギー代謝システムに支えられている。これらシステムの本質は電子供与体（有機物、光、鉄など）から電子受容体（酸素、硝酸塩、硫酸塩など）への電子の流れである。微生物腐食は微生物が引き起こす電子供与体（金属材料）からの電子の流れが産業に負の影響を及ぼす事例である。一方で、この電子の流れを人為的に調整することで微生物の増殖や炭素代謝（有用物質生産）を活性化することを目指し、我々のグループではこれまでに培養液中に設置した電極に特定の電位を印加しながら培養を行う[電気培養法]の開発を進めてきた。本シンポジウムでは、「発酵と腐食」２つの異なる事象に対して、「微生物と電子の流れ」の視点を切り口とした我々の取り組みについて事例を上げて紹介する。

【電子の流れを人為的に調整することによる発酵生産の向上 −電気培養法−】

これまでにバイオ燃料生産プロセス（下水汚泥などのメタン発酵やエタノール、ブタノール発酵）を対象として、電極から電子を微生物（群）に供給することにより、代謝を活性化もしくはスイッチし、バイオ燃料の生産性を飛躍的に向上させることに成功している。電極から電子を供給することがどのように炭素代謝を制御しているか？近年明らかとなってきたそのメカニズムも含めて紹介する。

【金属材料と微生物間の電子流れが引き起こす産業的な負の側面 -微生物腐食の影響評価−】

微生物の関与が疑われる腐食の報告は存在するが、現状では腐食を引き起こす微生物の種類、その影響および腐食メカニズムなど多くの知見が不足しているため、リスク評価および対策の立案が困難である。そこで、我々のグループでは電気培養研究で得られた技術・知見を活かし、金属−微生物間の電子の流れを視点とした腐食速度および影響評価を進めている。本シンポジウムでは、土壌中に埋設された設備を想定し、嫌気環境における硝酸還元や硫酸還元、酢酸生成、メタン生成といった代表的なエネルギー代謝を対象にした最新の研究成果を示すと共に、微生物腐食研究の産業界での位置づけ、将来展望などについても議論したい。

electron flow, fermentation, biocorrosion

講演番号：4SY08-4
講演日時、会場：3 月 29 日 15:05～ E 校舎 11 会場

金属微細組織と微生物付着の相互作用の可視化に関する検討～微生物腐食を誘導する金属学的因子の影響解明にむけて～

Visualization of the interaction of metal microstructure and bacterial attachment ～To elucidate the effect of metallurgical factors on MIC:Micro biologically Influenced Corrosion～

○宮野 泰征[1]、稲葉 知大[2]、野村 暢彦[2] ([1]秋田大理工、[2]筑波大生命環境)
○Yasuyuki Miyano[1], Tomohiro Inaba[2], Nobuhiko Nomura[2] ([1]Akita Univ., [2]Tsukuba Univ.)

自然環境中の微生物の直接的あるいは間接的活動により材料の腐食劣化が促進される現象が知られている。この現象は微生物腐食と呼ばれ、炭素鋼、銅合金、アルミニウム合金などのほか、耐食性に優れるステンレス鋼などでも発生が報告されている。特徴は、金属材料が腐食影響を受けにくいとされる中性・常温・常圧環境（マイルドな環境）でも、微生物の生育条件等が整うと異常な速度で大きな腐食影響がもたらされる点にある。エネルギー関連施設で微生物腐食の発生が確認される場合、経済的損失として注目されるケースも多く、抑止対策・機構解明に向けた研究が推進されている。材料工学の分野からは、電気化学的手法を駆使した研究が多数報告される一方、金属の腐食発生部位と微生物付着部位との相関に着目した金属材料学的観点からの検討報告もある。

金属材料の組織には粒界などの原子配列の乱れや、析出物のような構成原子の不均一が存在し、これらが金属表面の物理･化学的物性に影響を及ぼす場合もある。ステンレス鋼は多様な合金元素を有するため溶接などの熱履歴により、組織形態、合金元素の分布および存在形態など、金属学的因子（金属組織の微視的特性）が多様に変化してしまう可能性を有する。ステンレス鋼溶接部が微生物腐食の多発サイトとなる原因について、前述した金属学的因子が微生物付着･バイオフィルム形成を誘導し、結果として微生物腐食の発生が促される、とする考え方もある。これまで、様々なミクロ観察的手法により付着微生物と金属組織の位置関係が検討されているが、観察対象としての特性が大きく異なる微生物と金属の双方を同時に観察する技術には多くの課題が残されている。微生物腐食の機構解明に向け、微生物腐食発生の一連の過程（微生物着床、バイオフィルム形成、腐食発生）を可視化することは極めて重要な知見の獲得につながる。対象微生物を非破壊、無染色で in-situ 観察する技術、さらに微生物生育環境で金属表面と微生物を同時 in-situ 観察する技術の確立が期待されている。

本報では、近年確立された共焦点反射顕微鏡（COCRM）法を、金属材料学的観点からの微生物腐食研究に導入した場合の新たな研究の可能性について報告する。その一つとして、微生物の付着を優位にする金属学的因子となる析出物の効果に期待し、P, S の析出が促される処理を施した金属試験片を対象に、微生物培養系での金属表面および微生物の同時 in-situ 連続観察を実施し、腐食発生と付着プロセスの同時可視化実現の可能性について検討した。もう一つとして、一軸流れ場に配置した溶接形状（凹凸）を有する試験片に対して起こる微生物付着挙付着挙動の解析を目的に、GFP 組換え株をバイオフィルムトレーサーとして応用した可視化の実験的検討を行った。

Microbiologically influenced corrosion, metal microstructure, bacterial attachment

講演番号：4SY08-5
講演日時、会場：3 月 29 日 15:35～ E 校舎 11 会場

AFM によるバイオフィルム生成挙動の解析

Atomic force microscopy analysis of behavior of biofilm formation

○平井 信充[1]、カームン マー[1]、ボ ジホン[1]、小澤 ひかり[1]、生貝 初[1]、兼松 秀行[2] ([1]鈴鹿高専生物応用化学科、[2]鈴鹿高専材料工学科)
○Nobumitsu Hirai[1], Mah Kar Mun[1], Zhihong Bao[1], Hikari Ozawa[1], Hajime Ikegai[1], Hideyuki kanematsu[2] ([1]Dept. Chemistry and Biochemistry, NIT, Suzuka College, [2]Dept. Materials Science and Engineering, NIT, Suzuka College)

プラスチック等の生体材料上に生成されたバイオフィルムは、例えば感染症の原因になるなどの問題があり、その生成の低減化に向けた知見が必要とされている。その際、バイオフィルムの形態や生成挙動を可視化することにより、必要とする知見が得られることが期待できる。各種材料表面に生成したバイオフィルムの可視化手法としては、共焦点レーザー顕微鏡、光学顕微鏡、低真空 SEM、放射光による観察等、多岐にわたる。一方、原子間力顕微鏡(Atomic force microscope; AFM)は、真空中、大気中、液中等、観察雰囲気を問わず、ナノスケール～ミクロンスケールでの３次元分解能を有するため、表面観察ツールとして様々な分野で用いられている。その大気中や液中における３次元分解能は Z 方向が特に優れているが、他の顕微鏡と比較すると、寧ろ XY 方向の高分解能も特徴の一つと言える。以上のことから、AFM は原理的にバイオフィルム生成のごく初期過程の解析には適していると考えられるものの、バイオフィルム観察への AFM の適用は極めて限られているのが現状である。そこで本研究では、各種材料表面に生成したバイオフィルムの AFM 観察を通じて、特に基板の影響に着目して、以下の２つの立場から解析した結果について報告する。

１．各種基板上に生成したバイオフィルムの形態観察

バイオフィルムは基板種によって成長速度が異なることが知られているが、基板の表面エネルギーのみでは説明がつかないなど、違いが生じる理由の詳細については現状不明である。本発表では、兼松らが開発した、冷却管を簡易的に模擬した実験室的バイオフィルム加速生成試験機(Laboratory Biofilm Reactor; LBR)を用いて、LBR 中に各種基板を一定時間導入して基板上にバイオフィルムを生成させた際、その時のバイオフィルムの厚さを基板の重量変化から調査し、また、表面粗さを AFM 観察から調査することにより、バイオフィルムの成長挙動が基板の種類によりどのように異なるかについて検討した結果について報告する。

２．各種基板上への微生物の付着過程の観察

バイオフィルム生成は、コンディショニングフィルム生成→微生物付着→EPS 生成といった流れで進むことから、ごく初期過程である「基板上への微生物付着挙動」が基板の種類によってどのように変化するかは、前述の基板種によるバイオフィルム生成速度の違いといった観点からも極めて興味深い。そこで、本発表では、緑膿菌バイオフィルムや前述の LBR により生成したバイオフィルムについて、微生物が付着する過程について AFM を用いて観察した結果について報告する。

biofirm, Atomic Force Microscopy, Laboratory Biofilm Reactor

講演番号：4SY08-6
講演日時、会場：3 月 29 日 16:05～ E 校舎 11 会場

日本発の腐食菌検出技術および防食技術の開発を目指して

Toward the development of made-in-Japan technology for diagnostic and anti-corrosion methods against microbiologically influenced corrosion

○若井 暁 (神戸大自然)
○Satoshi WAKAI (Kobe Univ.)

微生物が引き起こす金属の腐食現象は、微生物腐食として古くから知られている。微生物腐食は、経済的な損失と時には重大な環境汚染を伴う。たとえば、石油を輸送するパイプラインで腐食が生じた際には、膨大な量の石油が環境中に放出され環境が汚染される。経済的な面としては、アメリカで年間 2470 億ドル、日本で約 15～20 兆円の腐食コストが生じていると試算されており、腐食全体の 10~50%程度に微生物が関与していると推定されている。この関与の割合についての大きな振れ幅は、微生物腐食に対する理解が海外でも遅れており、明確な原因菌のリスト化やその腐食能の強弱等についての情報が整っていないことに起因する。

微生物腐食の概念としては、1930 年代に、水素消費を行う硫酸還元菌が金属腐食を引き起こすという仮説が提唱されている。以来、多くの研究者は、腐食能を持つ微生物の探索、腐食メカニズムの解明に取り組んできたが、研究室レベルで強い腐食現象を再現できる微生物は見つかってこなかった。2004 年 Nature 誌に Dinh らが、腐食能を示す微生物の報告をした。その後、日本の研究者によって、鉄腐食性メタン生成菌、鉄腐食性硝酸還元菌、鉄腐食性酢酸菌、ヨウ素酸化細菌の発見が相次いで報告されている。

腐食能を持つ微生物の研究はここ 10 年で急速に進んだが、大事なことは微生物腐食を如何にして抑え込むかということになる。人に病気を引き起こす感染症に例えるならば、微生物腐食は金属が患う微生物感染症であり、現在の研究レベルは未知の完成賞に対する原因微生物を突き止めたに過ぎない。感染症対策には、その特異的な検出技術に依存した診断技術の開発が必要であり、感染や発症を抑えるための予防・治療が必要である。

演者は、腐食に関与する微生物を特異的かつ定量的に検出することを目的として、日本で発見された鉄腐食性メタン生成菌を特異的に検出する方法をこれまでに確立している。腐食能を示す菌株と腐食能を示さない微生物の全ゲノムの比較は、腐食菌のみに存在する数千塩基対から成る挿入遺伝子部位を明らかにした。この領域を標的に遺伝子検出を行うことで、腐食リスクを評価することに成功している。また、腐食診断技術の開発と並行して、この鉄腐食性メタン生成菌による腐食を抑制するための技術開発を行ってきた。本発表では、微生物腐食診断・抑制技術の開発につながるこれらの研究について紹介する。

biocorrosion, metal, methanogen

講演番号：4SY09-1
講演日時、会場：3 月 29 日 9:05～ B 校舎 33 会場

酵母の表現型に影響する培地成分の違い

Effects of media on phenotypes of yeasts

○川向 誠（島根大生資）
○MAKOTO KAWAMUKAI (Shimane Univ.)

酵母の表現型が、使用する培地の成分の違いによって違うことは、経験的には色々と知られている。分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* を例に挙げると、G418 やハイグロマイシンの薬剤耐性を選択する際に最小培地では、薬剤感受性がでにくく、栄養培地を使用する。これは窒素源の影響だと言われている。また、分裂酵母を培養する時には、0.5%Yeast Extract と 3%のグルコースを含む YE 栄養培地をよく使用するが、Yeast Extract の種類によって、*ade6* 変異体の赤色コロニーの濃淡が違ってくる。*ade6* 変異体では、前駆体の赤色素が蓄積するが、Yeast Extract 中のアデニンが十分であると白色に近い。Yeast Extract は、酵母の抽出液であるが、使用されている酵母が、*Candida* か *Saccharomyces* なのか、*Saccharomyces* の中でも *S. cerevisiae* なのか *S. pastorianus* かによって、当然のことながら含まれている成分が違う。メーカーによって、使用している酵母株が違い、製法も違っていることから、場合によっては大きく表現型に影響する。ポリペプトンは、分裂酵母 *S. pombe* を培養する時には、悪影響を及ぼすことから、*S. cerevisise* でよく使われる YPD 培地は分裂酵母の培養にはあまり使用しない。

分裂酵母の *ura4* 変異体は、まさに、Yeast Extract とポリペプトンによって大きくその表現型が影響される。我々の最初の観察は *S. pombe* を YPD 液体培地で培養して、エタノール生産性を検討した際に、細胞が破裂するように溶解するというものであった。幾つかの変異体を培養してみて、共通性を見たときに、*ura4* 変異が入っていると溶解するが、コエンザイム Q を合成できない株は溶解しないことがわかった。この組み合わせに驚いたが、興味深い現象がここに秘められていると感じ研究を進めた。まず *S. pombe ura4* 変異株が細胞溶解することは、ウラシルの枯渇が原因であることが分かった。Yeast Extract に十分なウラシルが含まれていると溶解しないが、量が少ないと溶解する。その量はメーカーによって違っていた。ポリペプトンは、細胞溶解を促進する方向に働くが、どの成分が促進的に働くかは現在も調べている。細胞溶解は単にウラシル要求株であれば良いのではなく、他の *ura1,2,3* などの変異体は細胞溶解せず *ura4* 変異体特異的である。やっかいなことに、この *ura4* 変異体と *ura4* 遺伝子が、広く選択マーカーとして分裂酵母の遺伝的解析に使われている。*ura4* 変異体では、前駆体の OMP が蓄積しており、この OMP が細胞壁合成になんらかの影響を及ぼすことが細胞溶解につながっていると考えている。その考えを支持するように、分裂酵母の *ura4* に相当する *ura3* 変異を有する出芽酵母は OMP の蓄積がなく、細胞溶解も起こらない。

fission yeast, yeast extract, broth

講演番号：4SY09-2
講演日時、会場：3 月 29 日 9:30～ B 校舎 33 会場

CDMO による微生物発酵の培養条件の最適化及びスケールアップ　ーケーススタディー
Culture Medium Optimization and Scale-Up for Microbial Fermentation by CDMO -Case Study-

○真岡 宅哉[1]、中村 雅哉[2]、大塚 祐一郎[2]、片山 義博[3]、小菅 康孝[1]、山本 泰司[1]、吹田 喜数[1] ([1]神戸天然物化学株式会社、[2]森林総合研究所、[3]日本大学)
○Takuya Maoka[1], Masaya Nakamura[2], Yuichiro Ootsuka[2], Yoshihiro Katayama[3], Yasutaka Kosuge[1], Yasushi Yamamoto[1], Yoshikazu Fukita[1] ([1]KNC Laboratories Co., Ltd., [2]Forestry and Forest Products Research Institute, [3]Nihon Univ.)

神戸天然物化学は、１９８５年２月創業以来、“化学合成”技術にて医薬分野、電子材料分野、化成品分野において研究、試作から製造にいたる幅広いステージでお客様のご支援を仕事とし、受託企業としてお客様と共に成長してまいりました。また、２００５年５月、ＫＮＣバイオリサーチセンターを開設し、バイオ分野へ本格的に進出いたしました。バイオ分野の受託サービスについては、今まで培ってきた高度な大量分離精製技術も絡めて、ペプチド合成、核酸合成、糖合成、微生物発酵による天然物の生産、遺伝子組み換え微生物を用いた酵素、ペプチド、蛋白質の産出やバイオコンバージョンによる有用化合物の受託サービスを展開させて頂いております。特に微生物培養については、得意とする分離精製技術を駆使して目的とする蛋白質、二次代謝産物やバイオコンバージョンをｍｇ～ｋｇオーダーでご提供させて頂いております。
委託先のお客様からフラスコスケールでの実績のみで大型の培養釜での培地や培養条件のご提示がない場合でも、培地や培養条件についてプロセス開発を行い、２０１４年１０月に完成しました微生物発酵新工場にて最大５，０００Ｌまでスケールアップすることが可能です。培養から菌体除去までの作業エリアではＰ１レベルでの管理で遺伝子組み換え体を扱うことができ、ＧＩＬＳＰ（Good Industrial Large-Scale Practice）並びに医薬品開発に必要なＧＭＰ（Good Manufacturing Practice）対応も可能です。
神戸天然物化学は、ＣＤＭＯ（Contract Development and Manufacturing Organization）としてお客様からご依頼頂いたテーマについて、お客様から開示頂いた製法による製造のみではなく、微生物培養のスケールアップを見込んで培地・培養条件のプロセス開発を行い、目的物の生産性を増加させるのと併せて、微生物培養以外の精製工程等も含めた生産時にも対応できる培地・培養条件並びにコストも考慮した各種条件を確立させております。
本シンポジウムでは、神戸天然物化学にて独立行政法人 森林総合研究所より受託させて頂いたテーマ【遺伝子組み換え微生物によるバニリン酸を基質として得られる２-ピロン-４，６-ジカルボン酸（ＰＤＣ）についての培地・培養条件のプロセス開発と２，０００Ｌ培養槽での培養】についてスケールアップを見込んだ培地・培養条件のプロセス開発を行ったケーススタディとしてその実績について２，０００Ｌ培養槽での工業化の成功、培地・培養条件の開発時の問題点や苦労話も交えて受託会社の現状を発表させて頂きます。

Contract development and manufacturing organization, 2-Pyrone-4,6-dicarboxylic acid, Fermentation

講演番号：4SY09-3
講演日時、会場：3 月 29 日 9:55～ B 校舎 33 会場

発酵醸造食品生産における培地・培養考
Studies on Medium and Culture Conditions in Fermented Food Production

○宇多川 隆（福井県大生物）
○Takashi Utagawa (Fukui Prefectural Univ.)

【古典発酵の原料転換】古典発酵には原料と製品が１対１で対応しているものが多い。例えば、清酒はコメを、チーズは乳を原料としている。しかしながら、長年守られてきた古典発酵の技を新しい原料に応用するとユニークな製品ができる場合がある。福井県をはじめとする北陸地方には、魚を糠漬け発酵した「へしこ」という伝統的食がある。もともとは鯖を原料としたものであるが、鰯や鰊などに展開するとそれぞれ特徴ある製品が得られる。私たちは、魚介類から食肉へと「へしこ」の技を展開した。豚肉を原料とすると日本的な味の「ハム」ができる。獣害で嫌われている猪肉を発酵すると、コクのあるハムになり「いのししへしこ」として既に市販している。
ワインはブドウを原料とするが、我々は、福井の梅肉製造老舗の梅壺から分離した梅酵母を用い、福井梅を原料とする「梅ワイン」を醸造し販売している。ビールは二条大麦を原料とするのが一般的であるが、福井で大量に栽培されている六条大麦を原料とすると、独特の深い味わいのあるビールに仕上る。好評である。梅酵母の中から麦芽糖資化性の強い酵母を選抜し醸造に供している。
【古典発酵の条件転換】魚醤は、魚を大量の塩（２５％程度）に漬け込み、長時間（６ヶ月以上が多い）発酵させることによって作られている。塩は雑菌の増殖を抑えるのに必要であるが、高濃度の塩は魚醤生産を担うプロテアーゼの活性を強く阻害し、発酵時間が長くなる。塩に代わる雑菌制御法として、加温する方法がある。高温下で発酵すると、雑菌の繁殖が制御されるとともにプロテアーゼが活性化され、発酵速度が著しく早くなる。この知見を活かし、鯖の内臓肉を無塩状態において５５℃で発酵すると、従来の方法では約１ヶ月間かけて発酵していた鯖魚醤が１日の発酵で作れるようになった。短時間発酵で得られた鯖魚醤のアミノ酸組成・濃度は、長時間発酵で作ったものとほとんど変わらない。短時間で発酵が完了するために、ヒスチジンのヒスタミンへの分解が起こらず品質的にも良好な製品ができる。また、短時間の高温発酵では酵母が生育できず、アルコールの蓄積は全く認められない。本品を利用して開発した醤油風ノンアルコール魚醤に対して、イスラムの方々が口にできるハラールの認証が与えられた。本法では発酵時に塩を添加しないので、無塩の魚醤を調製することができる。無塩魚醤と一般醤油を等量ブレンドすると塩分濃度がほぼ半分の減塩魚醤油が得られる。また、鯖以外の様々な魚介類を原料とする魚醤の生産も短時間の発酵で可能となった。

･･･このように、古典発酵の原料や条件を見直すと、新製品の開発につながることがある･･･

Heshiko, plum wine, fish sauce

講演番号：4SY09-4
講演日時、会場：3 月 29 日 10:20～ B 校舎 33 会場

生食用スピルリナの最適培養法

Optimal culture condition for production of *Spirulina platensis* as fresh food

○佐々木 俊弥 (株式会社タベルモ)
○Toshiya SASAKI (Tavelmout Corporation)

スピルリナ（*Spirulina platensis*）は、35 億年前に地球上に誕生したと言われるシアノバクテリア門、いわゆる藍藻類に属し、トリコームと呼ばれる一列に並んだコイル状の視覚的に特徴的な群体を形成する。主に健康食品として世界に流通しており、海外ではクロレラよりも認知度は高く、年間 3000t が消費されている。

光合成作物の中で単収と栄養バランスに優れることから、食卓の上で野菜と並ぶ食材としてスピルリナを世の中に浸透させていきたいという考えの下、株式会社ネオ・モルガン研究所とビューテック株式会社が共同研究の末、生の冷凍物として販売に漕ぎ着けた。本講演では販社の代表として、培地と培養の観点から、（１）生で安全に提供するための食中毒菌を防ぐ培養、（２）製品の特長である色素を高含量に保つ培地、（３）単収を上げるための培養方法、の３研究を交えて取り組みの全体像について報告する。

スピルリナを生で提供するにあたり、最初に食中毒菌のリスクが浮上した。幸いなことに、スピルリナには食中毒菌が繁殖しにくい高 pH、高塩濃度を好む性質がある。そのため、商業生産で一般的に用いられていると考えられる SOT 培地よりも、さらに高 pH、高塩濃度に維持可能な NML 培地を新たに開発することで、雑菌が限りなく少ない環境を作り出すことに成功した。

シアノバクテリア特有の青色色素タンパク質であるフィコシアニンは、免疫賦活作用が報告されているが、強光下の培養では藻体中の含有量が減少し退色することがあり、商品価値が損なわれる。SOT 培地に比べ NML 培地では顕著に退色が起こりやすいことから、培地成分に着目すると、SOT 培地には NML 培地に含まれていない EDTA と微量金属群が含まれ、リン源は 2 倍量含まれていた。そこで、各成分を NML 培地へ添加した結果、微量金属群のうちモリブデン（Mo）添加において強光下での退色を防ぐことを見出した。Mo は硝酸還元酵素の構成金属として窒素代謝に関与するとされていることから、Mo が存在することで、培地中の硝酸態窒素の有効利用に寄与している可能性が考えられる。

より多くの製品を流通させられるよう、単収を上げる取り組みも行っている。屋外での実生産培養では、強光での退色を防ぐ目的で太陽光を一定の照度以下に遮光しているため、藻体の増殖に利用できる太陽光には余地があると考えられた。そこで、実験室内と 2,600L の水量を持つ屋外レースウェイ型ポンドを用い検討を行った結果、照度が高くなるにつれ増殖速度も高くなる傾向が認められた。

Spirulina platensis, Molybdenum

講演番号：4SY09-5
講演日時、会場：3 月 29 日 10:45～ B 校舎 33 会場

発酵培地視点でのハラール、コーシャ要求事項

Halal and Kosher requirments from fermentation media aspects

○小川 知成（天野エンザイム株式会社　品質保証本部）
○Tomonari Ogawa (Amano Enzyme Inc.　Quality Assuarance Division)

食品業界での最近の話題は、イスラム教のハラール認証とユダヤ教のコーシャ認証である。ハラール、コーシャともにイスラム教やユダヤ教の戒律に基づく食規定である。

世界のムスリム（イスラム教徒）の人口は、約 18 億人で世界人口の約 25%を占めている。10 年後には 30 億人に達すると言われている。現在、ハラール産業の市場規模は 2 兆 1000 億米ドル（内、食品は 5800 億ドル）とも言われており、国際的（特に東南アジア諸国）なビジネスを行う企業にとって、ハラール認証取得の必要性はますます高まっている。このハラール認証取得には、ハラール認証団体による実施調査で原料、製造工程や製造設備の確認が行われている。ムスリムにとって、ハラール食品のみを摂取することは義務であるため、ハラール製品とノンハラール製品が輸出されれば、ハラール製品はムスリム消費者にとっての第一の選択肢となる。ハラールの認証範囲は、食品だけに留まらず、食品添加物、食品を提供する場（レストランなど）、化粧品、医薬品、トイレタリー製品に拡大されつつある。

一方、ユダヤ教人口は、約 1400 万人と言われている。コーシャ市場の大きな特徴は、ユダヤ教徒のみのニーズによる市場ではない。特に米国市場においてその傾向は強く、消費者がコーシャ製品を求める理由は、原料のトレーサビリティーの確保、第三者であるラバイの実施調査による製造工程の確認といった認証プロセスを経ているため、消費者に安全・安心のイメージを与えていると考えられる。

ハラール、コーシャの食事に関する戒律は豚肉が禁止されていると言った似た部分もあるが、それぞれで食べてもいいものと食べてはいけないものが規定されており、異なるところもある。これらの規定を正しく理解することが製造に使用する原料を選択する上で重要となる。

ハラール、コーシャともに最終製品（食品・食品添加物）ができるまでの原料のトレーサビリティーが求められており、食品や食品添加物を製造する場合、その製造に使用する原料メーカーより原料のハラール、コーシャ認証取得状況、原材料（水・蒸気を含む）の起源・製法を事前に確認することが必須となる。この確認で戒律を違反するものがあれば、認証が得られないことになる。

今回は、ハラール、コーシャの観点より求められる微生物が産生する酵素（プロテアーゼ、アミラーゼ、リパーゼ等）製造に用いるクリティカルな培地原料を中心に両者を比較しながら注意点を紹介する。

Halal certificate, Kosher certificate, Fermentation media of microbial enzymes

講演番号：4SY09-6
講演日時、会場：3 月 29 日 11:10～ B 校舎 33 会場

培養基材の世界動向について
Global trend of ingredient for culture media

○藤本 拓（長瀬産業株式会社）
○Taku Fujimoto (Nagase & Co., Ltd.)

ナガセグループは、バイオ分野における研究開発を担う長瀬産業研究開発センター、産業用酵素を製造するナガセケムテックス、および機能性糖質を製造する林原などにおいて、発酵・培養にかかわる事業活動を通じ各種培養基材を産業利用している。

培養基材の学術・研究活動における利用に比較して、その産業における利用には、供給安定性、コストなどの制約があり、産業の発達とともに、アレルゲン、コーシャ・ハラル、遺伝子組換由来、各種規制などの制約が増える傾向にある。

以上の観点から、ナガセグループの培養基材の産業利用に関わる事業活動の概要とともに、つぎのような主な産業用培養基材とその市場を紹介する。また、代表的な培養基材については、産業上の制約から変化する世界の動向を紹介する。

C源：	デンプン、廃糖蜜、グルコース、グリセリン、デキストリン、天然油など
N源：	大豆粉、コーンミール、ふすま、酵母エキス、ペプトン、カゼイン、肉エキス（動物・魚）など
その他栄養源：	コーンスティープリカー、無機塩類、ビタミンなど
その他基材：	消泡剤、抗生物質、寒天など
培養基材の動向：	食品・化粧品・医薬品等ミドル～ハイエンド製品用の培養基材、動物由来・植物由来原料、コーシャ・ハラル、固体培養・液体培養、合成培地・天然培地、アレルゲン、遺伝子組換由来、各種規制など

culture media, industry, global trend

講演番号：4SY09-7
講演日時、会場：3 月 29 日 11:35～ B 校舎 33 会場

培地から生産物品質を管理する：トレハロースによる抗体凝集

Quality control via media formation: Trehalose suppresses antibody aggregation

鬼塚 正義[1]、岩城 完三[2]、岡 茂範[3]、○大政 健史[1,4]（[1]徳島大院 STS 研、[2]（株）林原、[3]長瀬産業（株）、[4]大阪大院工）
Masayoshi Onitsuka[1], Kanso Iwaki[2], Shigenori Oka[3], ○Takeshi Omasa[1,4] ([1]Tokushima Univ., [2]Hayashibara Co., Ltd., [3]NAGASE & CO., LTD., [4]Osaka Univ.)

2012 年に世界で販売されている医薬品ベスト 10 のうち、1，2 位を含む 6 品目がバイオ医薬品となり、バイオ医薬品は世界の製薬産業の「成長エンジン」としての役割を果たそうとしている。バイオ医薬品の生産、特に抗体医薬生産は、生物である動物細胞を用いる培養によって行われている。特に近年、抗体医薬品の品質保証の観点から、製造プロセスにおいて抗体医薬品の凝集形成を抑制する事が非常に重要な課題となっている。抗体医薬品の多くは特にチャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO 細胞)を宿主として生産され、その細胞培養過程において培養培地中に分泌される抗体が凝集する事が報告されているが、培養工程における凝集抑制の取り組みは殆どなされていない。そこで、トレハロースのケミカルシャペロン機能、即ち抗凝集作用に着目し、トレハロースを含む培養培地で抗体産生 CHO 細胞の培養を行い、培養過程における凝集抑制作用を検討した。

本研究で対象とした抗体は、一本鎖二重特異性抗体(Bispecific single chain diabody-Fc: scDb-Fc)である。人工的にデザインされた scDb-Fc は 2 種類の抗原認識部位を有する為、機能性が高い多価性抗体であり次世代抗体医薬品として大きな期待が寄せられている。一方、我々の検討によると一般の IgG に比較して凝集性が高いという解決すべき問題点があり、凝集抑制を考慮した生産系構築が求められる。培養過程における凝集抑制を目的として、トレハロース含有培地にて scDb-Fc 産生 CHO 細胞の培養を試みた。その結果、興味深いことに、①抗体産生 CHO 細胞株をトレハロース存在下で培養可能である事、②培養過程で生じる Large Aggregates 形成量を大きく抑制できる事を示した。

高品質な抗体医薬品を製造する為には、生産細胞の構築から製剤化までのプロセスを包括的に最適化する事が重要である。トレハロースはバイオ医薬品の保護材として製剤化・長期保存に用いられているが、本研究は細胞培養工程における凝集抑制にも有効である事を示した。今後、培養工程において生産性向上のみならず、品質管理にも重点をおいた培地開発が、動物細胞培養開発にも求めらている。

引用文献　Onitsuka *et al.* Trehalose suppresses antibody aggregation during the culture of Chinese hamster ovary cells. *J.Bisci.Bioeng* **117**(5):632-8 (2014)

Chinese hamster ovary cell, trehalose, antibody

講演番号：4SY10-1
講演日時、会場：3 月 29 日 9:05～ B 校舎 41 会場

『国菌』麹菌の未来 ― ユネスコ無形文化遺産“和食”とともに

The future of "national microorganism of Japan", Koji mold, which is a key player in Japanese cuisine added to UNESCO intangible heritage list

○北本 勝ひこ（東大院農生科）
○Katsuhiko Kitamoto (The Univ. of Tokyo)

一昨年１２月、ユネスコの無形文化遺産に登録された「和食」。その味を決める醤油、味噌、味醂、清酒などの製造にとって麹菌（*Aspergillus oryzae*）はなくてはならないものである。2006 年には日本醸造学会により、我が国を代表する微生物「国菌」に認定された。これは、提唱者の東北大学名誉教授の一島英治先生による貢献が大であるが、最近では、国際的にも認知度は高まりつつある。

ゲノム解析の結果などから、麹菌（*A. oryzae*）は *A. flavus* を祖先として家畜化された微生物であると言われている。種麹屋の歴史は４００年以上といわれているので、麹菌は我が国で、数百年もの長いあいだ優良菌株が綿々と植え継ぎされて得られた菌株、すなわち家畜化された菌株が *A. oryzae* ということになる。以下、家畜化に関しての最近の知見をまとめる。１）*A. flavus* では暗培養条件は分生子形成に抑制的に働く。この性質は、江戸時代以前の種麹製造が通常、地下もしくは半地下の暗所で行われてきたことを考慮すると、優良な種麹（分生子）をたくさんとるには不利な条件である。しかし、*A. oryzae* の分生子形成について調べたところ、暗培養は分生子形成促進に働くことを見出した。すなわち、*A. flavus* のもつ明暗に対する応答が逆転した株が永年の家畜化の過程で取得されたと考えられる。２）*A. flavus* がαアミラーゼ遺伝子を１つだけ持つのに対して、*A. oryzae* は *amyA*、*amyB*、*amyC* の３つをもつ。麹の重要な働きは米澱粉の糖化であることを考えると、家畜化の過程でαアミラーゼ遺伝子が増幅したものが選ばれたと考えられる。３）*A. oryzae* は、近年のゲノム解析によりアフラトキシン生合成遺伝子クラスターの欠落や変異が確認されており、アフラトキシンを生産しないことが明確となった。野外で生育する *A. flavus* ではダニなどに分生子を食べられないように毒素を同時に生産する戦略がとられたものと思われる。４）清酒醸造に使用されている *A. oryzae* では、1 個の分生子細胞に 3～5 個と多数の核が存在する。*A. flavus* は単核の分生子をもつものがほとんどであり、家畜化の過程で獲得された優良な形質が脱落しにくい株が選抜された結果と考えられる。本講演では、麹菌の細胞生物学解析からわかってきたことを紹介するとともに、麹菌研究という日本ならではの科学技術文化を、世界に発信するための未来図についても展望したい。

Aspergillus oryzae, Domesticated microorganism, Koji mold

講演番号：4SY10-2
講演日時、会場：3 月 29 日 9:25～ B 校舎 41 会場

麹菌セラミド関連脂質の免疫・表皮・発酵への機能性

Versatile functions of koji ceramide and related lipids on immunity, skin and fermentation.

○北垣 浩志 (佐賀大農)
○Hiroshi Kitagaki (Saga Univ.)

麹の製造に使われる麹菌は、経口摂取されてヒトの腸管細胞と接触したり、化粧品として使われてヒトの表皮細胞と接触したり、発酵食品の製造時に酵母と接触したりと他の生物種と相互作用するシチュエーションが多くあるのが特徴である。麹菌が他の生物種と相互作用する分子の候補としては生物種によって化学構造の異なるものであることが考えられる。

我々(*J Agric Food Chem*, 60:11473,2012)や帯広畜産大(*BBA,* 486:161,1977)、近畿大(*Biotech Lett*, 36:2507,2014)が明らかにしたように、麹菌のグリコシルセラミドは特異的な分子構造を持つことから特異的な生理作用を持つことが考えられる。本シンポジウムではこれらのいくつかを紹介したい。

1　麹菌のグリコシルセラミドセラミド含有脂質はマクロファージの免疫応答を引き起こす

佐賀県工業技術センターの柘植圭介研究員との共同研究により麹菌から極性脂質を抽出し、シリカゲルクロマトグラフィーで展開してマクロファージへの応答を調べたところ、グリコシルセラミドを含む画分がマクロファージの NO 産生を増加させることを見出した。この結果は麹が経口摂取されたときにも麹菌の極性脂質が腸管の免疫細胞に作用し、自然免疫を活性化する可能性を示唆している。

2　白麹菌のグリコシルセラミドセラミド含有極性脂質は表皮細胞のバリア能を向上させる

東洋新薬および当研究室での研究により、白麹菌からグリコシルセラミドを含む極性脂質を抽出し、表皮細胞への作用を調べたところ、*OCLN*, *CLDN1*, *IVL* などのバリア能に関わる遺伝子の発現亢進およびセラミド量を増加させることが明らかとなった。

3　麹菌グリコシルセラミドは酵母の発酵特性変化を引き起こす

麹菌の脂質が酵母にアルカリ耐性を賦与することを見出し、活性画分を精製して構造決定したところそれがグリコシルセラミドであることを見出した。精製グリコシルセラミドは酵母にエタノール耐性増加や香気生成能の変化を引き起こした。青山学院大学の阿部文快准教授との共同研究により、グリコシルセラミドを加えた時の酵母の膜の物理化学的特性を調べたところ、脂質二重膜への水分子の浸潤度合いが増加していた。このことから麹菌グリコシルセラミドは酵母の膜のパック度合いを下げることによって酵母の発酵特性変化を引き起こしていることが明らかとなった。

麹菌は日本の発酵食品のほとんどに使われていることから、その機能性の解明は和食全体に波及効果があると同時に、麹は永くかつ豊富な食経験があることから、今後新しい機能性食品や化粧品の素材としても有望であると期待される。

Koji, Ceramide, Aspergillus

講演番号：4SY10-3
講演日時、会場：3 月 29 日 9:55～ B 校舎 41 会場

麹のスフィンゴ脂質の機能性について

Sphingolipid function in Koji as food ingredients

○光武 進（佐賀大農）
○Susumu Mitsutake (Saga Univ.)

スフィンゴ脂質は、スフィンゴイド塩基を持つ脂質の総称で、真核細胞の細胞膜脂質として広く存在する。その親水基部分の違いにより、スフィンゴミエリンや、糖脂質等、非常にバラエティーに富んで存在している。当然、食品にも含まれ、ヒトは一日にスフィンゴ脂質を 3-4g 摂取すると考えられている。食品成分中のスフィンゴ脂質は、親水基や脂肪酸が分解され、最終的にはスフィンゴイド塩基の形態で吸収されると考えられている。一方、我々は、640 種類のスフィンゴ脂質合成ライブラリーから peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)の活性に影響を与える分子をスクリーニングした際に、偶然にも phytoceramide を PPAR 活性化分子として同定した。phytoceramide は自然界には酵母の細胞膜スフィンゴ脂質母骨格として存在する。そして我々は、phytoceramide のスフィンゴイド塩基構造である phytosphingosine が PPAR を活性化する事、マウスの高脂肪食誘導性耐糖能異常を改善する事を見いだした。さらに、経口投与された phytosphingosine が、吸収後肝臓まで到達する事も明らかにした。phytosphingosine は、酵母の細胞膜に含まれる事から発酵食品を介して我々は日常的に摂取していると考えられる。一方、日本古来の発酵食品に含まれる麹のスフィンゴ脂質には、9-methyl-4,8-sphingadienine という、菌類／真菌類に特徴的なスフィンゴイド塩基が存在する。本シンポジウムでは、この麹由来 9-methyl-4,8-sphingadienine の生理作用を酵母由来の phytosphingosine と比較し、麹のスフィンゴ脂質の持つ可能性を議論したい。

sphingolipid, PPAR, sphingosine

講演番号：4SY10-4
講演日時、会場：3 月 29 日 10:25～ B 校舎 41 会場

染色体の大規模重複化による麹菌の機能解析と育種への応用

Molecular breeding and functional analysis of *Aspergillus oryzae* by using targeted duplication of a large chromosomal segment

○高橋 理 (野田産業科学研究所)
○Takahashi Tadashi (Noda Institute for Scientific Research)

麹菌の染色体を大規模に重複させることにより、未知遺伝子の機能解析と育種への応用を試みている。これまでに任意の染色体領域のタンデム重複化技術[1]と、大規模染色体領域の重複転座技術[2]の開発に成功した。この技術を用いて作製した 2 番染色体の重複化株では、固体培養において、醸造に重要なプロテアーゼやペプチダーゼ、アミラーゼ等の活性が大幅に上昇していることが確認された。これらについてマイクロアレイを用いた発現解析の結果から得られた知見を紹介する。さらに他の染色体の重複株についても解析した結果、二次代謝や未知のものを含む多くの遺伝子クラスターの発現上昇や低下が見られたこと等について紹介する予定である。

麹菌の全ゲノム配列が解読されてから久しい。また、効率的な遺伝子ターゲッティング技術が開発されたことにより、これまでに多くの遺伝子に対して、破壊株や強制発現株が作製され、解析が行われてきた。しかしながら依然として麹菌の染色体上には多くの機能未知遺伝子が存在する。

また別のアプローチとして染色体の大領域欠失技術を用いた解析も行われたが、この方法には細胞の生育に不必要な領域をあらかじめ特定しなければならないという制約があり、麹菌に対して網羅的に適用するには技術的にもハードルがあった。そこで今回我々は、麹菌の染色体を部分的に重複化し、その表現型の変化をとらえることを試みた。この方法では重複化した領域に存在する遺伝子の gene dosage 効果による表現型の変化をとらえ、機能未知遺伝子の遺伝子機能の推定に利用するとともに、育種への応用を試みた。染色体の重複化では、染色体を欠失させる場合とは異なり、細胞が致死となる可能性が低いため、適用する染色体領域の決定に大きな制約がない。現在、全染色体に対し、順次染色体のタンデム重複株ライブラリーを作製し、その表現型の変化を調べている。

1) Takahashi et al. (2014) Appl.Environ.Microbiol.80:4547-4558.
2) 第 36 回 (2013 年) 分子生物学会年会

Aspergillus oryzae, chromosomal duplication, molecular breeding

講演番号：4SY10-5
講演日時、会場：3 月 29 日 10:55～ B 校舎 41 会場

麹菌ゲノムの違いと清酒メタボライトとの関係
The relationship between the difference of *Aspergillus oryzae* genome and the Sake metabolites
○織田 健[1]、岩下 和裕[1,2] ([1]酒総研、[2]広大先端研)
○Ken Oda[1], Kazuhiro Iwashita[1,2] ([1]NRIB, [2]Hiroshima Univ.)

清酒はメタボライトの塊であることから、メタボローム解析技術と非常に相性が良い。そのため我々を含め、様々な研究グループでメタボローム解析が開始されている。一方で、麹菌(*Aspergillus oryzae*)のゲノムは公開されてから 10 年を迎え、その間、比較ゲノム解析、ポストゲノム解析の結果が多く蓄積してきている。清酒の品質・価値向上やコスト削減のためには、メタボロミクスとゲノミクスの技術や結果を研究や開発にどう活かして行くかが重要である。我々のグループでは、麹菌のゲノミクスはもとより、大阪大学福崎研究室と共同で清酒のメタボロームと官能評価の関連について新たな知見を得ている。また、メタボロミクス技術を用いた製造工程、特に麹菌の菌株と清酒成分との関連について解析している。本シンポジウムでは、我々のグループで行った麹菌ゲノミクスと清酒メタボロミクス解析の結果について紹介するとともに、醸造研究の今後について議論したい。

我々が行った麹菌実用株の比較ゲノム解析の結果、麹菌は 13 の主な系統に分かれ、各系統間では遺伝子の挿入/欠失や SNPs のパターンが異なるとともに、染色体間組換えが高頻度に生じていることを明らかにした。これらのゲノム構造の違いにより、各麹菌の系統間では、性質が大きく異なることが考えられることから、55 株の麹菌を用いて製麹・小仕込みを行い、米麹の酵素力価や清酒の成分等について解析を行った。その結果、麹菌の系統と清酒成分等には関連が見られ、昭和 30-40 年代に主要な麹菌株であったと思われる Sake/Miso 系統の麹菌株群で作成した清酒に比べ、最近の主要な麹菌である New sake 系統で作成した清酒では、アルコール生産量は低くなるものの、酢酸イソアミルやカプロン酸エチル等の吟醸香は 1.5-2 倍高く、お米を良く溶かす経済的な麹菌株から、より高品質の清酒を醸成出来る麹菌株に移り変わったことが示唆された。香気成分は酵母が作ることを考えると、このことは麹菌株の違いが酵母の代謝系に影響を与えたと言うことが出来る。さらに、我々は共同研究で、清酒の濃淡やあと味（ダレ/キレ)、苦味など、これまであまり報告のなかった官能評価得点とメタボライトと関連を明らかにした。これらの中で、濃淡と相関のある物質として麹菌が作る 1-octen-3-ol が、あと味（ダレ）に関係するものとしてアミノ酸が見られるなど、麹との関連が強いメタボライトが見出されている。清酒のダレと関連が見られたアミノ酸のうちアルギニンについては、麹菌株の違いにより極度に変動することから、麹菌のゲノム中にその原因があると考えられる。今後は、これらの清酒メタボライトと麹菌ゲノムとの関連をより詳細に解析することにより、麹菌の新たな育種指標が明らかになるとともに、清酒の品質向上に生かせるものと考えられる。

Aspergillus oryzae, Metabolome analysis, Sake metabolite

講演番号：4SY10-6
講演日時、会場：3 月 29 日 11:25～ B 校舎 41 会場

麹菌の眠れる能力を拓く～有性生殖能力の開発と交配育種への試み

Exploring the sexual reproductive potential of *koji* mold, an attempt at cross breeding

○丸山 潤一（東大院農生科）
○Jun-ichi Maruyama (The Univ. of Tokyo)

麹菌 *Aspergillus oryzae* は、日本酒、醤油、味噌の醸造を通して和食と密接な関わりをもつが、甘酒や塩麹によって麹菌の存在はさらに身近になってきている。麹菌では有性生殖が発見されていないため、複数の株の様々な形質を一つの株に集約する交配育種が不可能である。家畜化され野生形質が低下している麹菌では実際に有性生殖を発見することは難しく、教科書でも麹菌は有性世代がないものとして記述されてきた。最近、演者らは麹菌が有性生殖を行う能力を潜在的にもっていることを明らかにした。本講演では、このような麹菌の交配育種法の開発に向けた取り組みについて紹介したい。

演者らは、麹菌の醸造実用株の接合型を調べた結果、MAT1-1 型および MAT1-2 型の２つの接合型株が存在することを発見し、ヘテロタリックな有性生殖を行う可能性を明らかにした [1)]。また、有性生殖ではまず、２つの接合型株が細胞融合を行うことが必要である。麹菌の細胞融合に関しては、1950 年代に坂口謹一郎東京大学名誉教授らによる報告があるのみで、それに続く研究は途絶えていた。演者らは最近、栄養要求性相補や BiFC (bi-molecular fluorescent complementation)法を利用して、麹菌が細胞融合を行う能力をもつことを約 60 年ぶりに再発見した [2, 3)]。現在は、麹菌の実用株について細胞融合を行う能力があるかどうかの評価を進めている。

菌核は、菌糸が融合や接着を繰り返して形成する耐久構造であり、近縁の糸状菌では菌核内に有性生殖器官が形成されることが報告されている。しかし、麹菌は家畜化の過程で菌核形成能が低下しており、このことが有性生殖能力を見いだすうえの障害となっていた。そこで、菌核形成を制御する転写因子を操作すると、２つの接合型株どうしの融合により形成された菌核が増加した [2)]。さらに、他の糸状菌で報告されている有性生殖の制御因子を高発現したところ、菌核内部での有性生殖器官の形成が麹菌で初めて観察された。

以上のことから、従来は踏み込むことのできなかった、麹菌の有性生殖の潜在能力が明らかになってきた。残されている技術的な課題を解決して麹菌の交配育種法を確立することができれば、これまでにない機能性をもつ麹菌株が開発され、新しい食品市場が開拓されることを期待している。

1) Wada *et al.* (2012) *Appl. Environ. Microbiol.* 78:2819-2829.
2) Wada *et al.* (2014) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98:325-334.
3) Tsukasaki *et al.* (2014) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 78:1254-1262.

Aspergillus oryzae, sexual reproduction, cell fusion

講演番号：4SY11-1
講演日時、会場：3 月 29 日 13:35～ A 校舎 37 会場

肝臓機能におけるポリアミン代謝の役割

The role of polyamine metabolism in liver function

○植村 武史[1,2,3]、高坂 友和[2]、池谷 博[2]、五十嵐 一衛[1,3]([1]株式会社アミンファーマ研究所、[2]京都府立医科大学大学院医学研究科、[3]千葉大学大学院薬学研究院)
○Takeshi Uemura[1,2,3], Tomokazu Takasaka[2], Hiroshi Ikegaya[2], Kazuei Igarashi[1,3] ([1]Amine Pharma Research Institute, [2]Kyoto Prefectural University of Medicine, [3]Chiba University)

【緒言】

ポリアミン（プトレスシン、スペルミジン、スペルミン）は細胞の増殖、機能に重要な役割を果たす。スペルミン酸化酵素（SMO）は、スペルミンを酸化的に分解し、スペルミジンと過酸化水素及び3-アミノプロパナール（3-AP）を生成する酵素である。3-APは非酵素的に反応性の高い不飽和アルデヒドであるアクロレインへと変換される。我々は、肝細胞において、アセトアルデヒドがSMOを転写レベルで誘導することを見出した。そこで、今回我々は、SMOの肝細胞における生理機能を明らかにすることを目的として研究を行った。

【結果】

ヒト肝癌由来HepG2細胞では、高濃度のアセトアルデヒドによりSMOが誘導され、ポリアミン代謝に伴うアクロレインの生成が見られた。SMOの細胞内分布を調べた結果、細胞間に形成される毛細胆管に局在していた。毛細胆管の形成には、SMOが必要であった。毛細胆管の形成時には、SMOとアクチン及びリン酸化Aktの集積がみられた。SMOにより、アクチン及びAkt阻害因子PTENがアクロレイン化されていた。

【考察】

今回我々は、SMOが毛細胆管の形成に重要な役割を果たすことを見出した。毛細胆管の形成には、Aktのリン酸化とアクチンの集積が重要であった。また、SMOによりPTEN及びアクチンがアクロレイン化されることが明らかになった。我々は、他の細胞でビメンチンがアクロレイン化されることを見出している。これらの蛋白質アクロレイン化の毛細胆管の形成における役割を現在検討中である。

毛細胆管は肝細胞間に形成され、分泌された胆汁を総胆管へと導く。毛細胆管の形成障害は、原発性胆汁性肝硬変などの重篤な症状を引き起こす。我々の研究により、飲酒時の肝組織傷害を修復する際、SMOが重要な役割を果たしていることが示唆された。SMO、アクロレインは細胞毒性に注目されてきたが、肝細胞において、生理的に重要な役割を果たしていることが示された。

polyamine metabolism, acrolein, liver

講演番号：4SY11-2
講演日時、会場：3 月 29 日 14:05～ A 校舎 37 会場

ポリアミンによる大腸菌の生理機能の調節
Modulation of physiological functions by polyamines in *Escherichia coli*
○照井 祐介[1]、五十嵐 一衛[2,3]、柏木 敬子[1] ([1]千葉科学大薬、[2]千葉大院薬、[3]アミンファーマ研)
○Yusuke Terui[1], Kazuei Igarashi[2,3], Keiko Kashiwagi[1] ([1]Chiba Inst. Sci., [2]Chiba Univ., [3]Amine Pharm. Res. Inst.)

ポリアミンは細胞内に比較的高濃度（mM オーダー）で存在し、細胞増殖や生存率維持、バイオフィルム形成に必須であることが明らかとなりつつある。しかし、ポリアミンの生理機能は未だ不明な点が多く、分子レベルでの解明が遅れている。ポリアミンは、生命に必須な低分子生理活性アミンであり、ウイルスからヒトに至るほぼ全ての生物に普遍的に存在する。

ポリアミンは主に RNA に結合して構造変化を引き起こし、蛋白質合成を促進することにより細胞増殖因子として働く。私達は、ポリアミンにより翻訳レベルで合成促進をうけ、細胞増殖に必要な蛋白質をコードする遺伝子群をポリアミンモジュロンと命名し、これまでに大腸菌において 11 種を同定した。そのうち 9 種は転写因子であることから、ポリアミンが多くの遺伝子発現を調節し、細胞増殖を促進していることが示された。さらに最近、大腸菌の生存率維持に必要な蛋白質をコードする 6 種のポリアミンモジュロンを同定した。

大腸菌のポリアミンモジュロンのコードする mRNA は、翻訳効率の悪い特徴を有し、その特徴は大きく 3 つに分類される。

1. 翻訳開始に重要な Shine-Dalgarno（SD）配列と開始コドンが離れている場合
2. 開始コドンが AUG ではなく、GUG や UUG である場合
3. mRNA の翻訳領域に終止コドンが存在する場合

このような翻訳効率の悪い mRNA のポリアミンによる蛋白質合成促進メカニズムを解析した結果、ストレスに関与するポリアミンモジュロンをコードする mRNA 中の特定構造（二本鎖を形成しない bulged-out 構造や stem and loop 構造）にポリアミンが結合し、特異的な構造変化を引き起こすことにより、翻訳レベルでの発現を上昇させることが明らかとなった。

本発表では、酸化ストレス下におけるポリアミンモジュロンの生理的意義及びポリアミンと RNA との相互作用に基づく遺伝子発現制御機構を中心に概説する。

polyamine, RNA, polyamine modulon

講演番号：4SY11-3
講演日時、会場：3 月 29 日 14:35～ A 校舎 37 会場

腸内細菌のポリアミン代謝・輸送系同定の重要性

Significance of identification of polyamine metabolic and transport system in intestinal bacteria.

○栗原 新[1]、松本 光晴[2]、鈴木 秀之[3] ([1]石川県大・腸内細菌、[2]協同乳業・技術開発、[3]京都工繊大・工芸)

○Shin Kurihara[1], Mitsuharu Matsumoto[2], Hideyuki Suzuki[3] ([1]Ishikawa Prefectural Univ., [2]Kyodo Milk, [3]Kyoto Institute of Technology)

ポリアミン (PA) はほぼ全ての生物がその細胞内に持ち、細胞増殖促進作用を始めとした様々な重要な役割を果たす生理活性アミンである。PA の主要なものには、プトレッシン (Put)、スペルミジン (Spd)、スペルミン (Spm) がある。2009 年以降、PA 摂取がいくつかの動物の健康寿命伸長に著効を示すことが世界中の研究者から報告されている (表 1)。動物は PA を自ら合成するが、細胞内の PA 濃度は加齢とともに減少する。このため、動物は摂取した食物中に含まれる PA を小腸を通じて積極的に吸収する。一方で、消化管において小腸の下流にある大腸の内腔にも数百 μM という多量の PA が存在し、これは腸内細菌叢由来であることが報告されている。したがって、腸管内で腸内細菌叢に PA を効率よく生産させることが出来れば、加齢による体内 PA 減少を補うことで、ヒトの健康寿命を伸長させる効果があると考えられる。

表 1　PA による健康増進ならびに健康寿命伸長

報告年	効果	対象	メカニズム	PA 源	文献
2009	寿命伸長	マウス	炎症抑制	経口摂取	***Exp. Gerontol.***44:727-32.
2009	寿命伸長	マウス、ハエなど	オートファジー誘導	経口摂取	***Nat. Cell Biol.*** 11:1305-14.
2011	寿命伸長	マウス	炎症抑制	腸内細菌	***PLoS One*** e23652.
2013	記憶力増強	ハエ	オートファジー誘導	経口摂取	***Nat. Neurosci.***16:1453-60.
2014	寿命伸長および認知力向上	マウス	炎症抑制	腸内細菌	***Sci. Rep.*** 4:4548.

ヒトが大腸から吸収できる PA は、大腸腸管内腔において腸内細菌の細胞外に存在するものである。したがってその濃度は、腸内細菌による PA 合成・放出と、PA 分解・吸収の平衡の結果であると考えられる。腸管内腔の PA 濃度を最適化するには、腸内細菌の PA 代謝（合成・分解）系ならびに PA 輸送（吸収・放出）系を同定し、その発現調節機構を解析することが有効である。

我々はこれまでに、腸内細菌の一種である大腸菌の新規 PA 分解系遺伝子 6 種および吸収系 2 種、これらの発現を制御する遺伝子 1 種を新規に同定し、新規 PA 放出系遺伝子についても解析を進めている。細菌の遺伝子機能の推定には、ほとんどの場合、大腸菌での研究結果をもとにした相同性解析が用いられるため、大腸菌の遺伝子機能を新規に同定することは重要である。しかし、大腸菌は腸内細菌の中では 0.01%にも満たない非常にマイナーな種であるため、腸内細菌優占種の PA 代謝・輸送系遺伝子を同定することも同様に重要である。この腸内細菌優占種の大半を占めるのは *Bacteroidetes* 門と *Firmicutes* 門の細菌であるが、*Bacteroidetes* 門細菌は大腸菌型の PA 合成系ホモログを持たず、独自の PA 合成系を持つことが予想されている。また、PA 輸送系については *Bacteroidetes* 門、*Firmicutes* 門双方でこれまでに同定されていない。さらに、プロバイオティクスとして重要なビフィズス菌では、PA 代謝系ホモログは全く見出されない。我々は、腸内細菌優占種上位 56 種 (***Nature*** 4:59-65 (2010)) のうち入手可能な 42 種およびビフィズス菌 9 種について、培養上清への PA 蓄積量および培養上清からの PA 吸収量を測定した。この結果を手掛かりとして腸内細菌の新規 PA 代謝・輸送系を同定していく予定である。

腸内細菌叢はヒト一人あたり 200 種類程度の複雑な混合培養系であるため、細菌間の共生関係は腸内細菌叢の PA 生産を理解する上で重要な要素である。我々は遺伝子操作が容易な腸内細菌 2 種（大腸菌および *Enterococcus faecalis*）の混合培養により培養上清への Put 放出量が飛躍的に増加することを見出し、この Put 高生産現象に必要な遺伝子群を同定した。

以上の結果は、混合培養系を用いた有用物質生産機構および腸内細菌の有効代謝産物に着目した研究に対して、新たな知見を与えると考えられる。

polyamine, intestinal bacteria, enzyme and transporter

講演番号：4SY11-4
講演日時、会場：3 月 29 日 15:05～ A 校舎 37 会場

ポリアミンによる哺乳類の寿命延長効果

Polyamine-induced life span extension of mammals

○早田 邦康（自治医大さいたま医療センター）
○Kuniyasu Soda (Saitama Medical Center, Jichi Medical Univ.)

日本食や地中海食とよばれる食習慣や、全粒粉、豆類、野菜、魚介類などの食品は生活習慣病予防や老化抑制に寄与していると考えられている。しかし、これらの食品に含まれるどのような成分が健康長寿に寄与するかは不明であった。ポリアミン（スペルミン、スペルミジン）はすべての生物の細胞に存在し、アルギニンから合成される物質である。よって、生物やその関連する物質から成り立つ食物にはポリアミンが含まれる。しかし、食品に含まれるポリアミンの量は食品の種類で大きく異なっており、健康長寿と関連のある食品は一般的にポリアミン濃度が高い。我々は、ポリアミンが炎症性サイトカインの産生を抑制し、免疫細胞の活性化において必須のタンパクである細胞膜分化抗原の一種の lymphocyte function associated antigen 1 (LFA-1)を減少させることを報告した。そして、マウス(Jc1:ICR)を高ポリアミン餌で飼育すると、老化が抑制され寿命が延長し、これらのマウスでは加齢とともに進行する遺伝子の異常メチル化が抑制されていることを見出した。ポリアミンと遺伝子のメチル化に密接な関係がある。すなわち、メチル基のドナーである S-adenosylmethionine (SAM)は SAM decarboxylase (SAMDC)によって Decarboxylated SAM(dcSAM)へ変換され、decSAM はスペルミジン/スペルミン合成酵素の作用でポリアミンが合成される際にプロピルアミンを供給する。dcSAM はメチル化酵素である DNA methyltransferase (Dnmt)の活性を抑制するが、ポリアミン合成酵素の活性が低下すると、dcSAM は増加し、Dnmt 活性は低下する。反対にポリアミンを細胞外から供給すると、ネガティブフィードバックにより SAMDC の活性が抑制され、dcSAM が減少し、Dnmt の活性は亢進する。Jurkat 細胞を用いて検討したところ、ポリアミン合成を阻害した細胞では、Dnmt の活性が低下し、遺伝子の異常メチル化が生じ、LFA-1 のプロモーター領域の脱メチル化が進行し、LFA-1 が増加した。この細胞にポリアミンを加えると、Dnmt の活性は増強し、遺伝子の異常メチル化は改善され、LFA-1 のプロモーター領域はメチル化され、LFA-1 が減少した。異常メチル化は加齢とともに進行し、癌を含めた生活習慣病や老化の原因と考えられている。そこで、1,2-demethylhydrazine administrationDMH (DMH) を BALB/c マウス（オス）に投与して、大腸癌の発生を検討したところ、高ポリアミン餌を食べたマウスでは癌の発生が著明に抑制された。加齢はポリアミン合成低下、Dnmt 活性低下、LFA-1 の増加を含めた pro-inflammatory status の増強、遺伝子の異常メチル化を伴う。ポリアミンの増加は、これらの変化を改善するように作用することから、健康長寿に寄与している食成分はポリアミンであると考えられる。

Polyamine, Life span extension, Age-associated diseases

講演番号：4SY11-5
講演日時、会場：3 月 29 日 15:35～ A 校舎 37 会場

ポリアミンを含むダイズ胚芽抽出物の開発とスキンケアへの展開

Development of polyamine-containing soybean germ extract and its application to skincare cosmetics

○春日部 芳久（東洋紡株式会社）
○Yoshihisa Kasukabe (Toyobo Co., Ltd.)

プトレシン、スペルミジン、スペルミンなどのポリアミンは、ヒトを含むあらゆる生物に遍在し、生物の生長や発育に重要な役割を果たしている機能性物質である。近年ではポリアミンとヒトの健康との関係に関心が集っており、機能性食品成分としても注目されている。ポリアミンには各種の環境ストレスに対する植物の耐性を高める機能があることが知られている。我々は、クロダネカボチャ（*Cucurbita ficifolia*）由来のスペルミジン合成酵素遺伝子（*FSPD1*）を過剰発現してスペルミジン含量が野生種の約 2 倍に高まったシロイヌナズナにおいて、冷温、凍結、高塩、高浸透圧、乾燥、酸化などの種々のストレスに対する耐性が顕著に増大することを認め、スペルミジンはストレスシグナル分子として機能していることを示唆した（*Plant Cell Physiol.*, 45(6), 712-722, 2004）。特に、冷温、高塩により引き起こされる酸化ストレス条件下では、スペルミジンは抗酸化酵素（SOD）の遺伝子発現を誘導するとともに、各種抗酸化酵素の活性を高めることを明らかにしている（論文投稿中）。

ヒトの組織では、ポリアミンは特に皮膚（表皮組織）に多く含まれている。皮膚は光（紫外線）を受けることで酸化ストレス傷害を被る危険性に常に曝されている。我々は、ポリアミンによる抗酸化酵素の活性化はスキンケアにおいても重要であると考え、さらに、生体内のポリアミン濃度は老化につれて減少していくことから、スキンケアにおけるポリアミン皮膚塗布の有用性が期待できると考えた。

ヒト皮膚の線維芽細胞に、プトレシン、スペルミジン、およびスペルミンを添加して細胞賦活化作用を評価したところ、いずれのポリアミンにも線維芽細胞の賦活化作用が認められた。次に、各種の植物材料のポリアミン含量を調べた結果、特にダイズ胚芽とコムギ胚芽にポリアミンが高濃度に含まれていた。そこで、ダイズ胚芽抽出物を調製し、皮膚の線維芽細胞を用いて細胞賦活化作用とコラーゲン産生促進作用を評価したところ、高い細胞賦活化作用とコラーゲン産生促進作用が認められた。また、ダイズ胚芽抽出物水溶液を目尻のシワに6週間塗布したところ、対照品に比べてシワグレードが低下する傾向が認められた。これらのことから、ポリアミンを含むダイズ胚芽抽出物は、エージングケアのスキンケア素材として有用であることが示唆された。

polyamine, soybean, skincare

講演番号：4SY11-6
講演日時、会場：3 月 29 日 16:05～ A 校舎 37 会場

腸内常在菌が産生するポリアミンの健康寿命伸長効果

Polyamines produced by intestinal microbiota delays senescence

○松本 光晴（協同乳業研究所）
○Mitsuharu Matsumoto (Kyodo Milk Industry Co. Ltd)

腸内常在菌の産生する低分子代謝産物を利用した健康増進へのアプローチを行っている研究は少ない。腸内常在菌の代謝産物の多くは、腸管上皮細胞から吸収され、さらに血中に移行すれば全身の細胞へ影響する可能性が考えられるため、極めて重要な腸内環境ファクターの 1 つと考えられる。我々は同腹の無菌マウスと通常菌叢定着マウスの結腸便の水溶性画分を CE-TOFMS メタボロミクス解析し、約 120 成分が腸内常在菌の影響を受けていることを明らかにしてきた[1]。

その中でも、演者らは、非常に多岐に渡る機能を有し、全生物種（原核生物～哺乳類および高等植物）の細胞内に普遍的に存在する生理活性物質ポリアミンに注目している。ポリアミン（putrescine、spermidine、spermine）は RNA と結合して存在し、様々なストレスから保護し、細胞増殖や分化に重要な役割を果たしている。また、加齢と共に産生能が減弱化し、老年病の原因とされる炎症の抑制を誘導し、腸管バリア機能の成熟・維持作用やオートファジー促進作用も報告されている。そこで、大腸内ポリアミン濃度を適正化すれば、上述した生理効果が得られ、疾病予防の軽減に繋がり寿命伸長効果を得られると仮説を立案し検証してきた。これまでに、ヒト投与試験にて *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* LKM512 菌株投与で腸管内ポリアミン濃度の上昇を認め、抗炎症効果や抗変異原効果等を報告してきた[2,3]。また、10 ヶ月齢マウスに約 1 年間 LKM512 を投与し、腸内ポリアミン濃度の上昇と共に寿命伸長効果が得られた[4]。更に個体差の大きい腸内常在菌に安定的にポリアミン産生を誘導させる物質としてアルギニンを見出し、14 ヶ月齢よりマウスにアルギニンと LKM512 の混合投与を行い、寿命伸長効果と共に 20 ヶ月齢時点での空間認識記憶力の成績が対照群と比較し高いことを見出した[5]。本シンポジウムでは、我々以外のグループが報告しているポリアミンの健康寿命に関わる報告も併せて紹介する。

1. Matsumoto M, et al. *Sci Rep* 2: 233, 2012.
2. Matsumoto M, et al. *FEMS Immunol Med Microbiol* 31: 181-186, 2001.
3. Matsumoto M and Benno Y. *Mutat Res* 568: 147-153, 2004.
4. Matsumoto M, et al. *PLoS ONE* 6: e23652, 2011.
5. Kibe R. et al. *Sci Rep* 4: 4548, 2014.

polyamine, antiaging, intestinal microbiota

講演番号：4SY12-1
講演日時、会場：3 月 29 日 13:35～ B 校舎 33 会場

酢酸菌の耐熱性育種および Omics 解析から見えてくる耐熱性関連遺伝子群

Thermotolerant-related genes nominated by Omics of Acetic acid bacteria.

○東 慶直（近畿大学生物理工学部）
○Yoshinao Azuma (Kindai Univ.)

すべての生物は増殖が可能な温度域を持つ。特に単細胞生物はその栄養環境に依存したかなり厳密な増殖可能温度域内でのみ増殖が可能である。その増殖が可能な上限温度は、熱で失活しやすいタンパク質や代謝酵素、シャペロンなどの修復系タンパク質など複数の遺伝子の発現量もしくは機能するタンパク質の存在量によって決定されると想像される。しかし、実際に増殖限界温度の決定にどの遺伝子が重要であるか、またそれらの遺伝子がどのように寄与するかはほとんど分かっていない。われわれは、まず食酢醸造に使用される酢酸菌 *Acetobacter pasteurianus* を用いて、その増殖限界温度が 39 度から 42 度に耐熱化した育種株を樹立した。そのゲノム DNA 配列解析を実施した上で、比較プロテオーム解析とトランスクリプトームの解析に基づき、増殖限界温度のシフトと関連する遺伝子の同定を行った。親株（増殖限界温度 39 度）と耐熱化育種株（同 42 度）を増殖適温（30 度）で培養し、タンパク質の蓄積を比較した。プロテオームの差違は予想以上に大きく、耐熱化育種株では多くの酸化還元酵素の蓄積が確認された。また、トランスクリプトーム解析として、親株を 30 度と 37 度、耐熱化育種株を 30 度から 42 度の間で培養し、初期対数増殖期の細胞から全 RNA を抽出し、RNA-seq 解析を実施した。この解析では耐熱化育種株もしくは高温環境下で高い発現を示す遺伝子として、高発現遺伝子としては熱ショック遺伝子群が、低発現遺伝子では転写因子が多く抽出された。中程度発現遺伝子では、プロテオーム解析の際に観察された酸化還元酵素群も抽出された。この酸化還元酵素の遺伝子を別の酢酸菌に導入したところ、一部の遺伝子はその酢酸菌の増殖限界温度を 2 度上昇させた。この結果は酸化還元酵素による活性酸素種の消去が耐熱性と関係することを示すものである。一方、高濃度のグルコースに耐性を示す別の酢酸菌 *Tanticharoenia sakaeratensis* は、高濃度グルコース環境下では解糖系や TCA サイクルなどのエネルギー合成に関与する遺伝子の発現を抑制していた。また、活性酸素種の除去に関与するとされる呼吸鎖の複合体 IV の発現が上昇し、逆に活性酸素種を生成するとされる複合体Ⅰの発現が抑制されており、高濃度グルコース環境下では活性酸素種による機能障害が増殖阻害に繋がると想像できる。ところで、活性酸素種の生成が減少する高濃度グルコース環境下ではこの酢酸菌の増殖限界温度の上昇が期待され、実際に増殖限界温度が４度上昇することが確かめられた。これら酢酸菌では、高濃度グルコース環境も高温環境も（最終的に）活性酸素ストレスとして細胞の増殖を抑制していると考えられる。本シンポジウムでは、これらの耐熱性関連遺伝子群について、詳細なデータを紹介し、ご議論頂きたい。

Acetobacter pasteurianus, thermotolerant adaptation, reactive oxygen species (ROS)

講演番号：4SY12-2
講演日時、会場：3 月 29 日 14:00～ B 校舎 33 会場

耐熱性 *Zymomonas mobilis* の耐熱性および耐熱化

Analyses of thermotolerance and acquisition of thermotolerance mechanisms in thermotolerant *Zymomonas mobilis*

○高坂 智之[1]、櫻田 朋子[2]、白丸 優貴[1]、吉田 咲紀[2]、山下 舞子[2]、中島 康之[2]、松谷 峰之介[1]、村田 正之[2]、山田 守[1,2]（[1]山口大農、[2]山口大院医学系）

○Tomoyuki Kosaka[1], Tomoko Sakurada[2], Yuki Shiromaru[1], Saki Yoshida[2], Maiko Yamashita[2], Yasuyuki Nakajima[2], Minenosuke Matsutani[1], Masayuki Murata[2], Mamoru Yamada[1,2] ([1]Faculty of Agriculture, Yamaguchi Univ., [2]Graduate School of Medicine, Yamaguchi Univ.)

一般的に 30℃前後で行われる発酵を 40℃以上で実施する高温発酵は、冷却コストの削減、雑菌混入の抑制、発酵速度の向上といった利点から、近年研究が盛んに行われ始めている。高温発酵の実現には、高温で生育が可能な耐熱性微生物の利用もしくは開発が必須である。我々は、比較的代謝経路が単純でゲノムサイズの小さいエタノール生産性の通性嫌気性細菌 *Z. mobilis* のうち、耐熱性を示す株を用いて、耐熱性がどのような遺伝子により達成されているか、そして耐熱化にはどのようなメカニズムが必要かを研究してきており、その成果を本講演では報告する。

まず、*Z. mobilis* TISTR 548（ATCC 29191 由来）において、トランスポゾンをランダムにゲノムへ導入し、テトラサイクリン耐性により取得した変異株が生育限界温度下において生育できなくなることを利用して、30 の耐熱性遺伝子を決定した。これらの遺伝子の機能を分類したところ、エネルギー代謝、膜の安定化、DNA 修復、tRNA 修飾、シャペロン・プロテアーゼ、翻訳と翻訳調整、細胞分裂、転写調節といった機能が耐熱性に関連することが示唆された。さらに、膜の安定化に関する遺伝子の幾つかはエタノール耐性と関わりがあることが明らかとなった。これらの結果は、我々が大腸菌を対象に実施した結果と類似しており、微生物における耐熱性遺伝子の機能的普遍性が示唆された。

一方、*Z. mobilis* の耐熱化はいくつかの方法を試みている。これまで、生育限界温度での適応育種、薬剤耐性株の取得、そして抗酸化活性に関与する遺伝子の発現による耐熱化に成功している。本講演では適応育種により獲得した耐熱化株の解析について報告する。我々は、２つの異なる *Z. mobilis* CP4 と TISTR 548 とをそれぞれの生育限界温度である 37℃および 38℃付近で植継ぎを繰り返すことで、耐熱化した株をそれぞれ取得した。この方法での耐熱化では生育限界温度は２℃上昇した。それぞれの耐熱化株の生理学的な解析を行ったところ、高温における細胞伸長の抑制および細胞内 ROS 発生量の抑制が確認された。一方、全ゲノム解析による変異遺伝子の解析を行ったところ、シグナル伝達機構、トランスポーター、膜の安定化、そして DNA 修復に関係する遺伝子に変異が確認された。これらの結果から、耐熱性に関与する遺伝子の機能と耐熱化に関わる遺伝子の機能にはある程度類似性が見られることが示された。

なお本研究は JST の ALCA プロジェクトの一環として行われた研究の一部である。

thermotolerance, *Zymomonas mobilis*, adaptive evolution

講演番号：4SY12-3
講演日時、会場：3 月 29 日 14:25～ B 校舎 33 会場

Genome and transcriptome analyses of ethanologenic thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* DMKU 3-1042

○Noppon Lertwattanasakul[1], Tomoyuki Kosaka[2], Akira Hosoyama[3], Yutaka Suzuki[4], Nadchanok Rodrussamee[5], Minenosuke Matsutani[2], Masayuki Murata[6], Naoko Fujimoto[6], Suprayogi[6], Keiko Tsuchikane[3], Savitree Limtong[1], Nobuyuki Fujita[3], Mamoru Yamada[2,6] ([1]Kasetsart Univ., [2]Yamaguchi Univ., [3]NITE, [4]Tokyo Univ., [5]Chiang Mai Univ., [6]Yamaguchi Univ. Grad. Sch. of Med.)

The development of sustainable and renewable biofuels has attracted growing interests with concerns on increase oil demands and cleaner environment worldwide. To overcome the general problem of corn- and sugar-based biomass, non-food biomass such as lignocellulose has been concerned as alternative biomass for production of bioethanol. The economy of fermentation-based bioprocess including bioethanol production relies extensively on the performance of fermentative microbes.

The thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* has been adopted by a lot of industries for a broad range of applications from biomass production to bioremediation due to advantages of its traits such as rapid growth, thermotolerance, efficient enzyme production and ability of ethanol production from various sugars including xylose. A particularly attractive application of this yeast is high-temperature fermentation and bioconversion of hemicellulose.

In order to acquire the key information for its genetic manipulation and further application, we determined the complete genome sequence of *K. marxianus* DMKU 3-1042 and analyzed the alteration of gene expression under high temperature and xylose cultivation conditions. The sequence is composed of eight chromosomes, totaling 11.0 Mb. The transcriptome analysis reveals that the yeast copes with high temperatures by reducing central metabolic activities and reinforcing the synthesis and degradation of proteins and DNA repair. Heat shock proteins and chaperones are crucial for survival at elevated temperatures. For growth in xylose, metabolic pathways including those in mitochondria and peroxisome are largely changed, which seems to be a strategy for the cells to deal with energy shortage and/or redox imbalance. Taken together, our study reveals that *K. marxianus* bears distinctive and ingenious strategies for survival under different culture conditions.

Kluyveromyces marxianus, complete genome sequence, transcriptome analysis

講演番号：4SY12-4
講演日時、会場：3 月 29 日 14:50～ B 校舎 33 会場

酵母 *Kluyveromyces marxianus* はなぜ高温を好むのか

Why does the yeast *Kluyveromyces marxianus* prefere high temperature for growth?

○星田 尚司 (山口大医系)
○Hisashi Hoshida (Yamaguchi Univ.)

酵母 *Kluyveromyces marxianus* は 45～49℃の高温でも増殖できるのに対して、発酵生産や研究用モデル生物として最も利用されている酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は 40℃でもほとんど増殖できない。増殖限界温度が高いことから *K. marxianus* は耐熱性酵母と呼ばれるが、*K. marxianus* の発酵や増殖が 40℃で最も良いことと *S. cerevisiae* が 30℃程度で増殖が良いことを比較すると、*K. marxianus* は高温を好んでいるともいえる。ヒートショックタンパク質をはじめとして、生物に共通の一過的な熱ストレスに対抗する機構は詳しく調べられているが、高温を好む *K. marxianus* にとっての耐熱性はそれとは異なると考えられる。その点で、高温を好む性質という意味での耐熱性を明らかにするための材料として *K. marxianus* は大変興味深い。ささに、微生物の耐熱性は実用的発酵生産でのコスト削減や安定した発酵生産系の構築に大きく貢献すると期待されている。*K. marxianus* の耐熱性を理解できれば、既存の耐熱性微生物の利用に限らず、遺伝子工学的改良あるいは培養環境を整えることで、高温発酵の適用範囲の拡大につなげることも可能と思われる。

K. marxianus の耐熱性機構を明らかにするために、次世代シークエンサーを用いたドラフトゲノム解析と発現解析を行った。それらの結果の一例を挙げると、*K. marxianus* を異なる温度条件で培養したとき、また、耐熱性の異なる *K. marxianus* の発現比較において、いくつかの活性酸素消去系遺伝子の発現量に違いが見られた。一方、これらの網羅的解析データから浮かび上がった遺伝子や耐熱性機構の検証には遺伝子工学的解析手法は欠かせない。*K. marxianus* では二本鎖 DNA 切断を修復する機構のひとつである非相同末端結合の活性が強く、これを利用した DNA クローニング法、過剰発現系を独自に構築している。活性酸素消去系遺伝子を *K. marxianus* で過剰発現させると耐熱性が強化された。これは、耐熱性酵母において高温条件化で活性酸素が細胞に損傷を与えていることを示唆している。

本講演では網羅的解析結果を出発に、独自に開発した *K. marxianus* の組換え系を活用した耐熱性遺伝子の解析について紹介する。

Thermotolerance, *Kluyveromyces marxianus*, Next-generation sequencing

講演番号：4SY12-5
講演日時、会場：3 月 29 日 15:15～ B 校舎 33 会場

高温、強酸性温泉からの極限環境紅藻の新規単離と有用形質の探索

Indetification and characterization of beneficial red algal strains from acidic hot springs

○兼崎 友[1]、重信 直人[2]、小田 しおり[2]、齋藤 夏帆[2]、宮澤 和己[2]、渡辺 智[2]、吉川 博文[1,2] ([1]東京農大・NGRC、[2]東京農大・応生科・バイオ)
○Yu Kanesaki[1], Naoto Shigenobu[2], Shiori Oda[2], Kaho Saitou[2], Kazuki Miyazawa[2], Satoru Watanabe[2], Hirofumi Yoshikawa[1,2] ([1]NGRC, Tokyo Univ. Agric., [2]Dept. Biosci., Tokyo Univ. Agric)

藻類を用いたバイオマス物質生産を考える上で、より高温での培養が可能な藻類をベースとすれば、培養時に他の藻類が混入するリスクを低減させることが可能と考えられる。 例えば、高温、強酸性の環境中に棲息する単細胞紅藻イデユコゴメ綱の *Cyanidioschyzon*、*Cyanidium*、*Galdieria* の３属などは有望な候補である。 *Cyanidioschyzon*、*Cyanidium* は完全光独立栄養性であり、*Galdieria* はグルコースを始めとする外来糖を資化する従属栄養増殖が可能など、３属間の性質の違いも興味深いが、今のところ分子生物学的な研究基盤が整備されているのは *Cyanidioschyzon* のみである。 加えて、イデユコゴメ綱の棲息環境は *Sulfolobus* などの古細菌などの棲息環境と重なることが多く、これらの単細胞紅藻類の中で純化されている株は極めて少ない。 また有用形質を持った株の選抜や高温耐性機構の解明も進んでいない。

そこで、我々は神奈川県箱根町大涌谷から *Cyanidium*、*Galdieria* の新規株・有用形質株を単離・純化し、各種金属イオン耐性、生育限界 pH、増殖速度等について試験をおこない、遺伝子資源としての有用性を評価した。 様々な単離条件を検討した結果、いくつかの株が単離できた。 新規単離された株のうちの２株は系統解析の結果、*Cyanidium* sp. N3110、*Galdieria sulphuraria* SG と名付けた。その後、*Cyanidioschyzon* の培養に用いられる条件・培地を基準として、それぞれの株の生物学特性を３属間で比較した。

Cyanidium sp. N3110 株は、特に Mn2+に対して高い耐性を示したことから、Mn2+添加/非添加の条件で比較トランスクリプトーム解析を実施し、Mn 耐性に関わる候補遺伝子を探索した。 結果、金属イオンの輸送に関与する複数の遺伝子が発現誘導されることが分かった。 また高温処理条件でのトランスクリプトーム解析もおこない、高温耐性への関与が期待される遺伝子群の情報を得た。

Galdieria sulphuraria SG 株は、強酸 pH から中性 pH まで幅広い pH 環境でも生育可能という特徴を有していた。 我々は SG 株が外来糖を資化して増殖できること、及びグルコースの添加により明条件においても細胞が白化し、クロロフィル含量が低下することを確認した。

さらに、これらの株の冷凍保存株の作製についても条件の検討をおこない、数ヶ月以上の冷凍保存が可能な条件を確立した。またこれらの株のゲノム解析も進めており、将来的な極限環境紅藻を用いた応用研究の基盤整備を進めている。

Cyanidiales, heavy metal ions, high temperature

講演番号：4SY12-6
講演日時、会場：3 月 29 日 15:40～ B 校舎 33 会場

ナチュラルバリエーションを利用した植物の高温耐性付与遺伝子の探索
Dissecting the genetic bases of natural variation in heat tolerance of Arabidopsis and *Thellungiella salsuginea*, a close relative of Arabidopsis

○太治 輝昭[1]、有賀 裕剛[1]、Luis Barboza[2]、井内 聖[3]（[1]東京農大バイオ、[2]コスタリカ大、[3]理研 BRC）
○Teruaki Taji[1], Hirotaka Ariga[1], Barboza Luis[2], Satoshi Iuchi[3] ([1]Tokyo Univ. of Agriculture, [2]Univ. of Costa Rica, [3]RIKEN BRC)

高温は作物の生長や収量に大きな影響を及ぼす重大なストレスである。地球規模では、ここ 30 年の温度上昇により、主要穀物である小麦やトウモロコシにおいて 3-5%も収量が減少したと報告されており、今後安定した食糧供給を望む上でも、植物の環境ストレス耐性の解明、耐性植物の作出が植物科学の重要な課題とされている。

これまでに多くの植物生理に関する分子レベルでの知見が、モデル植物の *Arabidopsis thaliana*（シロイヌナズナ）を中心に明らかとなってきた。高温ストレス応答に関しては、耐性に必須の遺伝子群の他、耐性を付与することの出来る遺伝子も明らかとなり、私たちの研究を含め、いくつかの高温耐性植物が作出されている。しかしながら、これらは、特に耐性を示さないモデル植物の耐性メカニズムに関与する遺伝子を導入したものであり、「(弱い）野生型と比較して」というレベルにとどまっているのが現状である。一方、自然界には高温に対して極めて高い耐性を示す植物が存在する。このような実際に高い耐性を示す植物のメカニズムは非常に興味深いものの、これまでに全く明らかとされていない。また、高温耐性については良いモデルとなる耐性植物自体がなかった。

先行研究において、シロイヌナズナ近縁の塩生植物 *Thellungiella salsuginea*（以下 *T. salsuginea*）が、塩ストレス耐性同様、高温ストレスに対しても、植物個体レベルのみならず、細胞レベルでも非常に高い耐性を示すことを明らかにした (Higashi *et al*., 2013 *Molecular Plant*)。*T. salsuginea* は 2012 年にゲノムシークエンスが公開された他、私たちの先行研究において *T. salsuginea* の様々な組織、あるいは様々なストレス処理した植物由来の完全長 cDNA ライブラリーが作製されている（Taji *et al.*, 2008, 2010 *BMC Plant Biology*）。本発表では、この完全長 cDNA を用いた機能獲得型変異株スクリーニング、Full-length cDNA Overexpressor mutant hunting (FOX hunting)より得られた成果について紹介する。

また、シロイヌナズナは世界中に 1,000 種を超える accessions（エコタイプ）が存在し、近年、ストレス耐性にも大きなバリエーションが観察されることが報告されている。シロイヌナズナ 170 accessions を用いて高温耐性を評価したところ、高温耐性にも大きなバリエーションが見られた。現在、このシロイヌナズナ accessions 間に存在する高温耐性の違いを明らかにするため、高温感受性 accession と高温耐性 accession を用いた QTL 解析を行っている。本発表では、この QTL 解析についても紹介する。

heat tolerance, natural variation, Arabidopsis accession

講演番号：4SY12-7
講演日時、会場：3 月 29 日 16:05～ B 校舎 33 会場

実験室高温適応進化した大腸菌からみた高温適応戦略

Thermo-adaptive evolution mechanism of *E.coli*

○岸本 利彦[1]、四方 哲也[2,3] ([1]東邦大理、[2]大阪大院情報科学, 生命機能、[3]ERATO JST)
○Toshihiko Kishimoto[1], Tetsuya Yomo[2,3] ([1]TOHO Univ., [2]Osaka Univ., [3]ERATO JST)

細胞の外界環境への適応進化のメカニズムを解明するため、大腸菌を用いた実験室進化系を構築し通常の大腸菌の致死温度への適応進化を行った。これまでに、46.6℃までの高温適応進化に成功し、46.0℃適応進化大腸菌までのゲノム解析を完了した。これまでの解析でいくつかの興味深い現象を見いだした。

1. 44.8℃適応進化 108 日目以降で遺伝子修復系遺伝子 mutH に変異が固定され、高変異率進化が生じた。mutH 変異固定までは、非同義置換が優先的に固定する positive selection が主として生じ、mutH 変異固定後は中立変異である同義置換が多数ヒッチハイクにより固定され、中立進化状態となった。このことは、選択環境下で高変異率進化において系の多様性を生み出すことで適応進化する戦略が存在することが示唆された。
2. 一般に生じる変異の大部分は中立もしくはネガティブが多いと考えられており、選択的環境下ではまれに生じるポジティブ変異が選択固定されていると考えられている。実際 mutH 変異を導入・削除すると細胞の適応度が変化し、mutH 変異による変異率上昇は有害効果を持つことを確認した。44.8℃適応進化では、mutH 変異の前にシャペロニン GroEL をコードする groL 遺伝子のプロモーターと ORF に変異が固定されていた。高変異率進化で 58 変異を固定した 44.8℃適応大腸菌から groL 変異を野生型に戻すと、高変異率下で固定された 58 変異は有害となった。このことは、groL 変異により有害変異が有益変異と変換される有害変異緩衝効果が現れたと示唆された。groL 野生型 mutH 変異型細胞が 44.8℃で適応できなかったことから、高変異率進化を可能とするにはシャペロニンの機能変化が重要であると考えられた。
3. 44.8℃適応進化初期には、大腸菌濃度依存的な増殖が確認され、培養上澄みに増殖誘導成分が含まれることが判明した。この濃度依存的増殖は、44.8℃適応進化において groL 変異固定に伴い依存性が解消傾向となることが確認された。

高温環境でヒートショック遺伝子として機能する groL 遺伝子は、実際の実験高温適応進化で多面的な機能を発揮し進化を促進している可能性が示された。

Experimental evolution, *E.coli*

講演番号：4SY13-1
講演日時、会場：3 月 29 日 13:35～ B 校舎 41 会場

ネオニコチノイド研究によって明らかとなったニコチン性アセチルコリン受容体のアゴニスト認識機構

Molecular mechanisms of the agonist recognition of nicotinic acetylcholine receptor

○伊原 誠（近畿大農）
○Makoto Ihara (Kinki Univ.)

ニコチン性アセチルコリン受容体(nAChR)は，脊椎動物・無脊椎動物においてアセチルコリンによる神経伝達を担う最も普遍的なリガンド開口イオンチャネルの一つである．nAChR は，$GABA_A$ 受容体やグリシン受容体と同じリガンド開口イオンチャネルの Cys-loop スーパーファミリーに属すイオンチャネル（Cys-loop 型リガンド開口イオンチャネル）であり，ヘテロもしくはホモ 5 量体として機能する膜タンパク質である．近年，農業害虫の防除や動物薬として広く用いられているネオニコチノイドは，動物に普遍的に存在する nAChR を標的にするにもかかわらず，無脊椎動物の nAChR に対して選択的に高い相互作用を示す．ネオニコチノイドの高い選択的昆虫毒性は，昆虫の nAChR に対する選択的相互作用に依存することが知られているが，昆虫の nAChR は未だに謎に包まれている面も多いことから，どのような機構によって脊椎動物・無脊椎動物の nAChR は異なったネオニコチノイドの認識パターンを示すのかは不明であった．

そこで，我々はホモ 5 量体を機能単位とする脊椎動物の α7 nAChR と，そのアゴニスト結合領域と高い構造類似性を持つ軟体動物由来アセチルコリン結合タンパク質(AChBP)をモデルタンパク質に用いて，電気生理学的手法と X 線結晶構造解析法，分子モデリング法やバイオインフォマティクスを駆使して，ネオニコチノイドの選択毒性に関わる昆虫 nAChR の構造因子を解析し，これまで未知であった昆虫 nAChR に特有の構造因子を明らかにした．

この研究成果は，Cys-loop 型リガンド開口イオンチャネルの作動原理の理解に貢献するだけでなく，新奇生物制御剤の開発や，現在注目を集めているネオニコチノイドの環境毒性解明，生物制御剤耐性昆虫発生の予測などの応用にも貢献する．

nicotinic acetylcholine receptor (nAChR), neonicotinoid, acetylcholine binding protein (AChBP)

講演番号：4SY13-2
講演日時、会場：3 月 29 日 13:50～ B 校舎 41 会場

気孔孔辺細胞におけるアブシジン酸シグナル伝達機構の解明

Abscisic acid signal transduction in stomatal guard cells

○宗正 晋太郎（岡山大院・環境生命）
○Shintaro Munemasa (Okayama Univ)

主として植物の葉の表皮に存在する気孔は、一対の孔辺細胞と呼ばれる細胞から形成された小孔であり、ガス効果や蒸散による水分放出の制御を行う。乾燥ストレス下で合成される植物ホルモンであるアブシジン酸（ABA）は、気孔閉口を誘導し、蒸散による水分損失を抑制する働きを持つ。孔辺細胞における ABA シグナル伝達には、カルシウムイオンがセカンドメッセンジャーとして機能することが 20 年以上前から明らかとなっている。

ABA 受容体タンパク質である PYR/PYL/RCAR が 2009 年に同定された。ABA は、ABA 受容体タンパク質 PYR/PYL/RCAR によって認識されたのち、いくつかの段階を経て S 型陰イオンチャネルタンパク質 SLAC1 を活性化し、孔辺細胞からの陰イオン放出を誘導する。SLAC1 の活性化には、カルシウム依存性タンパク質リン酸化酵素 CPK とカルシウム非依存性タンパク質リン酸化酵素 OST1 が関与している。近年、アフリカツメガエル卵母細胞を用いた異種発現系により、PYR/PYL/RCAR による ABA の受容から S 型陰イオンチャネル SLAC1 の活性化までの孔辺細胞 ABA シグナル伝達経路の再構築が達成された。しかしながら、孔辺細胞において ABA がカルシウムシグナルを活性化する機構、また活性化したカルシウムシグナルを解読し、SLAC1 活性化へと導く機構は未だ不明である。

我々は、電気生理学的手法と生化学的手法を駆使し、カルシウムイオンによる ABA シグナル伝達の制御機構の一端を解明した。我々の研究成果は、孔辺細胞の ABA シグナル伝達機構を明らかにするとともに、これまで不明であった植物における刺激特異的カルシウムシグナル解読機構の理解に貢献する。

Stomata, Guard cell, Abscisic acid

講演番号：4SY13-3
講演日時、会場：3 月 29 日 14:20～ B 校舎 41 会場

酵母の刺激応答性 TRP チャネルの解析と trp 欠損酵母を用いたイオン輸送体測定系の構築

Evaluation of yeast TRP channel and expression system of organelle localized ion channels using yeast vacuole

○浜本 晋[1]、村西 敏郎[1]、森 泰生[2]、矢部 勇[3]、Carpaneto Armando[4]、魚住 信之[1]([1]東北大院工、[2]京大院工、[3]電機大工、[4]Inst. Biophysics CNR)
○ Shin Hamamoto[1], Toshiro Muranisi[1], Yasuo Mori[2], Isamu Yabe[3], Armando Carpaneto[4], Nobuyuki Uozumi[1] ([1]Tohoku Univ., [2]Kyoto Univ., [3]Tokyo Denki Univ., [4]Inst. Biophysics CNR)

真核生物に広く存在している TRP(transient receptor potential)チャネルは温度、浸透圧、酸化還元等の刺激を感知するチャネルとして生理的に重要な機能を有している。ヒトゲノムには 27 種類の TRP チャネルが保存されている。一方、出芽酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)には 1 つの TRP チャネル、YVC1 のみが存在するため、真核生物の TRP チャネルの分子機能の解析モデルとなっている。YVC1 は液胞膜に局在しており、細胞質の Ca^{2+}、還元剤、高浸透圧ストレスに応答して陽イオンを透過するチャネルである。これまでの電気生理学的解析により、*yvc1* 欠損酵母では内在性電流が大幅に減少することから YVC 1 が酵母液胞膜の主要な陽イオン輸送体であると考えられている。YVC1 の調節機構と生理的役割の解明をめざし、巨大化した酵母液胞膜を用いたパッチクランプ法による機能解析を紹介する。細胞質 Ca^{2+}によって YVC1 は活性化するが、液胞内側への Ca^{2+}添加によって YVC1 のチャネル活性は低下した。また、細胞質と液胞の両側への Ca^{2+}同時添加においてもチャネルは活性化されなかったことから、液胞内の Ca^{2+}によるチャネル機能の抑制は細胞質の Ca^{2+}による活性化よりも優位に働くことが判明した。次に、細胞質に露出する YVC1 の N 末端領域と C 末端領域に存在する 9 つの各 Cys を Ser に置換した変異チャネルを用いて還元剤による YVC1 の活性化機構を検討した。その結果、C 末端領域の Cys を置換した変異チャネルは、細胞質の Ca^{2+}による活性化は維持されたが、還元剤の添加による活性化は消失した。YVC1 の輸送活性は酸化還元に依存して調節されることが示された。

動物・植物のオルガネラ膜には多種多様なイオン輸送体が発現しているためそれらのイオン電流が標的とする輸送体の電流を妨害して機能解析を困難にすることがある。以前に演者らは、*yvc1* 変異株を用いて植物の液胞膜 K^+チャネルの電気生理学的性質を明らかにした。同様の手法を用いて、液胞以外のオルガネラ膜に発現するヒトのリソソームの陽イオンチャネルの解析を試みた。ヒトリソソームの陽イオンチャネルは Na^+選択性の輸送体であり、ホスファチジルイノシトール二リン酸特異的に活性化することが明らかとなった。さらに、植物ゴルジ体の陰イオンチャネルに緑色蛍光タンパク質(GFP)を融合して酵母に発現させたところ、液胞膜の GFP シグナルを検出した。この輸送体のチャネル測定を行ったところ本チャネル由来と考えられる陰イオン電流が検出された。以上のように、酵母を用いた液胞膜のパッチクランプ測定によって，これまで性質が未知のままであった真核生物のオルガネラ膜イオン輸送体の解析が可能となっている。

ion channel, transporter, membrane protein

講演番号：4SY13-4
講演日時、会場：3 月 29 日 14:35～ B 校舎 41 会場

植物によるかおり化合物受容

A mechanism of plants to perceive volatile compounds

○松井 健二（山口大院医）
○Kenji Matsui (Yamaguchi Univ.)

健常状態で生育している植物はあまり匂わないが、罹病したり食害を受けたりした植物からは独特の香気が漂う。植物が自らの受けたストレスに応じて様々なかおり化合物を生成・放散しているためである。こうしたかおり化合物は病原菌や植食者の忌避（直接防衛）や、植食者の天敵の誘引（間接防衛）によって植物の生存戦略の一端を担っている。一方で、植物はかおり化合物の生産者であるだけでなく消費者でもある。植物は気孔を介したガス交換の際に大気中のかおり化合物を否応無しに取り込む。私たちはこうして取り込まれたかおり化合物が植物に受容され、何らかの応答を引き起こしている可能性について検討してきた。

みどりの香りは植物が傷害を受けると放散される。無傷の植物をみどりの香り蒸気に曝すとキチナーゼなどの抵抗性関連遺伝子の発現が誘導され、灰色かび病菌に対する抵抗性が増した。あたかも植物が近隣植物から発せられた「香り」を「匂う」ことで応答しているようだが、同じような植物−植物相互作用は野外環境でも報告されている。しかし、動物の嗅覚受容体に相当する遺伝子は植物にない。また、G タンパク質共役型受容体とリンクするはずの G タンパク質の一部を欠損した植物体でもみどりの香り蒸気処理による抵抗性誘導が認められた。つまり、植物のかおり応答は動物に一般的なかおり受容システムを介した応答ではないように思われる。

無傷植物を(*Z*)-3-ヘキセナール蒸気処理すると、その一部は(*Z*)-3-ヘキセノールへと還元された。また、その一部はグルタチオンとアダクトを形成した。いずれの場合も細胞内の還元力（NADPH とグルタチオン）を消費する代謝である。一方、グルタチオンの酸化還元バランスに関する変異体をヘキセナール処理すると抵抗性誘導が抑制された。こうしたことから、かおり化合物の一部は植物代謝を惹起し、植物組織内の酸化還元状態をシフトさせることで抵抗性反応を活性化していると考えられる。一方、トマトではもう還元しようのない(*Z*)-3-ヘキセノール処理でも植食性昆虫に対する抵抗性が誘起された。このとき、ヘキセノール処理したトマト葉でヘキセノール配糖体（ヘキセニルビシアノシド）が生成・蓄積されていた。この配糖体にはハスモンヨトウ幼虫の生育を抑える活性が認められたため、この実験系では、配糖体化がかおり応答の実体であると考えられた。

こうした結果から、植物は動物で知られている一般的な受容体を介したかおり受容ではなく、環境中のかおり化合物を取り込み、代謝することによる細胞恒常性の変化がかおり受容機構の少なくとも一端を担っていることが示唆される。リガンド代謝による生存戦略という新しい概念である。

green leaf volatiles, glutathione, molecular sense

講演番号：4SY13-5
講演日時、会場：3 月 29 日 14:05～ B 校舎 41 会場

ジャスモン酸類のケミカルバイオロジー
chemical biology of jasmonates
○上田 実、石丸 泰寛、江越 脩佑（東北大院理）
○Minoru Ueda, Yasuhiro Ishimaru, Shusuke Egoshi (Tohoku Univ.)

植物の酸化脂質類（オキシリピン）は、植物における様々な防御応答に重要な役割を果たすケミカルリガンドである。特に、植物ホルモンとして知られるジャスモン酸類は、植物が食草昆虫の幼虫に食害された際に生産されるケミカルシグナルとして知られている。現在では、全てのジャスモン酸類の作用機構は、COI1-JAZ タンパク質複合体型受容体が関与するシグナル伝達機構に依存すると考えられている。一方で、ジャスモン酸類のもつユニークな生物活性の中には、COI1-JAZ シグナル伝達機構で説明できない例も含まれる。本講演では、このような例として、コロナチンによる気孔防御応答打破とジャスモン酸グルコシドによる植物就眠運動について述べる。
植物病原菌と植物の間には「ミクロの闘い」が繰り広げられている。植物病原菌 *Pseudomonas syringae* は、開口した気孔から植物体内に侵入して感染を成立させる。これに対して植物は、防御応答反応として気孔を閉鎖させる。この stomatal defence と呼ばれるユニークな防御応答反応に対して、病原菌はコロナチン（COR）を含むタンパク質のカクテルを植物体内に注入して、気孔を開口させ再び感染成立を狙う。近年、この気孔開口は COR によって誘導されることが明らかになった。我々は、コロナチンの各種誘導体を合成し、野生型シロイヌナズナおよび coi1 変異株を用いる気孔開口試験、酵母ツーハイブリッド法による COI1-JAZ 複合体形成能評価、coi1 応答性遺伝子発現量評価、などの多面的評価系を用いて、コロナチンの気孔開口作用が COI1-JAZ 非依存的であることを示すとともに、アルキンタグを利用した細胞内ラマンイメージングによる検討を行った。
　また、ジャスモン酸グルコシドは、アメリカネムノキの就眠運動を誘導するケミカルリガンドである。JAG は、extensor 運動細胞のみに立体化学特異的に結合し、その収縮を誘導する。また、その作用機構は、COI1-JAZ 非依存的であり、膜局在性の標的タンパク質が関与することも示した。ごく最近、JAG はセカンドメッセンジャーとして活性酸素種の生産を誘導し、extensor 運動細胞のみに発現する「極度遅延型」と名付けたユニークな外向きカリウムチャネル SPORK2 の活性化を引き起こすことが明らかになった。ジャスモン酸類によるイオンチャネル活性制御、COI1-JAZ 非依存的な作用機構ともにこれまで例がなく、本例はジャスモン酸類が関与する未知のシグナル伝達系が存在することを示す極めて興味深い例である。本成果には、リガンドによるセカンドメッセンジャーの生産が、細胞レベル、組織レベルで増幅されて、我々の目に見える生物現象となる様子を見ることができる。

jasmonic acid glucoside, coronatine, chemical biology

講演番号：4SY13-6
講演日時、会場：3 月 29 日 15:20～ B 校舎 41 会場

花成ホルモン受容体の構造と機能

Structure and function of flowering hormone receptor

○児嶋 長次郎（阪大蛋白研）
○Chojiro Kojima (Osaka Univ.)

植物に花を咲かせるホルモン（花成ホルモン・フロリゲン）は，「日長変化の刺激により葉で合成され，維管束を通って茎頂へと運ばれ，花芽形成を誘導するホルモン」として 1930 年代に提唱された。その後，長い間その分子実体は謎であったが，2007 年にシロイヌナズナ FT / イネ Hd3a タンパク質がフロリゲンであることを強く支持する結果が出された。しかし，茎頂へと運ばれた FT / Hd3a タンパク質の細胞内での役割は不明であった。2011 年に我々は，Hd3a とその受容体 14-3-3 と転写因子 OsFD1 からなる複合体の構造と機能を明らかにした。本発表では，フロリゲン活性化複合体の研究を中心にその経緯を紹介し，NMR や X 線結晶構造解析から見えてきたフロリゲン機能の分子基盤について解説する。

シロイヌナズナのフロリゲン FT タンパク質と相互作用する因子として，2005 年にシロイヌナズナ FD が報告された。FD は bZIP 型の転写因子であり，FT と FD の両者の過剰発現により花芽分裂組織決定遺伝子の一つである AP1 遺伝子の発現が誘導される。しかし，フロリゲンがどのようなメカニズムで下流の標的遺伝子の発現を制御しているのかは不明であった。その制御機構を明らかにするために，われわれは酵母ツーハイブリッド法による Hd3a 相互作用因子の探索を行った。その結果，GF14c（イネ 14-3-3），OsFD1（シロイヌナズナ FD のイネホモログ）などが得られた。GF14c を除く相互作用因子の C 末端には，FD-FT 相互作用モチーフ（Thr-Ala-Pro）に類似した SAP モチーフ（Ser-Ala-Pro）が共通して見いだされ，それは Hd3a との相互作用に必須であった。ところが，NMR などを用いた *in vitro* での相互作用実験では，Hd3a と GF14c の間の相互作用は検出されたが，Hd3a と OsFD1 の相互作用は検出できなかった。これらの実験結果と，SAP モチーフと 14-3-3 認識配列（Arg-X-X-Ser-X-Pro）の類似性，さらに GF14c に SAP モチーフがないことから，Hd3a とその相互作用因子は 14-3-3 を介して間接的に相互作用していると考えた。実際，OsFD1 と GF14c は *in vitro* で相互作用し，さらに変異解析により SAP モチーフ内のセリンのリン酸化が両者の相互作用に重要であることがわかった。Hd3a，GF14 および OsFD1 の相互作用の詳細を調べるため，我々はこれら三者からなるタンパク質複合体 の立体構造解析を行い，結晶構造を 2.4 Å 分解能で決定することに成功した。イネ複合体で観察された Hd3a-GF14，GF14-OsFD1 の相互作用部位はともに高等植物で高度に保存されていた。FT と 14-3-3 が相互作用することも合わせると，フロリゲン-14-3-3-転写因子の相互作用は，高等植物全般に共通して存在する花成経路であると考えられる。

florigen, 14-3-3, structural biology

講演番号：4SY13-7
講演日時、会場：3 月 29 日 15:50～ B 校舎 41 会場

カチオン・カルシウムチャネルを標的分子とした農薬開発の現状と可能性
Current studies and possibilities of cation/Ca2+ channels as a target of pestisides

○森 泰生（京都大学）
○Yasuo Mori (Kyoto Univ.)

細胞内のイオンの中で Ca^{2+}濃度変化は、主に生理機能のスイッチとして利用されており、筋収縮、細胞分化、分泌、増殖、細胞死など様々な生理応答が引き起こされる。このCa^{2+}濃度変化は、カルシウムチャネルが担っており、その機能異常が重篤な疾患につながることから、多くの医薬品の創薬が行われている。また、近年日本農薬株式会社より開発されたチョウ目昆虫選択的殺虫剤 Flubendiamide の標的分子が Ca^{2+}放出チャネルであるリアノジン受容体（RyR）であることから、農薬のターゲットとしても Ca^{2+}チャネルが注目されつつある。

RyR は小胞体膜に存在し、小胞体からのCa^{2+}放出を担うCa^{2+}チャネルである。主な生理機能としては、筋収縮の際に必要な Ca^{2+}濃度上昇を担うことが知られている。我々は、チョウ目モデル昆虫であるカイコから RyR（sRyR）を新たにクローニングし、組換え発現系において、Flubendiamide が sRyR を介したCa^{2+}放出を惹起するが、ウサギの RyR では Flubendiamide は作用しないことを示した。光アフィニティーラベル化により、この選択性を規定する Flubendiamide 結合部位を探索すると、sRyR の N 末端側（183-290 残基）と膜貫通領域を含む C 末端側（4084-5084 残基）が重要であることがわかった。今回我々は、新規ラベル化剤を合成し、LC/MS/MS により詳細な Flubendiamide 結合部位の同定を行った。すると、生物種間の RyR で相同性の低い領域である Divergent Region 1（DR1）周辺に結合していることが分かった。本発表では、Flubendiamide の昆虫種選択的作用機構について検討した結果を示したい。

また、新たな農薬ターゲットとして、現在医薬品の重要なターゲットとなっている TRPA1 を中心に言及したい。TRPA1 チャネルにおける生体内の役割は、喫煙や炎症による気管における痛みや Prostaglandin などの炎症メディエーターや細胞内アルカリ化による痛みなど、痛みに関する研究が多く報告されている。痛みに関する報告に加えて、TRPA1 が呼吸制御に関わるという報告がなされており、TRPA1 は感覚神経・交感神経のみならず副交感神経においても重要な役割を担っている事が明らかになってきている。哺乳類では TRPA1 の 1 種類のみが存在するのに対して、ショウジョウバエでは TRPA1、Painless、Pyrexia、Water witch の 4 種類の TRPA チャネルホモログが存在している。現在までのところ、ショウジョウバエの TRPA1 が O_2 センサーかどうかや、ショウジョウバエ TRPA ホモログ間で O_2 感受性に違いがあるかなどは分かっていない。そこで我々は、4 種類のショウジョウバエ TRPA ホモログをクローニングし、それらの酸素や酸化感受機能を評価した。これらの結果を基に、昆虫 TRPA チャネルにおける農薬ターゲットとしての可能性にも言及したい。

ion channel, pestiside, calcium

講演番号：4SY14-1
講演日時、会場：3 月 29 日 9:00～ D 校舎 25 会場

酵母と S-アデノシルメチオニン

Study on S-adenosylmethionine of yeast

○家藤 治幸（愛媛大農）
○Haruyuki Iefuji (Ehime Univ.)

S-アデノシルメチオニン（以下 SAM）は、生体内における主要なメチル基供与体である。DNA、RNA、各種生理活性蛋白質のメチル化や、ステロール、リン脂質等の生合成経路上のメチル基転移反応などに関与している。

一方、含硫アミノ酸系合成系における中心的な物質であり、含硫アミノ酸代謝のホメオスタシスにも重要な役割を果たしている。

臨床学的には、SAM はアルコール性肝炎その他肝臓疾患に顕著な治癒・予防効果のあることで注目され、またうつ病に対する治癒効果、骨粗鬆症での機能回復効果、老人性痴呆症の改善効果なども実証されている。

SAM は、メチオニンアデノシルトランスフェラーゼ(Sam1p、Sam2p) 関与のもとで、メチオニン ＋ ATP → SAM ＋ PPi ＋ Pi の式により生成される。

Shiozaki らは、 SAM の生産能につき広く微生物界を探索し、酵母が、しかも清酒酵母が SAM 含量の極めて高いことを見出した。演者らも、各種醸造酵母等との SAM 蓄積量を測定比較し、清酒酵母が他のものより SAM を多く蓄積することを確認した。また、DNA マイクロアレイ解析により、清酒酵母においては、SAM 生合成や SAM 取込みに関与する遺伝子群の多くが、実験室酵母より高発現していることを示した。

振盪培養より静置培養で、また培地にエタノールを存在させることでさらに SAM 量が増大し、静置・エタノール存在下という醸造環境が酵母の SAM 蓄積にとって有利であることが示された。

そこで、実際の清酒醸造もろみ中での SAM の蓄積挙動につき経時的な測定を行った。結果、SAM は酵母の増殖期には少なく、酵母の増殖が定常期に近づいた時期より、アルコールの生成と合わせるように生産蓄積していくことが示された。

清酒醸造においては、増殖を停止した後の酵母により大半のアルコールが生産され、それに伴い定常期細胞内で ATP が生産され続ける。細胞にとって過剰な ATP が生産されているとすれば、過剰な ATP の処理はどのようにされているか？講演では、清酒醸造上の不思議とされてきたこの点について、SAM 蓄積機構の観点から考察してみたい。

また、蓄積された SAM の N 源、S 源としての利用。SAM 高蓄積変異酵母取得の試み [1]。抽出 SAM の安定性向上化の検討 [2]。SAM 高蓄積酵母のラット供与試験等についても、紹介したい。

【1】特許 3972098　Ｓ－アデノシルメチオニン高蓄積微生物の取得法
【2】特許 5046077　Ｓ－アデノシルメチオニンの安定化方法

S-adenosylmethionine, yeast

講演番号：4SY14-2
講演日時、会場：3 月 29 日 9:40～ D 校舎 25 会場

清酒酵母の S-アデノシルメチオニン高蓄積機構に関する研究

Analysis of high accumulation mechanism of S-adenosylmethionine in sake yeast

○金井 宗良（酒総研）
○Muneyoshi KANAI (NRIB)

S-アデノシルメチオニン（SAM）は生体内の主要なメチル基供与体で、各種微生物の中で酵母（特に清酒酵母）が SAM を高蓄積していることが知られている。そこで、本研究において清酒酵母における SAM 高蓄積機構を解明することにより、新たな高付加価値が付与された有用醸造酵母の育種に役立てることも可能となり、産業界への貢献も期待できる。

まず、酵母の SAM 高蓄積に寄与する因子の 1 つとして同定されたアデノシンキナーゼをコードする *ADO1* 遺伝子について、*ADO1* 遺伝子破壊株の DNA マイクロアレイ解析、メチオニン生合成経路に関与する様々な代謝産物量を測定した結果、*ADO1* 遺伝子破壊株は、メチオニン合成経路を活性化させることで S-アデノシルメチオニンを蓄積させることが示唆された [1)]。さらに、*ADO1* 遺伝子破壊株が示すコルデセピン耐性を指標に遺伝子組換え操作によらない SAM 高蓄積株の新たな取得方法について検討し、新規 SAM 高蓄積株を育種することができた [2)]。

次に、清酒酵母の SAM 高蓄積能に関与する遺伝子を探索するため、清酒酵母と実験室酵母の交配による QTL（量的形質遺伝子座）解析を行った。結果、第 8 番染色体に有意な QTL の存在が示唆され、清酒酵母型アレルで相加効果を示した。特に有意な QTL 近傍に存在する 165 の遺伝子から SNPs が存在する YHR032W/*ERC1* を候補遺伝子として選択し、*ERC1* 破壊株において清酒酵母型の *ERC1* を発現させたところ SAM の蓄積を観察することができたが、実験室酵母型 *ERC1* を発現させても SAM 量にほぼ変化が見られなかったことから、清酒酵母が持つ SAM 高蓄積能に、清酒酵母型の *ERC1* が深く関与していることが示唆された。また、各種実験室酵母及び醸造用酵母（清酒、焼酎、ビール、ワイン酵母）について *ERC1* 遺伝子のシークエンスを行った結果、実験室酵母と比較してそれぞれの醸造用酵母に特異的な SNPs が存在することが分かった。

【1】Kanai *et al., Appl. Microbiol. Biotechnol*. 97, 1183-1190 (2013)
【2】特開 2011-177125「S-アデノシルメチオニン高蓄積酵母の取得方法」

S-adenosylmethionine, sake yeast, QTL

講演番号：4SY14-3
講演日時、会場：3 月 29 日 10:15～ D 校舎 25 会場

酵母における *S*-アデノシルメチオニンによる寿命制御

Regulation of lifespan mediated by S-adenosylmethionine in yeast

○水沼 正樹（広島大院先端研）
○Masaki MIZUNUMA (Hiroshima Univ. Grad. Sch. of AdSM)

生物は内外の環境からさまざまな刺激（シグナル）を受け取り、それらに対して適切な応答を行うことにより、恒常性が維持され、生命現象(増殖・分化・生存)を厳密に制御している。近年の研究から、恒常性維持の破綻は、様々な病態を引き起こし、老化にも関わることがわかった。老化過程は非常に複雑なプロセスであるが、その謎が遺伝子レベルで理解されつつある。近年、酵母、 線虫、ショウジョウバエ、マウスなどのいわゆる真核モデル生物を用いた老化・寿命研究が世界中で活発に行われている。実際、これらモデル生物を用いた研究によって、多くの寿命制御因子が同定され、老化の基本的な仕組みには共通点が多いことが明らかになった。

私達は、カルシウムイオン(Ca^{2+})の生理機能を明らかにするため、出芽酵母を用いて解析を行なっている。これまでに Ca^{2+}耐性化を指標に自然突然変異株を多数取得し(変異を *scz* と命名)、それらは 14 種類の相補性グループに分類された。*scz* 変異株を解析する過程で、Ca^{2+}シグナルは寿命制御にも関与することを発見した [1)]。

また *scz7* はメチオニン代謝系酵素の *S*-アデノシルホモシステイン水解酵素をコードしている *SAH1*(必須遺伝子)における変異であった [2)]。*sah1* 変異株は、Sah1 の基質である *S*-アデノシルホモシステインのみならずメチル基供与体として知られる *S*-アデノシルメチオニンが高蓄積していた。興味深いことに、*sah1* 変異株は顕著に短命となった。そこで、長寿遺伝子の取得を目的に *sah1* 変異株の温度感受性を回復させる変異株の取得を実施した。その結果、優性変異株(*SSG1* 変異と命名)が一種類のみ取得された。期待通り *SSG1* 変異株は野生株と比較して顕著に長寿命となり、有意に *S*-アデノシルメチオニンが高蓄積していた。

本シンポジウムでは、*SSG1* 変異株の表現型の解析を通して明らかになってきた *S*-アデノシルメチオニンによる長寿メカニズムについて紹介したい。

1) Tsubakiyama, *et al*., *J. Biol. Chem*., 286, 28681-28687, 2011

2) Mizunuma, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101, 6086-6091, 2004

yeast, S-adenosylmethionine, lifespan

講演番号：4SY14-4
講演日時、会場：3 月 29 日 10:50～ D 校舎 25 会場

清酒酵母の新しい機能「睡眠の質の向上」

New Function of Japanese Sake Yeast: Improvement of Sleep Quality

○物井 則幸（ライオン株式会社）
○Noriyuki Monoi (Lion Corporation)

清酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)は、日本酒の製造に必要であると同時に、古くから甘酒、わさび漬け、粕汁など酒粕を利用した食品として食されてきた。本報では、清酒酵母の新しい機能として見出した睡眠の質の向上機能を紹介する。

睡眠は生活時間の約 3 分の 1 を占めるが、大脳を休息させる、さらには心身の修復・回復や翌日の活動に備えた体内環境の整備など生活の質を維持・向上させるために不可欠な生理現象である。現代社会では睡眠時間の短縮や夜型化といった生活スタイルの変化により、睡眠に不満を持つ人の割合が徐々に増加し、特に 40 代以上では半数以上の人が睡眠に対して不満を有すると報告されている。限られた睡眠時間の中で、健康を維持し日中の活動度を高めるため、深い眠りの割合を増やし、睡眠の質を向上させる工夫が求められている。

このような背景の下、我々は睡眠の質の向上を目指した食品素材の探索を行った。睡眠・覚醒の制御に関わる脳内の受容体の中からアデノシン受容体に着眼し、その活性化能を示す食品素材を探索した。アデノシン受容体発現 HEK 細胞を用いて 80 種の食品素材を評価した結果、清酒酵母が最も高いアデノシン受容体の活性化能を示した。

見出した清酒酵母は、動物モデルにおける脳波解析により、深い睡眠であるノンレム睡眠量の増大機能を示し、アデノシン受容体選択的アンタゴニストによりその機能が顕著に抑制されたことから、アデノシン受容体を介して睡眠を改善する機能を有することが明らかとなった。また、他の酵母種とのアデノシン受容体活性能の比較から、S-アデノシルメチオニン(SAM)が清酒酵母の機能性成分のひとつであると考えられた。ヒト試験において、SAM 含有清酒酵母の摂取により、睡眠の深さを示すデルタ波パワー値（脳波解析）がプラセボ摂取と比較して有意に増加すると共に、主観的評価における「起床時の眠気」および「起床時の疲労感」が改善することを確認した。以上より、清酒酵母は現代社会の睡眠不満を解消する素材として期待される。

Sleep, Sake yeast, adenosine

講演番号：4SY14-5
講演日時、会場：3 月 29 日 11:25～ D 校舎 25 会場

醸造副産物の機能性成分 －*S*アデノシルメチオニンを中心に－

Functional components of brewers and distillers co-products, with a focus on *S*-adenosylmethionine

○藤井 力 [1,2] ([1] 酒総研、[2] 広島大院生物圏)
○Tsutomu Fujii[1,2] ([1]NRIB, [2]Hiroshima Univ.)

これまでの講演にあったように、酵母、特に清酒酵母が高い生産能を持つ *S*アデノシルメチオニン(SAM)には様々な機能性がある。それでは、実生活で SAM を摂取するにはどうしたらよいのか。

S-adenosylmethionine & food で検索すると上位 HP には「Dietary Soueces: SAMe is not found in food.[1)]」、「Can you get SAM-e naturally from foods? : There are no food sources of SAM-e.[2)]」とあり、「食品から摂ることはできない」と（欧米では）認識されていると思われる。一方、SAM は脳や肝臓に多いことが知られ、豚レバーには 1.8 mg/100 g の SAM が含まれる[3)]が、清酒酵母を含むにごり酒の SAM 含量は豚レバーの約 1.4 倍と記されている。[3)]

酵母は、清酒より清酒粕に、焼酎より焼酎粕に含まれる。我々は、清酒粕や焼酎粕には、にごり酒以上に SAM が含まれていると考え、清酒粕と焼酎粕中の SAM 含量を調査した。

清酒粕 109 点の SAM 含量の平均は 100 g あたり 49 mg で､豚レバーの約 27 倍と桁違いであった。同じ製造法（吟醸、純米、本醸造等）の清酒粕でも多いものと少ないものがあったが、液化仕込みの清酒粕に多い傾向があり、豚レバーの約 116 倍含有する清酒粕もあった。焼酎粕では、SAM は熱に弱く、常圧蒸留粕に含まれなかったが、減圧蒸留粕には含まれていた。清酒粕を原料とした焼酎粕に多い傾向があり、焼酎粕固形部の乾燥重量 100 g あたりで 102 mg 含有するものもあった。

なお、約 4 割の清酒粕が 100 g で抗うつに有効とされる量を含んでおり、最も高含有していた清酒粕は、20 g で抗うつ、50 g で抗肝障害、200 g で抗関節炎に有効とされる量を含んでいた。清酒粕中で SAM は比較的安定で、4℃での保存でも半年後に約半分が残存していた。その他、SAM と代謝の近い成分についても紹介したい。

今後は、戦略的イノベーション創造プログラム「次世代機能性農林水産物・食品の開発」課題に参加し、清酒粕のさらなる高機能化を目指し研究を進める予定である。本研究の一部は、日本酒造組合中央会との共同研究、あるいは受託研究として実施した。

1. *S*-adenosylmethionine | University of Maryland Medical Center
http://umm.edu/health/medical/altmed/supplement/sadenosylmethionine#ixzz3IWwXRGOQ
2. Vitamins and Supplements Lifestyle Guide SAM-e (*S*-adenosylmethionine, SAMe) | WebMD
http://www.webmd.com/vitamins-and-supplements/lifestyle-guide-11/supplement-guide-sam-e
3. 関口: 食品と開発 45(8), 57-59 (2010)

S-adenosylmethionine, sake cake, shochu distillation remnant

講演番号：4SY15-1
講演日時、会場：3 月 29 日 13:35～ A 校舎 36 会場

魚介類廃棄部に含まれるコンドロイチン硫酸の微細構造

Fine structure of chondroitin sulfate in uneatable part of fish

○田村 純一 (鳥取大地域)
○Jun-ichi Tamura (Tottori Univ.)

コンドロイチン硫酸やヒアルロン酸は、医薬品、健康食品、サプリメントとして注目されており、たいへん需要が高い。コンドロイチン硫酸の資源生物として、以前はクジラやウシが利用されてきたが、現在は主にサメやブタが利用されている。これらの生物は、いずれも捕獲制限や感染症の危険が問題となっており、代替資源生物の探索が急務である。コンドロイチン硫酸やヒアルロン酸は動物に幅広く存在しているが、生物種やその部位におけるこれらの分子の組成や含有量についての詳細かつ系統的な研究はなされてこなかった。

我々の研究グループは代替資源生物の探索を目的として、捕獲制限や感染症の心配のない「魚介類」に注目し、機能性糖鎖であるコンドロイチン硫酸などのグリコサミノグリカンの含有量と組成分析を行っている。これまでに 20 種以上の魚介類とそれらの部位について分析を行った結果、廃棄される部位にコンドロイチン硫酸が多く含まれることがわかってきた。頭部やヒレなどの廃棄部には軟骨などの結合組織や細胞外マトリックスが含まれているので、コンドロイチン硫酸などのグリコサミノグリカンの含有量が高いと考えられる。一方、魚種によってコンドロイチン硫酸やヒアルロン酸の含有量が大きく異なることが判明したが、同じ科や属の間に、また、同じ魚の部位間においても共通の傾向は見られなかった。魚種間でのコンドロイチン硫酸の硫酸化パターンの類似性に注目すると、運動性や棲息環境に関連があるようにも見え、今後のより詳細な調査結果が待たれる。

日本は海に囲まれているため多くの漁港があり水産業が盛んである。しかしながら中小規模の漁港を抱える地域では過疎化が進行し、都市部への人口流出が地方の産業の衰退を後押ししている。魚介類の廃棄部を原料とするコンドロイチン硫酸製造などの地域固有の産業創成ができれば、新たに地域の産業基盤を擁することになり、経済的自立の一助となるであろう。

本シンポジウムでは、これまで我々の研究グループが魚介類の種別・部位別に調査したコンドロイチン硫酸、デルマタン硫酸、およびヒアルロン酸の含有量と硫酸化パターンなどの分子情報について紹介する。併せて、実質的な地域活性化とはどうあるべきかを考えてみたい。

Chondroitin sulfate, Dermatan sulfate, Hyaluronic acid

講演番号：4SY15-2
講演日時、会場：3 月 29 日 14:00～ A 校舎 36 会場

骨の形成者と破壊者を制御するコンドロイチン硫酸

Chondroitin sulfate: a regulator of bone builder and destroyer

○保坂 善真[1]、田村 純一[2] ([1]鳥取大 農 獣医解剖、[2]鳥取大 地域 地域環境)
○Yoshinao HOSAKA[1], Jun-ichi TAMURA[2] ([1]Fac. Agri., Tottori Univ., [2]Fac. Reg. Sci., Tottori Univ.)

コンドロイチン硫酸（CS）は、生物種を越えて広く保存される糖の一種であり、構造の違いからCSはA～E, HおよびKの7種類に分類される。CSが細胞へ及ぼす影響は、神経細胞に関する研究でおもに発見、報告されてきた。近年はさらに、間葉組織（脂肪、骨、筋肉）の発生や増殖、分化にもCSが関与することが明らかになりつつあり、私たちの研究室でもこれら組織でのCSの役割や機能に関する研究を行っている。

今回話題とする骨は、常に形成と分解･吸収を繰り返すダイナミックな脊椎動物特有の器官である。「骨芽細胞」と「破骨細胞」が、骨のダイナミックな変化を制御する主役であり、これらの細胞がとりなす絶妙なバランスで、骨組織の恒常性が維持され骨量がほぼ一定に保たれている。骨形成を担う骨芽細胞の増殖や分化にはCSは特異的な作用を示す。たとえば、CS-EやHを骨芽前駆細胞に作用させると細胞増殖が亢進し、とくにCS-EはBMP-4と協働で骨芽細胞への分化を促進させ（Miyazaki, 2008）、また、分化促進の作用機構がカドヘリンを介したERK-Smadシグナルの活性化によるものである（Koike, 2012）ことも明らかにされている。私たちはこれを生体に応用し、CS含有ゼラチンスポンジを骨欠損部に埋入し、骨再生が有意に促進されることを確認している（Hosaka, Mar Drugs, 2013）。

一方、骨を壊す側の破骨細胞の分化にもCSは作用する。破骨細胞前駆細胞にCSを加えて破骨細胞への分化を誘導すると、破骨細胞の形成は顕著に抑制される。すなわち、破骨細胞マーカーの酒石酸耐性酸性フォスファターゼ（TRAP）陽性細胞数はCSの添加で抑制され、骨吸収部の面積も対照と比較して有意に減少した。また、糖鎖長が短いものでは破骨細胞への分化はほとんど確認できなかった。すなわちCSは破骨細胞の分化と骨吸収能を抑制すること、そして、糖鎖長が破骨細胞の分化を決定する一因であることを明らにした。CSの作用部位を検索したところ、CSは破骨細胞分化に必須の因子であるRANKLと結合してRANKLの受容体RANKへのアクセスを阻害し、細胞内シグナル伝達を抑制することが明らかとなった。

さらに、卵巣摘出後に低カルシウム飼料を与えて骨粗鬆症を実験的に誘導したOVXマウスにCSを12週間投与し骨の動態を解析すると、実験期間終了時の血清中の骨形成マーカー濃度は対照（CS無投与OVXマウス）のそれと比較して増加した。一方、RANKL量は対照よりも減少し、さらに、破骨細胞機能を反映するマーカー量も低下した。また、CS投与で骨梁の面積は回復した。これらのことを総合すると、OVXマウスの体内ではCSが骨芽細胞の機能を亢進させる一方で、RANKLの機能発現を調節しながら破骨細胞の分化を抑制し、骨量を制御し骨粗鬆症の状態を改善したと考えられる。

以上のことから、CSは骨芽細胞、破骨細胞の双方に作用し、その形態形成と恒常性維持の鍵を握っているようだ。本シンポジウムでは、私たちの研究の一部を報告しながら、CS糖鎖がいかに骨の形成者（骨芽細胞）と破壊者（破骨細胞）を制御しながら骨をつくるのか、紹介させていただく。

chondroitin sulfate, bone formation, osteoblast and osteoclast

講演番号：4SY15-3
講演日時、会場：3 月 29 日 14:30～ A 校舎 36 会場

残存タンパクを低減化したキチンナノファイバーの開発

Development of chitin nanofibers eliminated protein from chitin

○黒住 誠司[1]、清瀬 正敏[1]、高森 吉守[1]、佐藤 公彦[1]、伊福 伸介[2]([1]甲陽ケミカル、[2]鳥取大院・工)
○Seiji Kurozumi[1], Masatoshi Kiyose[1], Yoshimori Takamori[1], Kimihiko Sato[1], Shinsuke Ifuku[2]
([1]Koyo Chemical Co., Ltd., [2]Tottori Univ.)

キチンはカニやエビなどの甲殻類の外殻を構成する高分子多糖であり、キチンの湿式解繊処理したキチンナノファイバー（キチン NF）は、ヒト皮膚三次元モデルを用いた試験やマウスによる動物試験において皮膚保護作用が報告されており、化粧品の原料として期待される。アレルギー性物質が化粧品中に含まれている場合、日常の使用で皮膚から吸収され、固有の過敏性を獲得し、その後、アレルギー性物質を含む通常の食事を摂取するとアレルギー性を示す場合があることが知られるようになった。かに由来のキチンを化粧品原料に利用すべく、本研究では、キチン中のタンパク質量の低減化を目的とした。

実験

カニ殻、キチン中のアレルゲン分析（EIA 法）－カニ殻、キチン（キチン TC-L，甲陽ケミカル）中の甲殻類（エビ・カニ）アレルゲン（トロポミオシン）分析を EIA 法（FA テスト EIA-甲殻類「ニッスイ」及び甲殻類キット「マルハ」）で行った。

カニ殻、キチン中の総タンパク分析－カニ殻、キチン TC-L 中の総タンパク質量を Bradford 法（Biorad, プロテインアッセイキット）で測定した。また、脱タンパク処理（5~10% NaOH, 80℃ 3 時間以上）の処理回数を変えたキチン TC-L を同様に測定した。

タンパク低減化キチン NF の試作－総タンパク質量を低減したキチン TC-L の 1%分散液を有機酸（酢酸等）で pH 3 付近に調整し、マスコロイダー（増幸産業, MKZA10-15A）及びスターバースト（スギノマシン）の 2 種類の解繊装置でキチン NF を試作した。

結果

アレルゲン分析でカニ殻は陽性だったが、キチン TC-L は検出限界以下（<1μg/g）だった。一方、カニ殻、キチン TC-L の総タンパク質量は、それぞれ 2878μg/g，および 101～251μg/g であった。更に脱タンパク処理を 3 回以上行ったキチン TC-L は検出限界以下（<100μg/g）に低減した。総タンパク低減化キチン TC-L を 2 種類の解繊装置でキチン NF を作製したところ、SEM 観察でナノファイバー領域まで良好に解繊され、キチン NF（1%分散液）の総タンパクは、検出限界以下（<1μg/g）になった。キチンのタンパクを低減化し、化粧品用途に有用なキチン NF を試作することができたと考えられる。

chitin nanofaibers, elimination of protein

講演番号：4SY15-4
講演日時、会場：3 月 29 日 15:00～ A 校舎 36 会場

カニ殻由来の新繊維「キチンナノファイバー」の製造とその利用開発

Preparation of chitin nanofibers from crab shell and the applications

○伊福 伸介（鳥取大院工）
○Shinsuke Ifuku (Tottori Univ.)

キチンはカニやエビ、昆虫類の外皮、キノコのような菌類の細胞壁などに存在し、主に生体を支える構造材料としての役割を果たし、地球上で最も豊富なバイオマスの一つとして知られている。カニやエビの殻はキチンナノファイバーとその間隙を充填するタンパク質と炭酸カルシウムを主とした灰分が複合した緻密な高次構造で構成されている。よって、適切な処理を施せばカニ殻に内包されるキチンナノファイバーが得られると考えた。本発表ではそのような考えに基づいたキチンナノファイバーの製造方法とヘルスケアを中心とした利用について紹介する。

① **カニ殻から単離されるキチンナノファイバー：**カニ殻に含まれる炭酸カルシウム、タンパク質、脂質、色素を順次取り除いた。一連の精製により得られるキチンに pH=3 の酢酸水溶液を添加して約１％の濃度に調整した。このキチンの水懸濁液を解繊装置を用いて微細化した。微細化したキチンは幅がおよそ 10 nm と極めて細く、均質であり、非常にアスペクト比の高いナノファイバーであった。キチンナノファイバーは乳白色～半透明の均質な水分散液の状態で得られ、比較的粘ちょうであった。これは比表面積とアスペクト比の大きいナノファイバーが水中で絡み合いながら均質に分散しているためである。なお、キチンの微細化において酸の添加が重要である。

② **キチンナノファイバーの生体機能：**キチンナノファイバーが潰瘍性大腸炎に対する効果を検証した。潰瘍性大腸炎は原因不明の難治性の炎症性腸疾患である。大腸に急性炎症を誘発させたマウスに対して、キチンナノファイバーを服用させる。３日あるいは６日間の服用後、組織学的な評価を行った。キチンナノファイバーが潰瘍性大腸炎の消炎効果があることが明らかとなった。キチンナノファイバーの服用により炎症および線維症が大幅に軽減したことが組織学的な評価によって確認された。キチンナノファイバーの服用に伴い、大腸組織内の核因子κB（NF-κB）の活性が減少したこと、血清中の単球走化性タンパク質-1（MCP-1）の血清中の濃度が減少したことが腸疾患の抑制に寄与したと思われる。NF-κB は急性および慢性炎症反応に関与するタンパク質複合体であり、MCP-1 は炎症性サイトカインである。また、キチンナノファイバーを塗布することにより皮膚の健康を増進し得ることを明らかにした。ヘアレスマウスの背部にキチンナノファイバーを薄く塗布した。わずか８時間で表皮厚および膠原繊維の密度が増加することが組織学的な評価によって確認された。また、キチンナノファイバーの塗布により外界からの刺激に対するバリア機能を有することが市販のヒト皮膚３次元モデルの表皮によって明らかになった。

chitin, nanofiber, crab shell

講演番号：4SY15-5
講演日時、会場：3 月 29 日 15:30～ A 校舎 36 会場

高分子モズクフコイダンの新たな機能性について

New functions of high-polymer Mozuku fucoidan

○川本 仁志 (海産物のきむらや)
○Hitoshi Kawamoto (Marine Products Kimuraya)

海藻は主に緑藻類、褐藻類、紅藻類の 3 つのグループに分類される。緑藻類ではアオサ、褐藻類ではヒジキ、紅藻類ではオゴノリなどが分類される。モズクは褐藻類に分類され、日本で食用として主に 6 種類のモズクが知られているが、その中でもオキナワモズクとイトモズクがよく知られている。これらの海藻は生物資源として藻体は主に食用として利用され、細胞間物質として存在する粘性多糖であるアガロース、カラギーナン、アルギン酸は食品のみならず、化粧品や繊維産業にも利用されている。褐藻類の細胞間物質としてフコイダンとアルギン酸が存在し、フコイダンは褐藻類のなかでもオキナワモズクに最も多く含まれている。フコイダンは主にフコースを構成糖とするヘテロ硫酸化多糖の総称で、藻種により多くの分子種がある。このフコイダンは構成糖、硫酸基量や分子量が異なり、構造が複雑であるため明確な構造の決定や研究が遅れている。フコイダンは抗凝血作用、抗ウイルス作用、抗腫瘍活性などの多くの生理活性が報告されているものの研究用試薬として利用されている程度であまり利用されていなかった。近年、健康維持や疾病予防のため健康食品･機能性食品への関心が高まり、フコイダンが健康食品として利用されるようになった。

われわれのフコイダン研究は、大腸菌 0157 食中毒事件が多発する中、当社製品の安全性検証の研究がきっかけであった。その後、有効成分がフコイダンである事がわかり、フコイダンの生理活性について研究を開始するきっかけとなった。島根大学と共同で培養細胞を用いた実験で抗ガン剤の副作用抑制作用を発見し、更に地元の鳥取大学との研究も開始した。その後、ヒト臨床、動物に対するフコイダンの機能性など様々な研究成果が得られた。その中でも都市エリア産学官連携促進事業の一環で鳥取大学との共同研究において軟骨再生作用や酸性尿改善作用など地域活性化につながる様々な研究成果が得られた。

疾病に対する研究だけにとどまらず、ヒトに対する効果としてフコイダンの腸内環境への影響やアルコール摂取時の影響についても研究を行った。フコイダンの腸内環境への影響については 2 週間あたりの排便回数が少ない成人にフコイダンを摂取すると腹部状態の改善効果がみられた。また、過剰摂取および長期摂取を行い、血液性状、腹部に重篤な症状は見られず安全性が確認された。多くのフコイダン研究は健康機能に関わるものが主であるが、飲酒に関わる作用は他ではない。アルコール摂取時のエタノール・アセトアルデヒド低減作用、アルコール飲料の風味改善作用についての成果も報告する。

fucoidan, Mozuku, alcohol

講演番号：4SY15-6
講演日時、会場：3 月 29 日 16:00～ A 校舎 36 会場

海藻由来のユニークな酵素

Novel enzymes from sea weeds

○大城 隆（鳥取大工）
○Takashi Ohshiro (Tottori Univ.)

海に囲まれたわが国において、海藻は古来親しまれてきた食材のひとつであるが、近年、その成分は健康食品素材として大きな注目を集めている。また、海藻は貴重な海洋生物資源との認識も高まり、医薬、エネルギー分野での活用を目的とした研究が盛んになってきている。当研究室では、かねてから海藻自身が生産するハロゲン化酵素についての研究を行ってきた。その一方、海藻に付着している微生物由来の酵素に関する研究も展開しており、本シンポジウムでは、これらについて紹介する。

・海藻由来ハロゲン化酵素

有機化合物をハロゲン化する酵素反応の多くは過酸化水素に依存して起こり、この反応に関与する酵素はハロペルオキシダーゼ（HPO）と呼ばれる。紅藻サンゴモ科に属するピリヒバ（*Corallina pilulifera*）は日本のどこの海岸にも見られる海藻であり、著量の HPO タンパク質を含有する。ピリヒバ由来 HPO の特徴は、ホモ十二量体構造を取ること、熱安定性、溶媒耐性が非常に高いこと、活性中心にバナジン酸を保持することが挙げられる。当研究室では、HPO の X 線構造解析の結果、活性中心から離れたポリペプチド鎖ループ中にカルシウム原子が存在し、これが本酵素の熱安定性、溶媒耐性に寄与していることを実証した。また、一つのアミノ酸置換により、ハライドに対する活性が変化した変異酵素を取得することができた。

・フコイダン分解微生物、分解酵素

ヘテロ硫酸化多糖であるフコイダンは、褐藻類に特徴的な粘性成分の一つであり、抗血液凝固、抗腫瘍作用などを有することが報告されている。フコイダンは褐藻ごとに生理活性や構成糖、化学構造が異なるが、生理活性を示すために必要な化学構造についてはほとんど解明されていない。当研究室ではオキナワモズク由来フコイダンを分解できる微生物を検索し、分解に関与する酵素についての研究を行っている。分解微生物は海藻をはじめとする海洋環境から単離され、いずれも菌体内に酵素を有し、培地にフコイダンを添加した場合のみ酵素の生産が見られた。分解微生物 *Luteolibacter algae* H18 がフコイダンを分解する際は、脱アセチル化反応の後に低分子化反応が進行し、脱硫酸化反応も起こることが判明した。本菌株のゲノム配列を解析したところ、脱アセチル化、脱硫酸化、低分子化に関与すると想定される ORF が見出され、これら機能について解析を実施している。

haloperoxidase, fucoidan, algae

講演番号：4SY16-1
講演日時、会場：3 月 29 日 13:33～ G 校舎 41 会場

希少放線菌の「休眠と覚醒」に関する遺伝子発現制御機構

Regulation of gene expression for dormancy and awakening in a rare actinomycete

○大西 康夫（東大院農生科）
○Yasuo Ohnishi (Univ. of Tokyo)

非選択的な方法で放線菌を土壌より分離すると、通常、分離株の 90%程度は *Streptomyces* 属が占めるため、*Streptomyces* 属以外の放線菌は希少放線菌と呼ばれる。希少放線菌は新規生理活性物質の探索源として注目されてきたが、胞子嚢を形成するなど極めて特徴的な形態分化を示すものも多く、細菌の形態分化という基礎生物学的な観点からも大変興味深い菌群である。演者の研究室では、希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* を対象とした研究を 8 年前から行ってきた。

固体培地上において、*A. missouriensis* は栄養増殖細胞である基底菌糸として、枝分かれしながら菌糸状に生育する。その後、おそらくは栄養源の枯渇が引き金となって、基底菌糸から短い胞子嚢柄を介して空中に胞子嚢が形成される。胞子嚢には運動性胞子が数百個程度内包されている。湿潤な環境におかれると胞子嚢が開裂し、運動性胞子が胞子嚢から放出されるが、純水では胞子嚢の開裂は起こらず、土壌抽出液中に含まれる何らかの分子が胞子嚢の開裂を引き起こすシグナルとして必要である。運動性胞子はべん毛を用いて高速で遊走するが、走化性を有することも示されている。より好ましい環境に移動した運動性胞子は運動を停止し、胞子発芽が起こって再び菌糸状の生育が始まる。このように、*A. missouriensis* においては、「休眠と覚醒」、「運動の開始と停止」など、外界からのシグナルに応答したダイナミックな細胞状態の変化が起こっており、その分子機構を解明することで、普遍的な「生命の仕組み」の一端を明らかすることができるのではないかと考えている。

本発表においては、(1) 胞子嚢形成に関わる 2 つのグローバル転写因子（BldD, TcrA）に関する研究、(2) 胞子嚢開裂の分子機構の解明に向けて行った一連の研究、について最新の実験結果を含めて紹介する。

rare actinomycetes, regulation of gene expression, sporangium

講演番号：4SY16-2
講演日時、会場：3 月 29 日 14:02～ G 校舎 41 会場

アーキアにおける核酸分解機構の解明
Pathways responsible for nucleoside degradation in Archaea
○跡見 晴幸[1,3]、青野 陸[1]、吉井 祐太[1]、法土 咲菜恵[1]、今中 忠行[2,3]、佐藤 喬章[1,3] ([1]京大工、[2]立命館大生命科学、[3]JST)
○Haruyuki Atomi[1,3], Riku Aono[1], Yuta Yoshii[1], Sanae Hodo[1], Tadayuki Imanaka[2,3], Takaaki Sato[1,3] ([1]Kyoto Univ., [2]Ritsumeikan Univ., [3]JST)

アーキアは系統学的解析に基づいて 1977 年に Carl Woese らにより提唱され、細菌や真核生物と区別される第三の生物界を構成する。アーキアには超好熱菌、メタン生成菌、高度好塩菌など数多くの極限環境微生物が含まれる。アーキアはイソプレノイド型膜脂質を利用することや細菌と同じ原核生物でありながら真核生物型の転写・DNA 複製装置を利用することなど数々の興味深い特徴を有する。我々はアーキアの特異な代謝機構やその制御に着目し研究を進めている。

ここでは超好熱性アーキアと好塩性アーキアの核酸代謝機構に関する研究について報告する。アーキアの多くは pentose phosphate pathway をもたないため、核酸の pentose（ribose）部位の生合成・分解経路が不明であった。Pentose 合成に関しては以前に ribulose monophosphate pathway を介した生合成経路の存在が判明した（1)。分解に関しては *Thermococcus kodakarensis* を含む一部のアーキアにおいて AMP phosphorylase, ribose-1,5-bisphosphate isomerase (R15P isomerase), Rubisco からなる NMP 代謝経路の存在が明らかとなった（2,3)。さらなる解析を通じて NMP 代謝経路は nucleoside phosphorylase, ribose-1-phosphate kinase（R1P kinase）を介して nucleoside の分解にも関与することが示唆された。一方、*Halopiger xanaduensis* を含む 9 種の好塩性アーキアは R15P isomerase のホモログのみを単独で有し、その機能は不明であった。単独で存在する R15P isomerase とそれとオペロンを形成する sugar kinase (RbsK) の組換え型タンパク質を解析した結果、RbsK が R1P をリン酸化して ribose 1,5-bisphosphate (R15P)へ、R15P isomerase がこの R15P を ribulose 1,5-bisphosphate (RuBP) へと変換できることが明らかとなった。RuBP を基質とする酵素はいままで Rubisco しか知られていないが、R15P isomerase を単独で有する好塩性アーキアには Rubisco が無く、RuBP がどのように代謝されるかは不明であった。そこでこれらの好塩性アーキアに特異的に存在する遺伝子を探索した。その結果、haloacid dehalogenase superfamily hydrolase (HAD hydrolase)と fuculose-1-phosphate aldolase (FucA) と annotation された遺伝子を見出し、それらの機能解析を進めた。その結果、好塩性アーキアにおいて R1P を dihydroxyacetone phosphate と glycolaldehyde へと代謝する新規代謝経路の存在が示唆された。

（1）Orita I, Sato T, Yurimoto H, Kato N, Atomi H, Imanaka T, Sakai Y, J. Bacteriol., 188(13), 4698-4704, 2006.
（2）Sato T, Atomi H, Imanaka T, Science, 315(5814), 1003-1006, 2007.（3）Aono R, Sato T, Yano A, Yoshida S, Nishitani Y, Miki K, Imanaka T, Atomi H, J. Bacteriol., 194(24), 6847-6855, 2012.

archaea, metabolism, Rubisco

講演番号：4SY16-3
講演日時、会場：3 月 29 日 14:31～ G 校舎 41 会場

複合培養による微生物潜在機能の発掘

Mining of microbial metabolic potential by combined-culture

○尾仲 宏康（東大院農生科）
○Hiroyasu Onaka (Univ. of Tokyo)

天然物資源を微生物に求める際に培養が必須であることは自明である。一方、放線菌は、ストレプトマイシン、エリスロマイシン、カナマイシン、FK506 など医薬品となる多様な生理活性物質の生産菌として人類へ多大に貢献しているが、近年の複数の放線菌全ゲノム解析の結果によると、放線菌はこれまで考えられていた以上に多くの二次代謝産物、すなわち生理活性物質を生産することが示唆されている。例えば、Streptomyces avermitilis においては、これまでに生産が確認された二次代謝産物は 16 種類であるのに対して、38 種類の二次代謝生合成遺伝子クラスターがそのゲノム内から見出されており、ゲノム内のたった 4 割が現物として明らかになったに過ぎない。このような事実を考慮すると、多様な天然物の発見において、培養における制限が非常に大きいことがわかる。

共培養は二種類の微生物を同一フラスコ内で培養する手法であるが、一般的に微生物の培養は純粋培養が基本であり、共培養はあまり取り入れられていない。これは、病原微生物の純粋分離に端を発した近代微生物学に原因があると思われるが、天然物生産においては必ずしも純粋培養にこだわる必要が無く、むしろ、複数の菌が混在する共培養環境の方が自然環境により近いと考えることもできる。

複合培養法は我々によって考案された天然物生産に効果的な共培養法である。放線菌を、細胞表層にミコール酸という脂肪酸を有する共通の特徴を有する一群の微生物と共培養すると、放線菌の二次代謝パターンが純粋培養時と比べて、大きく変化する。この現象を利用して、放線菌とミコール酸含有細菌を共培養して、純粋培養時には生産しない二次代謝産物を単離する手法が複合培養である。興味深いことに、二次代謝に影響を与える因子はミコール酸そのものではなく、ミコール酸を有する細胞全体であり、しかも生きている状態で直接放線菌と接触しないと二次代謝の活性化がおこらない。本講演では、複合培養による二次代謝活性化の機構について、我々の最近の研究を紹介する。

＜参考文献＞
化学と生物 2014 年 10 月号 p. 685 － 692

co-culture, antibiotics production, Streptomyces

講演番号：4SY16-4
講演日時、会場：3 月 29 日 15:00～ G 校舎 41 会場

水生植物と表層微生物の新しい共生メカニズム
A New Mutualistic Mechanism of the Phytosphere Bacteria from Aquatic Plants

○森川 正章 [1,2] ([1] 北海道大環境、[2]JST-ALCA)
○Masaaki Morikawa[1,2] ([1]Hokkaido Univ., [2]JST-ALCA)

およそ 60 兆の細胞からなるヒトには 100～1,000 兆もの細菌が棲んでいることが近年あきらかとなり、動物と微生物の深いかかわりが注目されている。一方、肥沃な土壌 1 グラム中には 1～100 億程度の細菌が含まれ、植物と微生物ともやはり深いかかわりがある。植物根の周辺域いわゆる根圏や内生の微生物が植物の成長などに重要な役割を果たすことも古くから知られている。実にいまから 100 年以上も前の 1908 年のサイエンス誌に ”Pure cultures for legume inoculation（マメ科植物の純粋培養)” という記事で細菌の影響の排除がいかに難しいかを論じている。このように土壌植物の根圏に関する研究は、長い歴史を持ち根粒菌や菌根菌をはじめとする多くの知見が蓄積されてきた。

一方、水生植物と微生物とのかかわりに関する研究は歴史が浅くまだ未解明の点が多い。わたしたちは、水生植物のひとつであるウキクサからその成長を顕著に促進する表層付着細菌を多様な属種にわたって複数発見している。さらに、一部の下水汚泥細菌をウキクサ表面に付着させることにも成功した。本演題では、これら水生植物成長促進細菌とその作用機構の特徴について解説する。また、いま注目のバイオマス資源としてのウキクサの利用価値についても紹介したい。

参考、『化学と生物』Vol. 52, No. 12 (2014).「水生植物に見いだされた新しい表層微生物作用」

Mutualism, Duckweed, Phytosphere bacteria

講演番号：4SY16-5
講演日時、会場：3 月 29 日 15:29～ G 校舎 41 会場

ゲノムから解き明かすシロアリ腸内複合共生系

Genome analysis to decipher the complex symbiotic system in termite guts

○本郷 裕一（東工大院生命理工）
○Yuichi Hongoh (TokyoTech)

シロアリは温帯～熱帯に生息する社会性昆虫で、約 3000 種が知られている。シロアリは腸内微生物群集と絶対共生することにより、枯木、枯葉、枯草、腐葉土などの、貧栄養かつ難分解性の枯死植物体のみを摂食して繁栄している。人類にとっては木材の大害虫でもあるが、熱帯では昆虫総重量の 1/3 をも占める最重要分解者であり、また木質由来次世代バイオ燃料開発への応用という観点でも再注目されている。

シロアリ腸内微生物群集は、数種類の原生生物とメタン生成古細菌、数百種以上の真正細菌で構成されている。大部分はシロアリ腸内に特異的に見られる系統群で、1 億年以上に渡ってシロアリと共進化を遂げてきたと考えられる。これまでの腸全体を用いた生理化学的実験とメタゲノム・メタ転写産物解析により、シロアリ腸内微生物群集がセルロース・ヘミセルロースの加水分解と発酵、空中窒素固定、窒素化合物合成、窒素リサイクル、還元的酢酸生成、メタン生成などで宿主シロアリの栄養に必須の役割を果たすことが示唆されている。しかし、原生生物を含む大多数のシロアリ腸内微生物種が現時点培養不能であるため、群集を構成する各メンバーの機能は不明のままであり、この複雑な共生機構の詳細はほとんどわかっていない。

本郷らの研究チームは、シングルセル・ゲノミクスを含む、全ゲノム増幅法を用いた個々の培養不能種のゲノム解析を試みてきた。2008 年には、シロアリ腸内原生生物の細胞質に共生する 2 種の培養不能細菌の完全長ゲノム配列取得に成功し、それらが窒素固定、窒素リサイクル、窒素化合物合成などの役割を担うことを初めて明らかにした。その後、原生生物細胞内共生細菌、同細胞表面付着共生細菌、腸内自由生活型共生細菌などの各種培養不能微生物の完全長ゲノムあるいはドラフトゲノムの取得を遂行し続けており、シロアリ腸内共生機構について、最新の成果を交えて紹介する。

singe cell genomics, symbiosis, gut microbiota

講演番号：4SY16-6
講演日時、会場：3 月 29 日 15:58～ G 校舎 41 会場

Asian Microbiome Project:アジア人の食と腸内フローラと健康に関する横断型コホート研究
Asian Microbiome Project: Multi-cohort study on Asian gut microbiota

○中山 二郎[1]、東 佳那子[1]、山本 麻寿紗[1]、百田 理恵[1]、本田 倫子[1]、渡辺 幸一[2]、リー ユアンカン[3] ([1]九大院農、[2]ヤクルト中研、[3]シンガポール国立大)
○Jiro Nakayama[1], Kanako Higashi[1], Azusa Yamamoto[1], Rie Momoda[1], Noriko Honda[1], Koichi Watanabe[2], Yuan Kun Lee[3] ([1]Kyushu Univ., [2]Yakult Central Institute, [3]National Univ. Singapore)

「食と体と健康」に関するライフサイエンスへの関心が日々高まってきている昨今、100 を超える人種が混在すると言われるアジアは、ユニークで健康効果の高い食文化の宝庫でもあり、「食と体と健康」の疫学フィールドとして注目される。一方、近年の腸内細菌学の発展により、500～1000 種の細菌から構成される腸内フローラは、食と健康を繋ぐインターフェースとして非常に重要な役割を果たしていることが分かってきた。そのような研究背景の中、我々は、アジア諸外国・計 10 ヶ国の研究グループと共同で、アジア各地域における食と腸内細菌叢ついて網羅的に調査している。

まず、最初に調査の対象としたのは、幼児に比べれば安定した細菌叢を有し、また成人に比べると各国の食文化を反映する食習慣を維持しているとされる小学児童を対象に食のアンケート調査と糞便の細菌叢解析を行った。細菌叢解析は 16S rRNA 遺伝子の次世代シーケンサーによる配列解析により行った。その結果、アジア人には二つの腸内細菌叢型（エンテロタイプ）が存在することが示された。一つは、プレボテラ属細菌の占有率が高い P-type で、もう一つはビフィドバクテリウム属・バクテロイデス属の占有率が高い BB-type である。P-type はインドネシアやタイの地方の児童に多く、BB-type は中国、日本、台湾、そしてタイの都市であるバンコクの児童に多かった。特に、日本の児童は､調査した 43 名の東京の児童､40 名の福岡の児童のうち､東京の児童 1 名を除いてすべて BB-type であった。エンテロタイプに加えて、各国特有の細菌叢も見られた。特に、日本の児童の菌叢は特徴的で、他国に比べて多様性に乏しく、特に大腸菌群やウェルシュ菌などの悪玉菌が少ない傾向にあった。我国特有の食事様式に加えて、生活環境が腸内フローラの構成に影響を及ぼしている可能性が示唆される。

第二期調査では、調査年齢を成人（20 才～40 才)、高齢者（60 才以上）を対象として同様に糞便の細菌叢を解析した。その結果、各国共通で、年齢とともに、ビフィドバクテリウム属細菌が減少し、大腸菌群が増加し、さらには細菌種の多様性が減少していく傾向が見られた。しかし、その度合いは国により大きく異なり、また同一国内でも個人間の差が大きく見られた。これらの腸内細菌叢の変化とその個人差が、宿主の健康や加齢にどのような影響を及ぼしているか、大変興味のもたれるところである。

gut microbiota, enterotype, aging

講演番号：4SY17-1
講演日時、会場：3 月 29 日 13:35～ D 校舎 25 会場

ユビキチン化による出芽酵母のアミノ酸・ペプチド輸送体の品質管理

Quality control of yeast amino acid permeases and a peptide transporter by the ubiquitin system

○阿部 文快（青山学院大理工）
○Fumiyoshi Abe (Aoyama Gakuin Univ.)

出芽酵母の細胞膜にはおよそ 125 種類の基質輸送体が存在し、それらは遺伝子発現、細胞内輸送、および活性のレベルで厳密に制御されている。細胞内輸送において中心的な役割を果たしているのがユビキチンシステムである。すなわち、細胞膜上の輸送体はユビキチン結合後にエンドサイトーシスされ、やがて液胞へと運ばれ分解される。アミノ酸輸送体では、培地の栄養源や様々なストレス要因が分解の引き金となる。ユビキチン化を担うのは、Nedd4 ファミリーの HECT 型 E3 ユビキチンリガーゼ Rsp5 で、K63 を介したポリユビキチン化がエンドサイトーシスシグナルになると考えられている。しかしながら、Rsp5 がいかにして多種類の輸送体を認識しているのか、基質選択メカニズムには不明な点が多い。

最近、Rsp5 と基質を結ぶアダプターとして注目されているのがアレスチン様タンパク質（ARTs）である。ARTs は PPxY 配列を介して Rsp5 の WW ドメインと相互作用し、基質を識別することが複数の輸送体で示されている。私たちは、酵母細胞を高水圧ストレス（～250 気圧）にさらすと、トリプトファン輸送体 Tat1 と Tat2 の分解が Rsp5 依存的に促進することを報告している。Tat2 の分解には Bul1 と Bul2 がアダプターとして機能する。一方、Tat1 では Bul1 と Bul2 を同時に欠損しても高圧下における分解には影響が見られなかった。ところがそれに加え 9 個の ARTs を同時に欠いた 11 遺伝子の欠損株では、Tat1 分解の抑制が見られた。従って、Tat1 では多数のアダプタータンパク質が重複して機能する可能性が高い。加圧による変性または機能低下が、Tat1 や Tat2 分解の原因と考えられるのだが、Rsp5 による認識機構は相違するらしい。最近私たちは、高圧下で Tat1 を安定化する変異や、トリプトファン濃度依存的な分解パターンを変化させる Tat2 の変異を見いだしている。また、ペプチド輸送体 Ptr2 についても細胞質末端のユビキチン化部位を決定し、分解機構について調べている。そこで本発表では、アミノ酸やペプチド輸送体の“品質”である基質輸送活性と輸送体自身の“ユビキチン化”がどのような関係にあるのか、私たちの成果を交えて研究の動向と今後の展開についてお話ししたい。

Tryptophan permease Tat1 and Tat2, Ubiquitin ligase Rsp5, Quality control

講演番号：4SY17-2
講演日時、会場：3 月 29 日 14:00～ D 校舎 25 会場

ユビキチンコードの全容解明を目指して

Quantitative proteomic analysis of ubiquitin code in yeast

○佐伯 泰（都医学研）
○Yasushi Saeki (TMIMS)

ユビキチンによるタンパク質の翻訳後修飾は、タンパク質分解のみならず、シグナル伝達や DNA 修復、タンパク質の輸送など広汎な生命機能を制御することが明らかになってきた。ユビキチンが多彩な機能を発揮することを可能にしているのがユビキチン修飾の構造多様性とユビキチン結合タンパク質の多様性である。ユビキチン修飾にはモノユビキチン化と 8 種類の異なるポリユビキチン鎖、混合鎖、分岐鎖が存在し、さらに鎖長も機能に重要であるため、ユビキチン修飾に内包された膨大な情報はユビキチンコードと呼称されるに至っている。しかしながら、ユビキチン修飾のどの要素（種類、長さ、複雑さ）がユビキチンシグナル発動の決定要素なのか、ユビキチン結合タンパク質（ヒトでは約 100 種類、酵母では約 20 種類存在）が細胞内でどのように使い分けられているのか、その全貌は未だ不明である。我々は細胞内のユビキチン修飾を内在性レベルで解析するため、高分解能質量分析計によるユビキチン鎖の超高感度絶対定量法（Ub-PRM:Ubiquitin-Parallel Reaction Monitoring）を確立した。Ub-PRM 法は 50 アトモルから 8 種類のユビキチン鎖を絶対定量することが可能であり、これにより細胞内で生じる極微量のユビキチンシグナルを検出・定量することが可能となった。一方、ポリユビキチン鎖に対する高親和性プローブとトリプシンによる部分消化を組み合わせることで、ユビキチン化基質のポリユビキチン鎖長を決定する新手法（Ub-ProT: Ubiquitin chain-protection from trypsinization）を開発した。Ub-ProT と Ub-PRM を組み合わせることで、細胞内のユビキチン化基質の平均鎖長と種類を解析したところ、ユビキチン鎖の種類によって平均鎖長が異なることが明らかとなった。現在、プロテアソーム分解、エンドサイトーシス、MVBs へのタンパク質輸送、オートファジーに関連する主要なユビキチン結合タンパク質について細胞内で相互作用するユビキチン鎖を網羅的に解析しており、これによりユビキチンシグナル発動の機構が明らかにできると考えている。

Proteolysis, Ubiquitin, Quantitative proteomics

講演番号：4SY17-3
講演日時、会場：3 月 29 日 14:25～ D 校舎 25 会場

細胞創傷治癒におけるユビキチンの役割

A role for ubiquitin in cellular wound-healing

○河野 恵子、温 欣宜、中西 真（名市大院医）
○Keiko Kono, Hsin-I Wen, Makoto Nakanishi (Nagoya City Univ.)

この世に最初の細胞が生まれた時、そこには遺伝情報をコードする核酸と、それを包み込む膜があったという。そうであれば、膜に与えられた損傷を修復する「細胞創傷治癒」の仕組みは、地球上に生命が誕生したその瞬間から必要とされたであろう。ウニやヒトデ、あるいは哺乳類の培養細胞を用いたこれまでの細胞創傷治癒研究によって、細胞膜が損傷を受けると傷の周りにアクチンや微小管、Rho 型 GTPase などが集まり、細胞質分裂とよく似た仕組みで修復されること、この機構に欠損があるとデュシェンヌ型筋ジストロフィー症を発症することなどが明らかになっているが、分子機構の全貌を俯瞰するには至っていない。その一因は、細胞創傷治癒に関与する因子の網羅的同定が未だなされていないことである。

科学史上にいくつも例があるように、ある現象に関与する因子を網羅的に同定するには酵母が極めて強力なツールとなり得る。そこで本研究では出芽酵母の強力な遺伝学を背景に、ポストゲノム時代のツールを駆使して、細胞創傷治癒に関与する因子の同定を試みた。

まず、出芽酵母にも他の真核生物と類似した、局所的な損傷を修復する機構が存在するかどうかを検討するために、細胞表層の微細な領域にレーザーで損傷を与え、ライブセルイメージングでタンパク質の局在変化を観察するレーザーダメージ実験系を確立した。この実験により出芽酵母細胞にも高等真核細胞と同様の細胞創傷治癒機構が存在することを示した。さらに娘細胞への細胞極性と傷への細胞極性は競合しており、娘細胞に局在する極性制御タンパク質がプロテアソームにより分解されることが細胞創傷治癒機構の開始に必要であることを明らかにした。また細胞創傷治癒に必要な遺伝子をスクリーニングし、細胞表層の傷に応答して細胞周期を停止させる「細胞創傷治癒チェックポイント」を見出した。そこで今回の発表ではスクリーニングヒットのうちユビキチンやプロテアソームの制御に関わる遺伝子に着目し、細胞創傷治癒におけるユビキチンの機能について議論する。

cellular wound-healing, yeast, checkpoint

講演番号：4SY17-4
講演日時、会場：3 月 29 日 14:50～ D 校舎 25 会場

Ubr ユビキチンリガーゼによる生理機能の制御
Regulation of various physiological processes by Ubr ubiquitin ligases in fission yeast

○北村 憲司、藤本 菜奈（広島大自然科学研セ）
○Kenji Kitamura, Nana Fujimoto (Hiroshima Univ.)

Ubr 蛋白質は真核生物に保存されたユビキチンリガーゼで、一部の Ubr 蛋白質は、基質蛋白質のN末端アミノ酸の違いで安定性が変わる「N-end rule」の分子基盤を担っている。ヒト Ubr1 の機能欠損が Johanson-Blizzard 病の原因である事が示されているが、相同遺伝子をノックアウトした酵母、マウス、植物で幅広い現象に様々な欠損形質が生じる他、N-end rule 蛋白質分解はヒトの細胞死関連蛋白質量の制御やショウジョウバエでの apoptosis、植物病原菌の感染にも関与している。

分裂酵母 *S. pombe* の Ubr1 と Ubr11 について生理機能を調べている。両者とも生育に必須ではないが機能は重複せず、*ubr1* 欠損株では N-end rule 蛋白質分解は正常に起こるが、細胞質分裂不全、減数分裂異常、一部の炭素源利用不能などを示す。更に、酸化ストレス応答や薬剤耐性能が亢進しており、その原因が bZIP 型転写因子の Pap1 にある事がわかった。Pap1 は酸化ストレス応答や薬剤耐性に必要で、非ストレス時には主に細胞質に存在するが、核と細胞質を常にシャトルしており、酸化ストレス時には核外移行が阻害されて核内に蓄積し、ストレス応答に必要な遺伝子群の転写を活性化する。Pap1 は Ubr1 に依存して核内でより速く分解されており、*ubr1* 株では Pap1 蛋白質量が増えていた。また、Pap1 の核局在が持続する条件では、細胞の生存に Ubr1 の機能が必須だった。低酸素応答を司る転写因子 Sre1 の分解に Ubr1 が必要との報告もある。ストレス対応後の転写因子活性化の持続は細胞にかえって悪影響を及ぼし得るため、Ubr1 は不必要になった活性型 Pap1 や Sre1 の分解を促進し、酸素レベル応答後のホメオスタシス維持と細胞の生存を保証しているらしい。

多様な形質の *ubr1* 株とは異なり、*ubr11* 欠損株の生育は正常だが、蛋白質合成や細胞膜のエルゴステロール合成の阻害剤の一部に弱耐性を示す事、ペプチド輸送体の発現不全のために環境中のオリゴペプチドを取込めない事がわかった。N-end rule 蛋白質分解との関連はまだ不明だが、ペプチド利用能が回復した抑圧変異株の解析から、*ubr11* 株のペプチド利用不能は、Upa1 蛋白質量の増加に起因する事がわかった。DNA 結合ドメインを持つ Upa1 はペプチド輸送体遺伝子の発現を抑制しており、Ubr11 は Upa1 を分解する事で細胞外のオリゴペプチド利用を可能にしている。興味深い事に、アミノ酸要求性株を持つ *ubr11* や *upa1* 変異株では、合成培地での生育速度が違うなど、Ubr11-Upa1 はアミノ酸の利用にも影響している。*S. cerevisiae* や *C. albicans* が持つ細胞外アミノ酸センサー（SPS 複合体）が存在しない *S. pombe* では、Ubr11-Upa1 システムが細胞外ペプチドやアミノ酸の存在を細胞応答へ連携するハブとしての役割も担っているかもしれない。

ubiquitin ligase, S. pombe, Ubr protein

講演番号：4SY17-5
講演日時、会場：3 月 29 日 15:15～ D 校舎 25 会場

酵母ユビキチンリガーゼ Rsp5 変異株のストレス感受性を利用した新規生理活性物質の探索

Exploration of novel bioactive compounds affecting stress sensitivity of a yeast ubiquitin ligase Rsp5 mutant

木村 賢一[1,2]、○渡辺 大輔[3]、渡部 涼[1]、上杉 祥太[2]、高木 博史[3]（[1]岩手大院・農、[2]岩手大院・連合農、[3]奈良先端大・バイオ）

Ken-ichi Kimura[1,2], ○Daisuke Watanabe[3], Ryo Watanabe[1], Shota Uesugi[2], Hiroshi Takagi[3] ([1]Grad. Sch. Agric., Iwate Univ., [2]United Grad. Sch. Agric. Sci., Iwate Univ., [3]Grad. Sch. Biol. Sci., NAIST)

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* に存在する 5 種の HECT 型ユビキチンリガーゼのうち、ヒト Nedd4 のホモログである Rsp5 は唯一生育に必須であり、異常タンパク質の分解やストレス応答タンパク質の調節など、様々な細胞内イベントに関して重要な役割を有している。Rsp5 の基質タンパク質認識に関与する WW3 ドメイン内にアミノ酸置換が入った機能欠損変異株（*rsp5*^{A401E} 株）は、高温やアミノ酸アナログなど、種々のストレスに対して野生株よりも高い感受性を示すため [1)]、その機能欠損を相補できる物質は有用な生物活性を有することが期待できる。本研究では、*rsp5*^{A401E} 株が感受性を示す高温とプロリンアナログ L-azetidine-2-carboxylic acid（AZC）のストレスを用いて、その生育阻害を相補する物質のスクリーニング系を開発し、得られる物質とその生物活性に関する比較を行った。

各標準阻害剤（324 種）の生育回復活性を評価した結果、高温ストレスでは FK506、cyclosporin A など calcineurin の阻害物質が生育回復活性を示したため、その活性を指標に calcineurin 阻害剤が探索できることが示された。これらの物質は高温ストレスによる calcineurin 活性化を阻害することで、ストレス応答転写因子 Msn2 の分解を抑制し、ストレス耐性を付与するものと考えられる。また、実際に生育回復活性を指標として、calcineurin 阻害活性を有する pimaric acid 及び dehydroabietic acid を単離できたため、本スクリーニング系が新規 calcineurin 阻害剤の探索に有効であることが判明した [2)]。

一方、AZC ストレスでは antimycin A、myxothiazol、並びに農薬として市販されている trifloxystrobin、orysastrobin など、電子伝達系複合体 III（複合体 III）を阻害する物質が生育回復活性を示したため、その活性を指標に複合体 III 阻害剤が探索できる可能性が示唆された。AZC は、酵母においてストレス応答転写因子 Hsf1 を介して細胞周期を G1 期で停止させることが知られており、*HSF1* 遺伝子の過剰発現株では antimycin A の生育回復活性が見られなかった。同様に、ヒトにおいて calcineurin が Hsf1 の活性を抑制することが報告されているが、その調節サブユニットである Cnb1 の遺伝子破壊により antimycin A の活性が著しく低下したことから、この生育回復活性への複合体 III、Hsf1、calcineurin の関与が示唆された。以上の結果により、同じ Rsp5 変異株に高温と AZC という異なるストレスを誘導することで、異なる標的を有する活性物質の探索に利用できることが示された。

【参考文献】

1) C. Hoshikawa *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 11505-11510 (2003).

2) S. Uesugi *et al.*, *FEMS Yeast Res.*, **14**, 567-574 (2014).

Rsp5, calcineurin inhibitor, complex III inhibitor

講演番号：4SY17-6
講演日時、会場：3 月 29 日 15:40～ D 校舎 25 会場

ストレス下のタンパク質品質管理に関与する酵母ユビキチンリガーゼ Rsp5 の機能解析と産業利用
Functional analysis and its industrial application of the yeast ubiquitin ligase Rsp5 involved in protein quality control under stress conditions

○高木 博史（奈良先端大バイオ）
○Hiroshi Takagi (Nara Inst. Sci. Tech.)

真核生物のタンパク質品質管理に関わるユビキチン（Ub）システムにおいて、Ub リガーゼは標的タンパク質に結合し、Ub を連結する酵素である。Ub リガーゼの重要な機能である基質の選択的 Ub 化には、基質側の制御として翻訳後修飾（リン酸化、N 型糖鎖付加、酸化、複合体化など）が知られている。また、基質のコンフォメーションを識別し、ストレスによりミスフォールド化・アンフォールド化した異常タンパク質だけを認識し、Ub 化する機構が考えられているが、詳細は不明である。Rsp5 は酵母 *Saccharomyces cerevisiae* に 5 つ存在する HECT 型 Ub リガーゼの中で、唯一生育に必須の酵素である。我々はこれまでに Rsp5 がストレスにより生成する異常タンパク質の処理（修復および分解）に関与していることを明らかにした [1)-3)]。また、Rsp5 の過剰発現により細胞のストレス耐性が向上することも報告している [4), 5)]。今回、Rsp5 のストレス下における機能に関する最新の知見を紹介するとともに、Rsp5 の高機能化に基づく産業酵母の育種への応用について議論する。

我々はエタノール存在下で細胞膜上のアミノ酸パーミアーゼ Gap1 が Rsp5 のアダプタータンパク質 Bul1/2 非依存的にエンドサイトーシスされることを見出した [6)]。また、エタノール存在下で Gap1 のアミノ酸取込み活性は顕著に低下し、Rsp5 によって Ub 化されることが判明した。興味深いことに、アンモニウムイオンの添加に伴う Ub 化とは異なるパターンの Ub 化も観察された。以上の結果から、Rsp5 による Bul1/2 非依存的な細胞膜タンパク質の品質管理機構の存在が強く示唆された。

さらに、基質タンパク質の認識に関与する WW ドメイン内にランダム変異を導入し、パーキンソン病など神経変性疾患の原因タンパク質として知られるヒト α-シヌクレインの過剰発現による毒性を軽減する Rsp5 の変異体を複数取得した [7)]。特に、Pro343Ser 変異体では α-シヌクレインの Ub 化を介した分解が促進されていた。一方、Thr255Ala 変異体は α-シヌクレインの分解には影響を及ぼさなかったが、細胞の酢酸耐性を向上させ、酢酸存在下でのエタノール発酵が改善された。Hog1 MAP キナーゼ経路に影響を及ぼす可能性も示唆され、現在詳細な解析を進めている。以上の結果から、Rsp5 の WW ドメインが異常タンパク質認識の特異性・多様性を生み出すことで、酵母は様々な環境ストレスに対する適応能力を獲得すると考えられる。

1) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 11505, 2003. 2) *Genes to Cells*, **13**, 105, 2008. 3) *FEBS J.*, **276**, 5287, 2009. 4) *Biosci. Biotech. Biochem.*, **70**, 2762, 2006. 5) *J. Brew. Distill.*, **3**, 1, 2012. 6) *Eukaryot. Cell*, **13**, 1191, 2014. 7) *J. Biochem.*, 10.1093/jb/mvu069 (in press).

yeast, ubiquitin ligase Rsp5, stress tolerance

講演番号：4SY18-1
講演日時、会場：3 月 29 日 9:05～ A 校舎 36 会場

植物は理想のバイオリアクター

Plants are ideal bioreactor.

○新名 惇彦 (奈良先端大)
○Atsuhiko Shinmyo (NAIST)

植物は理想のバイオリアクター、物質生産工場である。物作りの原料は二酸化炭素、無機物と水で、動力源は太陽光である。生産される有機物は食糧，飼料，工業原料，生理活性物質，医薬品と多岐にわたり人類はじめ動物の生命を支えている。酸素も生産物の一つである。何をどれだけ作るかは、導入する遺伝子群と発現制御システムの導入により操作可能である。工場の立地条件が悪ければ、ストレス耐性遺伝子の導入により解決できる。そしてこの工場は生分解性なので、稼動が終われば自然界に戻る。

2013 年 9 月に出された IPCC（気候変動に関する政府間パネル）の第 5 次評価報告書によれば、CO_2 排出量と世界の平均気温の上昇量はほぼ比例し、2100 年には地球の平均気温は最大 4.8℃、海面水位は 82cm 上昇すると予測している。その結果、世界の穀物生産量は今後 10 年毎に最大 2%ずつ減少し、海面上昇による土地の消失などの経済損失は年間 148 兆円に達すると言う。早急に化石燃料からの CO_2 排出削減が求められ、再生可能エネルギー利用が活発になりつつあるが南北問題も絡み容易ではない。一方、北米でのシェールガスの開発利用拡大、わが国ではメタンハイドレート探索など、経済優先が先行し、化石資源の利用に拍車がかかり、このままでは CO_2 削減はおぼつかない。

現在、大気の CO_2 濃度は約 400ppm で、炭素換算では 7,000 億ﾄﾝである。ところが地球上の陸地の植物が蓄えている炭素は 2 兆 1,500 億ﾄﾝと 3 倍あり、その 90%は樹木である。したがって、樹木量を 1%増やせば大気の CO_2 は 3%減少することになる。樹木を 8%増やせば、大気の CO_2 が 400ppm から 500ppm に 25%増えるのを全て吸収できる。8%といえども地球全体の話であり容易ではないが、2100 年の子孫のために我々が果たすべき責務であろう。大規模植林の重要性は言うまでもないが、乾燥地、酸性・アルカリ性土壌、塩類集積地などの不良環境下で育つ樹木の分子育種は地球温暖化防止に極めて重要である。単に植林で CO_2 を削減するだけでなく、糖質、油脂やタンパク質の増産、機能性成分・医薬品など高付加価値物質の樹木での生産など、経済効果が伴えば現実味が増すだろう。

global warming, large scale plantation, molecular breeding

講演番号：4SY18-2
講演日時、会場：3 月 29 日 9:30～ A 校舎 36 会場

植物細胞壁の構造と機能
Structure and function of plant cell walls
○西谷 和彦（東北大生命科学）
○Kazuhiko Nishitani (Tohoku Univ.)

植物細胞壁研究が今注目されている理由は二つある。一つは、それがバイオマス（生物現存量）の 80%を占め、地球上で最も豊富な循環型炭素資源であり、その利用次第によっては持続的な炭素循環型社会の構築が原理的に可能であるためである。陸上の生物圏には炭素換算で 600 Gt のバイオマスが森林や耕地を中心にストックされている。炭素のフローとして観た場合、光合成により年間 60 Gt の炭素がバイオマスとして固定され、同時にそれに匹敵する量が最終的に微生物や動物により分解され、二酸化炭素となり大気に戻る。一方、我々人類が一年間に利用しているバイオマスは、燃料用の木材や食料など全て含めて 1.4 Gt である。これを多いと見るか、少ないと見るかは見解により異なるが、バイオマスの 97 %以上が人類には利用されずに、主に微生物により分解され、二酸化炭素として大気中に放出されているのは事実であり、植物細胞壁利用のための次世代型の技術革新が、農芸化学だけでなく、環境科学やエネルギー工学などの視点から進められている。

もう一つの理由は、植物細胞壁が、単に細胞の形を決め、陸上で組織や器官を支える機能だけでなく、様々な陸上環境への適応や、生体防御、生物間の相互作用など、予想されていた以上に高度な情報処理機能を担う細胞外のインテリジェントシステムであることが明らかになって来たことである。

これらの点で植物細胞壁は、資源科学の視点からも、基礎科学の視点からも重要な、特異な研究対象である。

そこで、このシンポジウムでは、まず、バイオマスである植物細胞壁の主要成分であるセルロースやリグニンを構築する仕組みについて、最新の知見を概観した後、基礎科学の視点から、植物細胞壁が情報処理システムとしての機能を発揮する上での基盤となる細胞壁マトリックスの高次構造の構築や再編に関わる分子機能について述べることにする。すなわち、（１）セルロース微繊維間の架橋としてはたらくキシログルカンのつなぎ換え反応と分解を触媒する酵素ファミリーであるエンド型キシログルカン転移酵素/加水分解酵素（XTH）の機能、（２）細胞壁のセルロース微繊維間を充填する高分子であるペクチンの高次構造を制御するメチルエステラーゼ（PME）ファミリーの機能について、更に（３）イネ科植物に固有のマトリックス多糖であるβ-1,3/1,4-グルカン(MLG)と、イネ科の細胞壁に多量に蓄積し細胞壁の強度や病害抵抗性に関わるとされるケイ素について、両者の相互作用および、生理機能に焦点を当てた最近の研究について紹介する。

plant cell wall, xyloglucanendotransglucosylase/hydrolase, pectinmethylesterase

講演番号：4SY18-3
講演日時、会場：3 月 29 日 9:55～ A 校舎 36 会場

アラビノガラクタンタンパク質糖鎖の人為的操作に向けた新たな試み

A new approach toward the artificial manipulation of polysaccharide of arabinogalactan protein

○田中 伸和[1]、小竹 敬久[2] ([1]広島大自然セ、[2]埼玉大院理工)
○Nobukazu TANAKA[1], Toshihisa KOTAKE[2] ([1]Hiroshima Univ., [2]Saitama Univ.)

アラビノガラクタンタンパク質（AGP）は植物特有のプロテオグリカンで、植物の成長や発生において多様なプロセスに関わっていることが知られている。GPI アンカーで細胞表層に係留される AGP には、β-1,3-ガラクタン主鎖に β-1,6-ガラクタン側鎖が結合した非常に複雑な II 型アラビノガラクタン（II-AG）糖鎖が付加されている。AGP 分子量の 90%以上を占める AG 糖鎖が分子機能に必須であることは間違いないが、糖鎖構造と分子機能との相関を明らかにするためには AGP 糖鎖の人為的な改変手法の確立が求められる。

我々は、ヒト UDP-ガラクトース輸送体（hUGT1）遺伝子を導入したタバコ植物体では生育促進、木部拡大、細胞壁肥厚などの興味深い表現型を示すことを見出した。HPLC による細胞壁マトリックス多糖類の糖組成の解析から、これらの多糖類では高ガラクトシル化が生じていることが明らかになった。また、AGP 糖鎖も同様に高ガラクトシル化されており、Yariv 試薬による解析から AGP 糖鎖量の増大が明らかになった。*hUGT1* 形質転換タバコ培養細胞 BY-2 の培養実験からも、細胞及び培地中の AGP 糖鎖量の増大が認められた。AGP 糖鎖を含む細胞壁マトリックス多糖類はゴルジ装置の内腔で合成され、細胞外に輸送される。UGT はゴルジ膜に局在し、UDP-ガラクトースを細胞質からゴルジ内腔に送り込むため、外来 UGT の発現によって輸送量が増加すれば UDP-ガラクトースが過剰となり、AGP 糖鎖の高ガラクトシル化が生じるものと思われる。また、AGP 糖鎖の高ガラクトシル化によって生育促進、木部拡大、細胞壁肥厚が起こることは、AGP 糖鎖改変がバイオマス増加を目指した植物改良の場面において新たな突破口を開くことを予感させる。

一方、カビやキノコを始めとする様々な生物から AG 糖鎖特異的分解酵素遺伝子が単離されており、これらの遺伝子を植物に導入すると AGP 糖鎖の特定構造を分解できる。我々はこれらのうち β-1,3-ガラクタンを特異的に分解する酵素遺伝子が発現するタバコを作製したところ、著しい生育阻害が見られた。これは、AGP の糖鎖部分が植物の生育において重要であることを示すものである。

以上のことから、我々は AGP 糖鎖を自在に増大あるいは減少できるヒントを得た。すなわち、UGT を中心に、UDP-ガラクトース合成能と糖転移能を順次増強をすれば AGP 糖鎖を任意に増大できる。一方、AG 糖鎖特異的分解酵素を単独あるいは組み合わせて植物で発現させることで、AGP 糖鎖の特定構造が分解できる。現在、これらの AGP 糖鎖合成及び分解に関わる酵素遺伝子の導入による AGP 糖鎖の人為的な改変手法の確立に挑んでいる。

arabinogalactan protein, polysaccharide manipulation, molecular function

講演番号：4SY18-4
講演日時、会場：3 月 29 日 10:20～ A 校舎 36 会場

高等植物における膜結合型ポリガラクツロナーゼの酵素学的特性解析

Enzymatic characterization of membrane-bound polygalacturonase from higher plant

○大橋 貴生、ムスタファ ナビラー サリ、松下 宗義、三崎 亮、藤山 和仁（大阪大・生物工学国際交流センター）
○Takao Ohashi, Nabilah Sari Mustafa, Muneyoshi Matsushita, Ryo Misaki, Kazuhito Fujiyama (ICBiotech, Osaka Univ.)

ペクチンは植物細胞壁多糖の主要構成成分の一つであり、ガラクツロン酸を多量に含有した酸性複合多糖である。その中でもペクチンはその物性（Ca^{2+}を介したゲル化能）やその局在性（マトリックス多糖としてセルロース微小繊維間を埋めている）のため、その都度微細な化学構造を変換することにより、植物の生長・分化、細胞間接着、細胞壁多孔性の調節、細胞伸長等、多様な機能を有することが知られている。

ペクチンの主骨格はガラクツロン酸が直鎖状にα1,4 結合で重合したポリガラクツロン酸であり、加水分解する酵素としてペクチナーゼの一種であるポリガラクツロナーゼが知られている。ポリガラクツロナーゼは植物から微生物まで広く存在しており、巨大なタンパク質ファミリーを形成している。系統樹解析によると、ポリガラクツロナーゼは A から F の 6 つのクレードに分類され（1）、高等植物ではトマト果実などの成熟に関与する細胞壁分泌型のポリガラクツロナーゼがクレード A に分類されている。一方、モデル高等植物であるシロイヌナズナにおいても、ゲノム配列上に 66 種類のポリガラクツロナーゼの存在が予測されており、クレード B および C に属する一部のポリガラクツロナーゼにおいて細胞壁分泌型として花や葉の器官脱離、および葯の裂開による花粉の飛散に関与することが明らかにされている（2）。しかし、その他のクレードに属するポリガラクツロナーゼの機能は不明で、その酵素活性を有しているかどうかも明らかではない。そこで、我々は特に未解明であるクレード D、E および F に属するポリガラクツロナーゼの酵素学的特性とペクチン分解を通した生理的役割について興味を持ち、研究を進めている。

シロイヌナズナで予測されているポリガラクツロナーゼのアミノ酸配列を元に、網羅的に膜貫通領域の有無を調べてみると、複数のポリガラクツロナーゼにおいて、1 回膜貫通領域の存在が予測された。過去に報告されているポリガラクツロナーゼは全て分泌型の可溶性タンパク質であり、膜タンパク質として存在するポリガラクツロナーゼの報告は無い。これらの推定膜結合型ポリガラクツロナーゼをクローニングし、全長 cDNA を分裂酵母で異種発現させた。本発表では酵素学的特性とシロイヌナズナノックアウト変異体の表現型解析の結果を合わせて、膜結合型ポリガラクツロナーゼの機能について議論したい。

参考文献
（1）Torki *et al.*, Gene, 242, 427-436 (2000)、（2）Sénéchal *et al.*, J Ext Bot, 65, 5125 (2014)

Arabidopsis thaliana, Pectin, Polygalacturonase

講演番号：4SY18-5
講演日時、会場：3 月 29 日 10:45～ A 校舎 36 会場

遊離 *N*-グリカンの生理機能解析: ENGase と PNGase の発現を制御した植物体の構築

Physiological funciton of free *N*-glycans: Construction of transgenic plants, in which the expression of ENGase and PNGase genes are regulated.

○前田 恵、木村 吉伸（岡山大学大学院環境生命科学研究科）
○Megumi Maeda, Yoshinobu Kimura (Graduate School of Environmental and Life Science, Okayama University.)

分化生長中の植物組織（胚軸，種子，果実）には，糖タンパク質や糖ペプチドから切り離された遊離型のアスパラギン結合型糖鎖（遊離 *N*-グリカン，FNGs）がμM 濃度で遍在する。FNGs は植物の生長を制御するシグナル分子として機能する可能性が提唱されているが，未だ証明されていない。演者らは，FNGs の生理機能解明と応用利用を目的として，(1) 植物 FNGs の構造特性解析，(2) FNGs 生成に関わる酵素（エンド-β-*N*-アセチルグルコサミニダーゼ（ENGase），ペプチド: *N*-グリカナーゼ（PNGase））の機能解析，遺伝子発現制御植物体の構築，(3) FNGs 分解に関わるグリコシダーゼ群の機能解析，遺伝子同定を進めてきている。植物 FNGs は，還元末端に *N*-アセチルグルコサミン（GlcNAc）を 1 残基有する GN1 型構造とキトビオースユニットを有する GN2 型構造に分類される。GN1-FNGs の殆どを占めるハイマンノース型 FNG（HM-GN1）は，ER 中でミスフォールドした新生糖タンパク質が細胞質へ逆輸送されプロテアソーム分解を受けるに先立ち, 細胞質 PNGase（cPNGase）と ENGase の協奏作用により生成する。一方，GN2-FNGs は，成熟糖タンパク質が液胞や細胞外領域に分泌され，機能を終えた後の分解に際して，酸性 PNGase（aPNGase）により糖ペプチドから生成する。GN2-FNGs には HM-GN2 と植物コンプレックス型（PC-GN2）が存在するが，存在割合は PC-GN2 の方が高い。

本シンポジウムでは，これら FNGs の植物生長・分化に関わる生理機能解明を目的として，FNGs 生成に直接関係する ENGase および PNGase に焦点を当て, それらの発現を制御した植物体（*A. thaliana*, トマト）を作製し，それらに生じる（1）FNGs の構造特性，（2）FNGs 遊離酵素の活性変動と局在，（3）組換え植物の形態変化について報告する。ENGase（細胞質の小胞体近傍に局在）をノックアウト（KO）した *A. thaliana* は表現型に目立った変化は認められず, 生成する FNGs は殆ど全てが HM-GN2 構造を有する。一方，cPNGase KO 株では HM-GN1 が生成することから，cPNGase と ENGase は協奏作用で FNGs 生成を保証していることが明らかとなった。一方，トマト果実に発現する aPNGase-Le は液胞中に発現していることを確認し，本酵素を過剰発現させたトマト（Micro-Tom）を構築した。野生株に比べてこの過剰発現体では PC-GN2 が増加することを，新たに確立した PC-FNGs 解析法により確認した。興味深いことに，過剰発現体ではヘミセルロース由来と予想される中性糖も顕著に増加しており，PC-GN2 の増加が細胞壁代謝関連酵素遺伝子の発現亢進とリンクしている可能性が推察された。現在，aPNGase 遺伝子を全て KO した *A. thaliana* の構築を進めている。

free *N*-glycans, ENGase, PNGase

講演番号：4SY18-6
講演日時、会場：3 月 29 日 11:10～ A 校舎 36 会場

植物細胞壁多糖合成に関わる糖転移酵素の連携
Cooperation of glycosyltransferases involved in biosynthesis of plant cell wall polysaccharides
○石水 毅[1]、上原 洋平[1]、田村 峻佑[1]、鶴浜 和奈[1]、加藤 大詞[1]、高田 和拓[1]、出村 拓[2]、中野 仁美[2]、大谷 美沙都[2] ([1]立命館大生命、[2]奈良先端大バイオ)
○Takeshi Ishimizu[1], Yohei Uehara[1], Syunsuke Tamura[1], Kana Tsuruhama[1], Hirotsugu Kato[1], Kazuhiro Takada[1], Taku Demura[2], Yoshimi Nakano[2], Misato Ohtani[2] ([1]Ritsumeikan Univ., [2]NAIST)

植物細胞壁を構成する多糖は、セルロースの他に、ヘミセルロースやペクチンがある。これらの多糖は、さまざまな単糖成分により構成され、非常に複雑な構造をしている。これらの多糖の資源量は多く、エネルギー源として利活用することが期待されている。このため、現在、ヘミセルロースやペクチンの生合成の分子機構の解明研究が進められている。これらの細胞壁多糖の生合成には、複数の糖転移酵素が関わり、これらの酵素遺伝子が同定されつつある。多糖の構造が複雑であるにも関わらず、植物間で多糖の構造が高度に保存されているため、一定の生合成分子機構があると考えられている。しかし、これらの酵素の連携や生化学反応の詳細な経路に関する情報は少ない。これらの酵素が解析しにくい膜タンパク質であることや、これらの酵素がゴルジ体に局在する発現量の少ないタンパク質であることが理由である。

これまでにゴルジ体局在の膜タンパク質複合体が解析された例がない。また、細胞壁多糖の生合成に関わる酵素の連携反応解析も行われていない。そこで本研究では、植物ゴルジ体局在タンパク質を濃縮し、ゴルジ体局在タンパク質複合体を検出することを試みた。いくつかのタンパク質複合体の検出を行ったことを報告する。また、ヘミセルロースのキシラン、ペクチンのラムノガラクツロナン I の生合成に関わる糖転移酵素を対象に生化学的解析法を立ち上げた。複数の糖転移酵素の連携を生化学的に解析した結果についても示し、議論の対象としたい。

Pectin, Xylan, Glycosyltransferase

講演番号：4SY19-1
講演日時、会場：3 月 29 日 13:30～ F 校舎 11 会場

農業・食品研究のための NMR メタボロミクス

Applications of NMR-based metabolomics in agriculture and food research

○関山 恭代[1]、冨田 理[1]、根本 直[2]、池田 成志[3] ([1](独）農研機構・食総研、[2]（独）産総研・バイオメディカル、[3]（独）農研機構・北農研)
○Yasuyo Sekiyama[1], Satoru Tomita[1], Tadashi Nemoto[2], Seishi Ikeda[3] ([1]NFRI, NARO, [2]AIST, [3]NARO HARC)

メタボロミクスは、外観的な表現型として現れない生体内の変化を代謝物の変化として可視化し、遺伝解析だけでは予測が困難な生体反応を明らかにできる可能性があるため、ポストゲノムサイエンスの有望技術と見なされている。近年ではモデル生物の解析のみならず、農業・食品研究分野でも応用が試みられており、今後そのニーズはさらに高まると考えられる。我々は、育種・栽培現場からのニーズを踏まえた病害抵抗性品種・系統の識別法の開発や、農産物およびその加工品の多面的品質評価法の開発を検討している。我々が実施するNMRメタボロミクスでは、質量分析と比べて検出感度の低さが問題となる一方、1) 果汁などの代謝混合物を分離せずにそのまま計測できるため、試料の前処理が容易である、2)分析システムを汚染せず、得られるスペクトルの再現性も高いため多検体試料について”当たり”をつけるための一次スクリーニングに適している（しかもこの段階では、膨大なエネルギーを要する代謝物同定が必ずしも必要ではない）、3)化学構造の情報が得られるため、データベースに収録されていない未同定代謝物について構造解析が行える、などの利点がある。本講演では、NMRメタボロミクスをジャガイモ疫病抵抗性品種・系統の解析および国産・外国産リンゴの評価に適用した例について紹介し、今後の展望について議論したい。

(1) ジャガイモ疫病抵抗性関連代謝マーカーの探索

ジャガイモ疫病について、近年では圃場抵抗性に着目した育種が進められているが、実験室内の接種試験では期待通りの圃場抵抗性を検出できない場合があり、無防除栽培圃場等での検定は多くの時間と労力を要する、などの問題があった。そこで、ジャガイモ疫病抵抗性の判別のための新たな指標を探るべく、NMRメタボロミクスにより抵抗性関連代謝マーカーの探索を行った例を紹介する[1]。

(2) 産地の異なるリンゴを特徴づける潜在的因子の探索

食品試料の様に特定の成分含量が多い試料では、その成分プロファイルが数種類の主要成分によって支配され、各試料を特徴づける微量成分の情報がマスクされるという問題がしばしば見られる。そこで青森県産および外ニュージーランド産のリンゴを対象とし、主要成分に該当する変数を上位から順に削除していく変数削除法[2]を検討し、産地を特徴付ける潜在的因子を同定した例を紹介する[3]。

参考
[1] 関山ら、特開 2014-3909
[2] Nemoto et al., J. Toxicol. Sci, 2007.
[3] Tomita et al., Food Chemistry 2015.

NMR, non-targeted multistep metabolic profiling, agriculture and food research

講演番号：4SY19-2
講演日時、会場：3 月 29 日 14:00～ F 校舎 11 会場

LC-MS による大規模コホートメタボローム解析
Cohort metabolomics by LC-MS

○三枝 大輔[1,2]、加藤 恭丈[1,2]、小柴 生造[1]、元池 育子[1,3]、荻島 創一[1,2]、本橋 ほづみ[1,4]、菅原 準一[1,2]、中谷 純[1,2]、寶澤 篤[1,2]、峯岸 直子[1,2]、木下 賢吾[1,3]、田邉 修[1]、山本 雅之[1,2] ([1]東北大メガバンク、[2]東北大医、[3]東北大情報、[4]東北大加齢研)
○Daisuke Saigusa[1,2], Yasutake Kato[1,2], Seizou Koshiba[1], Ikuko Motoike[1,3], Souichi Ogishima[1,2], Hozumi Motohashi[1,4], Jyunichi Sugawara[1,2], Jyun Nakaya[1,2], Atsushi Houzawa[1,2], Naoko Minegishi[1,2], Kengo Kinoshita[1,3], Osamu Tanabe[1], Masayuki Yamamoto[1,2] ([1]Tohoku Univ. ToMMo, [2]Tohoku Univ. Sch. Med., [3]Tohoku Univ. GSIS, [4]Tohoku Univ. IDAC)

次世代医療では、個別化された疾患リスク判定に基づく予防、早期発見、早期治療が求められており、新たな疾患予防マーカーの発見と、その臨床応用が期待されている。疾患予防マーカー探索においては、ゲノムと環境要因とにより形成される個人の表現型を、量的形質として記述・定義しうる代謝物の解析、すなわちメタボローム解析が有効な手段の一つであると考えられている。しかしながら、大規模コホート検体のメタボローム解析を実施する為には、検体に含まれる代謝物の安定性、個人内の日内・日間変動、測定結果の情報解析に至まで、多くの課題が残されている。

ところで、東北メディカル・メガバンク機構では、震災被災地を対象としたゲノムコホート事業とバイオバンク事業を推進しており、事業の一環としてコホート検体のメタボローム解析を実施している。メタボローム解析における基盤技術は、古くから核磁気共鳴（NMR）及び質量分析計（MS）が用いられている。NMR は多種の極性低分子化合物のハイスループット定量解析に向いているが、構造の複雑なリン脂質分子の検出や生体内微量分子の精密定量解析は困難である。一方で MS は、広いダイナミックレンジにて多種の代謝物を比較的高感度かつ選択的に精密定量分析することが可能である。従って我々は、コホートメタボローム解析による新規疾患予防マーカーの開発を目的として、液体クロマトグラフィー（LC）を MS に接続した LC-MS を基盤技術とした、多検体処理を可能とするメタボローム解析プロトコルを構築した。

初めに、多検体前処理をハイスループットに実施することを目的とし、176 検体を同時に前処理する、全自動前処理システムを構築した。次に、UPLC-TOF/MS による網羅的メタボローム解析（G-Met）及び LC-MS/MS による標的メタボローム解析（T-Met）システムを構築した。現在までに、G-Met では 6,000 種程度のイオンの検出、T-Met おいては 300 化合物を測定することが可能である。さらに、血液中の代謝物の基礎的検討において、採血から解析までの血液試料保管中に変動する化合物類、日内変動の要因となる化合物類を抽出した。次いで、小規模コホートにおける G-Met により、疾患患者と正常群とで有意に差がある化合物群の同定に成功した。最後に、コホート検体（500 人）の解析を実施し、多検体測定に耐えうる解析プロトコルを構築した。現在、得られたコホートメタボローム解析結果を用い、多変量解析による群間比較解析を実施し、新規疾患予防マーカーの探索に加え、インハウスデータベースに基づいた G-Met 解析ソフトウェアの開発を実施している。

LC-MS, metabolomics, cohort

講演番号：4SY19-3
講演日時、会場：3 月 29 日 14:30～ F 校舎 11 会場

メタボロミクスと天然物化学の統合

Integration of metabolomics and natural products chemistry

○中林 亮（理研 CSRS）
○Ryo Nakabayashi (RIKEN CSRS)

メタボロミクスと天然物化学研究は，手法の違いから似て非なるものとして誤解されたまま現在に至っている．しかし，生物由来の化合物の構造を明らかにするという点では全く同じであり，ヒトに有益な化合物の生合成機構を解明し，それを応用するといった最終的な研究目標もまた同じである．両者の長短所を正しく理解し，統合すれば，より強力な研究分野となることは想像に難くない．そこで, 本講演では植物を例にとり, 液体クロマトグラフィー質量分析を基盤としたメタボロミクス（以下，単にメタボロミクスと記載する）と天然物化学研究との統合例について紹介する．

メタボロミクスは，医薬学的利用に潜在的価値があるポリケチド，フラボノイド，アルカロイド，含硫黄代謝物などの特異的代謝物の発見に寄与することが期待されている．特異的代謝物は創薬研究の革新的な発展につながる特徴的な生物活性を有している場合が多い．そのため，化学合成研究が発展している現在においても新規承認医薬の大部分が特異的代謝物をはじめとした天然物あるいは天然物由来のもので占められている．メタボロミクスにおいて，メタボロームデータから未知の特異的代謝物の構造の特徴を抽出するといった手法は，天然物化学研究などの基礎研究においても革新的なブレークスルーをもたらす．その手法を構築する第一段階としては，特異的代謝物に由来するイオンのうち，ヘテロ原子（N，O および S）を含むイオンを区別し，それらのイオンの組成といった化学的情報を得ることである．正確な代謝物の構造情報をあらかじめ得ることでそれを指標として化合物の単離・構造決定を行うことができる．

上記を念頭に含硫黄代謝物を一斉に解析する手法としてフーリエ変換イオンサイクロトロン質量分析を用いた S-オミクス（S-omics）が開発された[1)]．本講演では，タマネギ（*Allium cepa*），ネギ（*A. fistulosum*），ニンニク（*A. sativum*）への適用例などを紹介する．

1) Nakabayashi et al., Combination of liquid chromatography-Fourier transform ion cyclotron resonance-mass spectrometry with ^{13}C-labeling for chemical assignment of sulfur-containing metabolites in onion bulbs. *Anal. Chem.* 85, 1310−1315 (2013).

metabolomics, natural products chemistry, S-containing metabolites

講演番号：4SY19-4
講演日時、会場：3 月 29 日 15:00～ F 校舎 11 会場

食品の安全を守るメタボロミクス　-超臨界流体テクノロジーの残留農薬分析への応用

Metabolomics for food safety　-Application of supercritical fluid technologies to pesticide residue analysis

○馬場 健史（阪大院・工・生命先端）
○Takeshi BAMBA (Dept. Biotech., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

農作物生産の現場において，効率的な農業促進のために除草剤・殺虫剤・殺菌剤といった多くの農薬が使われている．農薬は，適切な使用方法を守れば流通の際に残留農薬基準を超過することはないが，不適切な農薬の使用や混入によって作物に残留した農薬は，時として健康被害を及ぼす．食の安全に対する関心の高まりを受けて，我が国では平成 18 年 5 月 29 日よりポジティブリスト制度が施行され，800 種を超える農薬の残留基準が設定された．しかし，実際には輸入品も含めたすべての食品を検査することは現行分析技術では不可能であるため，ランダムに選択して検査せざるをえず，時に基準値を超える農薬が残留した食品が検査の網目をくぐりぬけてしまうことがある．

現在，分析対象化合物により GC/MS と LC/MS を使い分けて残留農薬検査が実施されているが，高価な二種類の装置を準備しなければいけないこと，試料調製を含めた分析に時間がかかることなどが問題となっている．また，多数の夾雑物が存在する食品中の残留農薬を分析する際には，複雑な試料調製が必要であり，その処理に時間とコストがかかるという問題も抱えている．よって，出荷前により多くの検体が検査できるよう，また，仮に基準値を越えたものが見つかっても，迅速に全ての検体を分析し流通が回復できるようなハイスループットの残留農薬検査システムの開発が求められている．

そこで，我々のグループでは，超臨界流体を用いたハイスループットの残留農薬検査システムの開発に取り組んでいる．超臨界流体は，液体の溶解性と気体の拡散性の両方の性質を持つ高機能の媒体で，媒体として二酸化炭素を用いた場合，有機化合物の抽出，分離に有用である．超臨界流体を効果的に利用することにより，飛躍的な分析効率の向上が見込めるだけなく，有害で高コストの有機溶媒の使用量を軽減でき，低環境負荷で低コストのシステムの構築が期待できる．

本講演では，超臨界流体クロマトグラフィー/質量分析（SFC/MS）による農薬一斉分析手法の開発を中心に，最近取り組んでいる超臨界流体抽出（SFE）と SFC/MS をオンラインで接続した残留農薬分析システムの開発についても紹介し，超臨界流体を用いた残留農薬検査の有用性・可能性について言及したい．

【参考文献】

1) Ishibashi, M. *et al.*, *J. Chromatogr. A*, **1266**, 143 (2012)
2) 石橋愛実ら，*食品衛生学雑誌*, **54**(5), J-339 (2013)

supercritical fluid chromatography/mass spectrometry, supercritical fluid extraction, pesticide residue analysis

講演番号：4SY19-5
講演日時、会場：3 月 29 日 15:30～ F 校舎 11 会場

地域農産物のメタボロミクス

Metabolomics of local agricultural products

○及川 彰（山形大農）
○Akira Oikawa (Yamagata Univ.)

近年, 地域の名称をブランドとした農産物が多く開発・販売され, 地域活性化の原動力の一つとなっている．それらの多くは，それぞれの地域の土壌や気候に即した栽培方法で育てられた伝統的な農産物であり，大量生産には向かないが，良質な風味や高い機能性などを持っている．また，これらを元にして作られた加工品は，地域特産品として土産物店などに並べられている．一方で，これらの特異性に対して科学的な根拠を示した例は少なく，他地域の同種の特産品との差を明確にするのが困難であった．最近では数種の成分含量を元に差別化を図る努力も行われているが，その対象成分も一部の化合物に集中する傾向があり，特徴付けとしては弱いものであった．

メタボローム解析は，生体に含まれる低分子化合物を網羅的に調べる手法である．これを地域農産物やその加工品に応用することにより，それぞれに含まれる風味や機能性に関わる成分含量を数多く同定・定量することが可能となり, 元来想定されていた成分に加え, これまで余り注目されていなかった有用成分含量の情報も得ることができる．これらの結果は，地域農産物やその加工品を販売する際に，それらの付加価値についての科学的な証拠として用いることができるため，商業的に重要となる可能性が高い．

一つの例として，山形県鶴岡市の特産品であるダダチャマメのメタボローム解析について紹介する．ダダチャマメはエダマメの一品種で，濃厚な旨味と強い甘味，さらに独特な香りが特徴のブランドエダマメであり，他のエダマメより高値で売られている．我々は，ダダチャマメとその他のエダマメに含まれる成分の種類や量の違いを明らかにするために，それぞれの複数品種をメタボローム解析に供した．その結果，想定されていたように，旨味に関わるアミノ酸や甘味に関わる糖類含量がダダチャマメに多く含まれていた．一方で酸味に関わる有機酸や苦味に関わるフラボノイド類などの含量はダダチャマメに少ないという結果が得られたが，これらは未知のダダチャマメの特徴であった．また，ダダチャマメ特有の香り成分である 2-アセチル-1-ピロリンがダダチャマメに特異的に検出された．さらに我々は，追肥量によるダダチャマメ内の有効成分含量の違いや，収穫時の気候の違いによるダダチャマメ成分の変動についても明らかにした．これらの結果は，ダダチャマメブランドの差別化や維持, 今後の品種改良などに有用であり, 地域の宝である特産品を守ることにつながると考えられる．

本講演ではこれに加え，主に山形県内の地域農産物やその加工品にメタボローム解析を供した例を示し，メタボローム解析の農業・食品分野における有用性を示す．

metabolomics, agricultural products, local foods

講演番号：4SY19-6
講演日時、会場：3 月 29 日 16:00～ F 校舎 11 会場

質量イメージングの農芸化学・医学分野への応用

Application of mass spectrometry imaging to agrochemistry and medical science

○三浦 大典 (九大レドックスナビ)
○Daisuke Miura (Kyushu Univ.)

メタボロミクスはゲノムの物質的最終表現型である代謝物を対象とするため、バイオマーカー探索や創薬ターゲットの同定、疾病発症メカニズム解明における重要性が強く指摘されている。一方、近年飛躍的に向上しつつあるメタボロミクス技術は、測定における種々の制約により組織からの代謝物の抽出・濃縮が不可欠である。結果的に得られる情報は生体組織全体の平均値となり、局所的なメタボローム変動情報は完全に消失してしまう。組織から二次元情報を保持しつつ直接代謝物を検出する技術があれば、疾患メタボロミクスやバイオマーカー探索における大きなブレイクスルーになると考えられる。

近年、質量分析を用いた生体分子の *in situ* マッピング（質量分析イメージング）が盛んに行われている。MALDI 法は質量分析イメージングにおいて最も良く用いられるイオン化法であるが、MALDI 法自体の持つ欠点（定量性・再現性の悪さ、マトリックスイオンによる妨害）のため、細胞膜脂質や骨格タンパク質など、組織中に圧倒的多量に存在し、かつ分子量が比較的大きな分子群の定性的な分布観察のみにその適用は制限されていた。一方我々は、MALDI 法に用いるマトリックスおよびサンプル調製法の最適化を徹底的に行うことで、既存の常識を覆す生体代謝物質の超高感度（数十 attomole レベル）測定法を開発した。さらに、本技術を質量分析イメージングに応用した結果、ラット脳切片から生体内レドックス関連代謝物やエネルギー物質、アミノ酸、中央代謝系（解糖系、TCA 回路）中間体などを同時に検出し、その組織内分布をイメージングすることに成功した。本技術は生体内の局所における生命現象にアプローチできる「可視化」技術と、生物の物質的最終表現型とも言える代謝物の包括的分析である「オミクス解析」技術が融合した革新的分子イメージング技術であると言える。本講演では、我々が取り組んでいる MALDI-MS を中心とした時空間分解代謝動態解析に関する様々な技術開発について、微生物や植物サンプルへの応用を交えて紹介する。

metabolomics, mass spectrometry imaging, spatiotemporal information

講演番号：4SY20-1
講演日時、会場：3 月 29 日 9:00～ F 校舎 22 会場

外因性因子による褐色脂肪細胞機能亢進機構の解析

Study of mechanism underlying the enhancement of brown adipocyte function by exogeneous factors

○後藤 剛[1,2]、高橋 信之[1,2]、河田 照雄[1,2]（[1]京都大院　農、[2]京都大　生理化学ユニット）
○Tsuyoshi Goto[1,2], Nobuyuki Takahashi[1,2], Teruo Kawada[1,2] ([1]Graduate School of Agriculture, Kyoto University, [2]Research Unit for Physiological Chemistry, Kyoto University)

生体の脂肪組織はエネルギー貯蔵を主に担う白色脂肪組織と高い熱産生能・脂肪酸異化能を有する褐色脂肪組織に大別される。近年の研究において、成人においても機能的な褐色脂肪組織が存在することが示されている。褐色脂肪組織の活性と肥満度が逆相関することも示されており、その機能制御機構の解明が期待されている。寒冷刺激に代表される外因性の刺激によって、白色脂肪組織が高い脂肪酸異化能力に代表される褐色脂肪様の性質を獲得しうることが示されている（誘導型褐色脂肪組織）。本発表では、核内受容体型転写因子などの作用を介した食餌由来成分などによる褐色脂肪細胞機能亢進機構の検討結果について、PPARαに関する結果を中心に紹介する。

リガンド要求性の核内受容体型転写因子、ペルオキシソーム増殖剤応答性受容体α（PPARα）は肝臓や心筋、骨格筋など、脂肪酸異化が盛んな組織において多く発現し、脂肪酸酸化を制御している。PPARα活性化剤は主に肝臓等において脂肪酸酸化を亢進させるため、高中性脂肪血症改善薬として臨床においても使用されている。組織毎の PPARα発現量について検討したところ、白色脂肪組織においてPPARαが骨格筋と同程度以上に発現が認められ、特に白色脂肪細胞に比較的多くの PPARα発現が認められた。そこで、白色脂肪細胞における PPARαの機能について、マウス由来の 3T3-L1 細胞を用いて検討したところ、アゴニストによる PPARα活性化が、脂肪細胞の分化および脂肪酸異化能を活性化させることが示唆された。PPARα合成アゴニストの肥満モデルマウスへの投与は、血中中性脂肪量の低下に加え、耐糖能やインスリン抵抗性の改善が認められるとともに、体脂肪量の低下および脂肪細胞の小型化が認められた。また、PPARα活性化作用を有する食品由来成分としてクロロフィルより派生するフィタン酸に着目し、肥満マウスにおける摂食実験を行うと、糖・脂質代謝異常の改善や体脂肪蓄積の抑制が認められ、褐色脂肪組織機能の亢進が認められた。

以上の結果から、特定の食品由来因子などによる脂肪組織の PPARαの活性化は、褐色脂肪組織機能の亢進を惹起し、肥満に伴う代謝異常症の改善に寄与しうることが示唆された。

brown adipose tissue, fatty acid oxidation, PPARα

講演番号：4SY20-2
講演日時、会場：3 月 29 日 9:30～ F 校舎 22 会場

ケトジェニックダイエットが生体に及ぼす影響

The Effect of Ketogenic Diet to the Body

○山本 祐司、小林 謙一、鈴木 司（東京農大）
○Yuji Yamamoto, Ken-Ichi Kobayashi, Tsukasa Suzuki (Tokyo Univ, of Agricul.)

Ketogenic Diet（以下 KD）とは、炭水化物を極端に減らし、エネルギーを脂質に置き換える食事療法のことであり、糖尿病患者の食事療法、体重減少を目的としたダイエット食、さらには、難治性の癲癇の治療食して知られている。KD では主要なエネルギー源をグルコースに依存するのではなく、肝臓で脂質のβ酸化から生じるケトン体をエネルギー源とすることで、糖の消費を最小限に抑えている。一方で、血糖値の維持のため、糖新生の亢進もおこり、また、脳や筋肉ではケトン体からエネルギーを獲得するように代謝がシフトするなど、生体内でダイナミックな代謝変動がおこる。本講演ではラットを用いた動物試験により、KD 摂取により変動する代謝経路およびシグナル経路を明らかにすることで、KD 摂取が生体に及ぼす影響の分子メカニズムの解析を行った。8 週齢、オスの Wistar Rat を用い、AIN-93M を基本組成とし KD はエネルギー比で、炭水化物 0.5%・脂質 91.9%・タンパク質 7.6%の物を使用し、8 週間飼育を行った。屠殺後、血液中のケトン体、グルコース濃度、中性脂肪、インスリン量などの解析を行った。その結果、血中ケトン体量はＫＤ摂取で有意に上昇し、中性脂肪、インスリン量は有意に減少した。また、肝臓中でケトン体合成のβ−ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼの還元反応が亢進する事に起因した NAD^+/NADH ratio を測定したところ、肝臓では ratio の有意な上昇を認めたが、筋肉では変化が観察されなかった。この事から、肝臓中で NAD^+依存性脱アセチル化酵素 SIRT1 の活性が変動している物と予想し、肝臓・骨格筋の SIRT1 の遺伝子発現量と、SIRT1 の活性により負に調節される SREBP-1c の遺伝子発現量を測定した。肝臓中の SREBP-1c の遺伝子発現量は減少し、SIRT1 の活性の上昇が考えられた。SIRT1 は PGC-1α や FOXO1 などの転写調節因子・核内受容体を直接的に脱アセチル化し活性を変化させることで代謝を制御することが知られており、KD 群では SIRT1 を介した代謝の制御が生じている可能性が示唆された。一方で、糖新生の基質となる血中乳酸、アラニン、グリセロール量はいずれも KD 摂取で有意に減少したことから肝臓での糖新生機構が亢進している物と推察されたが、PEPCK や G6Pase および CREB のリン酸化を解析した結果、いずれも有意に減少していた事から、肝臓での糖新生は行われたていないものと判断した。次に腎臓での糖新生に着目し解析した結果、糖新生亢進因子の有意にな増加をみとめた。以上のことから、KD 摂取では、腎臓で糖新生機構が亢進していることが明らかとなった。これらの結果を踏まえ KD 摂取により臓器間で情報交換による、代謝調節メカニズムを提案したい。

ketone bodies, gluconeogenesis, Sirtuin 1

講演番号：4SY20-3
講演日時、会場：3 月 29 日 10:00～ F 校舎 22 会場

構造－活性相関情報に基づいた食品タンパク質由来ペプチドの機能性予測とその実際

Prediction of functions of food-derived peptides based on the structure-activity relationship

○大日向 耕作（京大農）
○Kousaku Ohinata (Kyoto Univ.)

生理活性物質の研究手法として、標的分子からアプローチする「リバース型」と、物質の生理作用を起点とする「フォワード型」が知られている。本シンポジウムでは、これまで我々が行ってきた「フォワード型」の研究を紹介する。食品は複雑系である。例えば、食品タンパク質は消化管内で基質特異性の異なるプロテアーゼにより切断され生成するペプチドの種類は膨大である。そこで我々は、組み合わせが比較的少ないジペプチドの構造－活性相関情報に基づいて、食品タンパク質の酵素消化により生成するペプチドの機能性予測を試みたところ、種々の生理活性ペプチドを発見することができた。なお、ペプチドは多彩な生理作用を示すことが知られているが、特に、神経系と循環器系に作用するペプチドに着目した。意外なことに、経口投与の際には、4～11 残基の中鎖ペプチドがジペプチドよりも強力で持続的な生理作用を示す場合があることもわかってきた。以下、研究例を示す。

ジペプチド Tyr-Leu（YL）が医薬品に匹敵する低用量で抗不安薬様作用（精神的ストレス緩和作用）を示すことを複数のマウス行動試験により明らかにした[1]。さらに、YL の構造－活性相関を検討したところ、芳香族アミノ酸-Leu という配列が重要で、かつ、C 末端側への鎖長延長は許容されることがわかった。さらに、このルールを満たす Tyr-Leu-GLy（YLG）が、主要な牛乳タンパク質αs カゼインの消化管プロテアーゼ処理により効率的に生成するとともに、YLG および、これを含む酵素消化物が抗不安薬様作用を示すことを見出した[2]。一方、Arg-Phe（RF）は、コレシストキニン（CCK）依存的な動脈弛緩作用（EC_{50} = 580 nM）および血圧降下作用を示し、摂食抑制作用を併せ持つことを明らかにした[3]。RF の N 末端側への鎖長延長は許容されるが、このルールを満たす食品タンパク質の酵素消化により生成する複数のペプチドが RF と同様の生理作用を示すことを明らかにした[4]。

また最近、経口投与の際には中鎖ペプチドがより強力な生理作用を示す場合があることがわかってきた。具体的には、ジペプチド Phe-Leu（FL）および、N 末端に FL 配列を有する大豆 β-コングリシニン由来の 11 残基ペプチドは、ともに抗不安薬様作用を示すが、経口投与の際には 11 残基ペプチドのほうが、むしろ低用量で作用する。同様に、RF よりも C 末端に RF 配列を有する 4～5 残基ペプチドがより強力で持続的な血圧降下作用を示す。腹腔内投与では作用が減弱することから、中鎖ペプチドの作用点は消化管と考えられ、吸収を前提としない作用機構を介している可能性がある。

[1] Kanegawa N *et al*. FEBS Lett 2010; [2] Mizushige T *et al*. FASEB J 2013; [3] Kagebayashi T *et al*. Mol Nutr Food Res 2012; [4] Kontani N *et al*. Mol Nutr Food Res 2014

The nervous system, The cardiovascular system, Oral administration

講演番号：4SY20-4
講演日時、会場：3 月 29 日 10:30～ F 校舎 22 会場

Molecular mechanisms of endocrine hormones in human and animal homeostasis

○Simon. J Rhodes (Indiana University)

The anterior pituitary gland secretes hormones that control many aspects of development and physiology in mammals. Our laboratory investigates the genetic pathways that regulate the cellular determination and differentiation events that occur during establishment of the gland. We have identified transcription factor genes that are critical regulators of the early stages of pituitary organogenesis. We have translated this work in applications to animal agriculture and human disease. Because the pituitary controls growth (meat production), reproduction (offspring number), lactation (milk production), and the stress response (resistance to disease, etc.), understanding pituitary development and physiology has significant relevance to the key production and efficiency parameters in animal agriculture. We have investigated the genetic and biochemical traits associated with pituitary transcription factors such as LHX3, PROP1, and SF1 in agricultural species including pigs, cattle, and sheep. In humans, we have demonstrated that mutations in the *LHX3, LHX4* and *PROP1* genes underlie syndromes that include combined pituitary hormone deficiency disease and nervous system problems. We have made the first viable animal model of human *LHX3* disease using a knock-in strategy in mice to separate the pituitary and nervous system effects. In order to understand the mechanism of LHX3-mediated pituitary gene regulation, we have characterized co-regulatory proteins that interact with the carboxyl terminus of LHX3: an affinity purification screen of pituitary proteins identified members of the inhibitor of histone acetyltransferase (INHAT) transcriptional repression complex. Further, we have characterized distal enhancer modules of mammalian *LHX3* transcription factor genes that confer pituitary- and nervous system-specific gene expression. Supported by grants from the NIH-NICHD and the NSF.

pituitary gland, transcription factor, endocrine hormones

講演番号：4SY20-5
講演日時、会場：3 月 29 日 11:00～ F 校舎 22 会場

線虫を用いた分子栄養学的アプローチ

Molecular Nutritional Approach using Caenorhabditis elegans

○松本 晋也（京都女子大学家政学部）
○Shinya Matsumoto (Kyoto Women's Univ.)

肥満は食べ過ぎと運動不足が原因で引き起こされるというのが一般的な考え方である。このような考え方は出生後の生活習慣・環境に原因を求めるのに対して，現世代は太りやすい体質として生まれており，それが原因（あるいは一因）となって肥満が増えているという仮説が提唱されている。この仮説は出生前の胎児期の環境に原因を求めるものであり，生活習慣病胎児期起源説（Fetal Origin of Adult Diseases; FOAD 説）と呼ばれている。FOAD 説で想定されている生活習慣病発症の機序を簡単に書くと以下の通りとなる。①母体の栄養不足により，胎児が子宮内で十分に成長できなくなり，胎児の子宮内成長遅延が生じる。 ②胎児にとって，子宮内成長遅延は胎児がこれから生まれ出る世界には充分な食べものがないというシグナルになる。 ③出生後の食べもの不足に備えるため，胎児は太りやすい体質を獲得して生まれ出る。 ④実際に生まれ出た世界には実際は食べものが溢れているので，太りやすい体質に過食と運動不足が加わり，生活習慣病に罹患するリスクが高くなる。

FOAD 説を支持するものとして，低出生体重（子宮内成長遅延の指標のひとつ）が，成人後の虚血性心疾患による死亡率，腎糸球体ネフロンの減少，膵臓 β 細胞の減少などと関連性が認められることが挙げられる。さらに，母獣への栄養を制限すると仔獣の内臓脂肪が増加するという報告もある。日本では全出生児の 9.6%が低出生体重児である（H24 年)。このことから，（FOAD 説の観点からすれば）日本では生活習慣病のリスクの高い子供が増えている可能性が指摘され，将来の日本国民の健康状態に影響が及ぶことが懸念されている。しがって，FOAD 説の実態，影響，メカニズムを明らかにすることは重要であると考えられる。

線虫（*Caenorhabditis elegans*）は，多細胞生物を研究するモデル生物として 1970 年代から計画的に解析が進められており，変異体バンクの充実，全ゲノム配列・全細胞系譜・全シナプス結合の解明，遺伝子導入法の確立など実験動物としての基盤整備は充実している。その基盤を利用して寿命，記憶，筋肉生理学，アポトーシス，RNA 干渉といった生命現象を分子レベルで解明するのに大きく貢献した。演者は，線虫を使えば FOAD 説の検証ができるのではないかと考え，飢餓を経験した親線虫から生じた子線虫の寿命，運動能力，脂肪蓄積量，生殖能力がどのような影響を受けるかを検討した結果を報告するとともに，線虫を用いた分子栄養学の可能性を考えてみたい。

transgenerational epigenetics, C.elegans, starvation

講演番号：4SY20-6
講演日時、会場：3 月 29 日 11:30～ F 校舎 22 会場

核内受容体転写共役因子による生体の外部・内部の環境変化に対する適応の分子機序

Role of nuclear receptor cofactor in the adaptation of mammals to external and internal environmental changes

○亀井 康富[1]、三浦 進司[2] ([1]京都府立大生命環境、[2]静岡県立大食品栄養)
○Yasutomi Kamei[1], Shinji Miura[2] ([1]Kyoto Prefectural University, [2]University of Shizuoka)

骨格筋は人体で最大の組織であり、エネルギー代謝、糖（グルコース）取込み、運動において重要な役割を果たす。適度な運動により、エネルギー消費が増加し肥満が解消され、また糖代謝が活発になり糖尿病が予防・改善されることはよく知られている。適切な栄養条件下で運動トレーニングを継続することにより、骨格筋の量は増加する。一方、栄養不足や、骨格筋を長い間使用しない場合には骨格筋の萎縮が生じる。骨格筋萎縮や骨格筋機能不全、および運動による機能改善の分子機構が明らかになると、これらをターゲットとした骨格筋不全予防法の開発が期待される。

核内受容体は脂溶性ホルモン類をリガンドとする転写因子であり、生体のエネルギー代謝に重要な役割を果たす。本研究では核内受容体および転写共役因子に着目し、骨格筋機能における遺伝子発現制御を解析した。転写共役因子 PGC-1α は、骨格筋等において運動により発現増加し、ミトコンドリアの生合成・筋線維タイプの変化・脂肪酸酸化促進など、エネルギー代謝や運動に関連する遺伝子発現を活性化することが知られている。我々はこれまでに、骨格筋特異的 PGC-1α 過剰発現マウス(PGC-1α Tg マウス)を作製し、PGC-1α の過剰発現により骨格筋の顕著な赤筋化が生じ、持久運動能力が向上したことを報告した。本実験ではマイクロアレイ法を用いて網羅的な遺伝子発現解析を行い、PGC-1α Tg マウスで発現増加した遺伝子についてバイオインフォマティクス解析を行った。その結果、PGC-1α によって活性化することが知られている脂肪酸代謝などのほか、これまでに PGC-1α との関連が知られていなかった分岐鎖アミノ酸（BCAA）代謝関連経路が検出された。運動により生じる PGC-1α の発現増加は BCAA 代謝に関与している可能性が示唆された（PLOS ONE, 9: e91006, 2014)。

nuclear receptor, skeletal muscle, gene expression

講演番号：4SY21-1
講演日時、会場：3 月 29 日 9:03～ A 校舎 37 会場

生体恒常性維持における「善玉」メカニカルストレスと「悪玉」メカニカルストレス

Beneficial and detrimental mechanical stresses that regulate the homeostasis of tissues and organs

○澤田 泰宏[1,2]、原田 伊知郎[2]([1]国立障害者リハビリテーションセンター研究所運動機能系障害研究部、[2]名戸ヶ谷病院ロコモティブシンドローム研究所メカノメディスン部)
○Yasuhiro Sawada[1,2], Ichiro Harada[2] ([1]National Rehabilitation Center, [2]Locomotive Syndrome Research Institute, Nadogaya Hospital)

メカニカルストレスは、組織や臓器の発生・分化・再生、さらには癌の浸潤・転移など、多くの生命現象に関わっている。全ての生物の身体組織は、周囲の物理的環境・条件を感知し、細胞内生化学シグナルなどの生体情報に変換するメカノセンシング機能を備え、地表で生息する限りたえず受ける重力に対応する。そこで、生体組織にはメカニカルストレスによって制御される恒常性維持機構が存在すると考えられる。

これまで多くの場合、メカニカル「ストレス」は、過度の物理的負荷を指し、障害誘導・炎症増悪因子として捉えられてきた。例えば心血管系への過度のメカニカルストレス負荷となる高血圧は、心肥大・動脈硬化・動脈瘤など循環器系の加齢性疾患の原因となる。また、肥満や激しい運動負荷、あるいは靭帯損傷後の関節不安定性による組織への過度のメカニカルストレスによって、変形性関節症や骨吸収（骨量低下）が引き起こされる。このようにメカニカルストレスシグナルの負の作用（悪玉メカニカルストレス）が想定される病態には、炎症反応の制御において中心的な役割を果たす分子である NF-κB の活性化が関与するものが多い。

ロコモティブシンドローム（ロコモ）で障害が生じる運動器、具体的には、骨・関節・骨格筋では、過度のメカニカルストレスではなく、廃用あるいは無重力（宇宙滞在）によるメカニカルストレスの欠失・不足も組織の機能・代謝の変調を招く悪玉メカニカルストレスであり、その背景にも NF-κB の活性化が関与している。

ロコモも含め、上記の悪玉メカニカルストレス関連の疾患・障害には、適度な運動や理学療法といった、メカニカルストレスを利用した介入に治療効果があるものが多い。これは、悪玉メカニカルストレスに抗し、老化・炎症を抑制する作用を持つ「善玉メカニカルストレスシグナル」の存在を示唆するが、その背景となる分子メカニズムは全く解明されていない。

本講演では、メカノバイオロジーの観点から、善玉と悪玉のメカニカルストレスを定義し、運動器ではメカニカルストレスの欠失が悪玉となることをメカノバイオロジー的に解釈する。

mechanical stress, homeostasis, mechanobiology

講演番号：4SY21-2
講演日時、会場：3 月 29 日 9:30～ A 校舎 37 会場

細胞外基質の硬さを感知するメカノセンサー

Mechanosensor for stiffness of extracellular matrix

○木岡 紀幸（京大農）
○Noriyuki Kioka (Kyoto Univ.)

ロコモティブシンドロームにかかわる骨、軟骨、筋などの組織の恒常性維持には、適切なメカニカルストレス(力学的負荷)が必要である。生体内のメカニカルストレスには、ずり応力、静水圧、引張り力などがあるが、このような細胞外からの直接的なメカニカルストレスだけでなく、細胞外基質(コラーゲンなど)の硬さといった物理的な要因も、細胞にメカニカルストレスを与え、細胞の分化方向を制御している。たとえば間葉系幹細胞は硬い培養基板上では骨芽細胞に、脂肪組織と同程度に柔らかい基板上では脂肪細胞に分化しやすくなる。細胞外基質の硬さという物理的な要因を細胞が感知し、それを分化を調節するシグナルに変換する分子実体を解明するため、私たちは細胞外基質と細胞の接着部位(接着斑)に着目して研究を進めている。接着斑は、細胞外基質とアクチン細胞骨格(細胞内で力の発生に関わる)を連結している装置で、細胞内と細胞外との力の伝達部位となっている。

接着斑を構成するタンパク質の一つビンキュリンは、細胞外基質受容体をアクチン細胞骨格に連結するタンパク質である。これまでにビンキュリンが細胞内の強い張力の存在する領域に濃縮することや、ビンキュリン分子には細胞内で様々な強さの張力がかかっていることがわかっていた。私たちはビンキュリンが細胞外基質の硬さを感知するメカノセンサーである可能性があると考え、硬さの異なる細胞外基質上で細胞を培養し解析を行った。細胞外基質の硬さにより、ビンキュリンのターンオーバーやアクチン繊維との結合性が変化するなどビンキュリンの挙動が細胞外基質の硬さによって調節されていた。この挙動変化にはビンキュリンのプロリン豊富領域とその結合タンパク質ビネキシンとの結合が必要であった。興味深いことに、この結合は細胞外基質の硬さや細胞内張力により制御され、しかも、この結合がビンキュリンの構造をアクチン高親和型へと変化させた。つまり、ビンキュリンとビネキシンは細胞外基質の硬さに応じて相互作用をし、それを引き金としてビンキュリンの構造や挙動が変化していることがわかった。さらに私たちは、1)細胞外基質の硬さによって調節される繊維芽細胞の細胞遊走にビネキシンが必要であること、2)間葉系幹細胞株 ST2 の脂肪細胞への分化は細胞外基質の柔らかさ(硬さ)に依存しており、その軟らかさ依存性はビンキュリンの発現抑制により低下すること、を明らかにした。これらの結果から、ビンキュリンービネキシン相互作用が細胞外基質の硬さを感知するメカノセンサーとして機能し、細胞の挙動や分化を制御していると考えられる。このようなメカノセンサーの仕組みの解明は、メカニカルストレスを感知する「感度」を調節することで、生体内の恒常性維持機能を制御する手法へと発展することが期待される。

focal adhesion, extracellular matrix, mesenchymal stem cell

講演番号：4SY21-3
講演日時、会場：3 月 29 日 9:52～ A 校舎 37 会場

旋回振とうによる流体刺激が MG-63 骨肉腫細胞株に引き起こす力学応答の特性について
Characterization of the mechanoresponse of MG-63 osteosarcoma cells to the fluid shear caused by orbital shaking
○深田 尚、杉本 憲治（大阪府大生命）
○Takashi Fukada, Kenji Sugimoto (Osaka Prefecture Univ.)

骨組織が重力負荷や運動刺激などの力学刺激を受容し、応答することはよく知られているが、硬い組織である骨がどのようにして力学刺激を受容するのかについては諸説ある。その中で有力なものの一つが、骨のわずかな変形が骨細管内に圧力差を生じ、細管内の組織液の素早い流動として増幅され、細胞に知覚されるというものである。培養細胞系でこの流体刺激を再現する方法として、現在は平行板法が一般的である。これは細胞を培養したスライドグラスを二枚のプラスチック板で挟み、その隙間に薄い流路を形成して培地を灌流する方法で、流れを厳密に制御しやすいという利点があるが、細胞を交換するためにはその都度装置を分解しなければならないため、手間がかかる。過去には他にも様々な実験法が試みられており、その中に通常の培養皿を旋回振とうして培地を流動させる方法がある。この方法は容器内の位置によって流れの状態が異なるという欠点があるが、簡便で処理能力が高く、特に時間経過を追う実験に適している。我々は旋回振とう法が平行板法と欠点を補えあえるものだと考え、ヒト骨肉腫細胞株 MG-63 での ERK の活性化をモデルとして旋回振とう法による力学応答の検出を試みた。

その結果、振とう開始の 5 分後に ERK のリン酸化量は 5 倍程度に増加した（初期応答）後、一旦低下し、40～60 分後から再び 2 倍程度に増加する（後期応答）という二相性の応答を示した。また、後期応答はカルシウムシグナルに依存していたが、初期応答は依存していなかった。このような発生機構の異なる二相性の応答は、平行板法では報告されていない。カルシウムシグナルに依存しない力学応答は報告例が少ないため、その発生機構の分析を進めている。

また、振とう前の血清飢餓と培地交換の条件の組み合わせによって後期応答が増強される場合があることが観察されており、細胞自身から分泌された何らかの因子が後期応答を調節している可能性を検討している。

これらの現象は、時間経過による変化をとらえやすく、また細胞から分泌された因子が流亡せずに実験系内に留まるという旋回振とう法の特徴によって観察できたものといえる。これらの特徴を活かし、平行板法と相補できる方法として旋回振とう法による力学応答過程の分析を進めたいと考えている。

mechanobiology, fluid shear stress, osteoblast

講演番号：4SY21-4
講演日時、会場：3 月 29 日 10:14～ A 校舎 37 会場

無重力による筋細胞のシグナルトランスダクションと筋萎縮

Microgravity-mediated signal transduction in skeletal muscle cellls

○二川 健[1]、越智 ありさ[1]、高木 麻理奈[1]、北畑 香菜子[1]、安倍 知己[1]、真板(大野) 綾子[1]、近藤(手嶋) 茂忠[1]、赤間 一仁[2] ([1]徳島大医栄、[2]島根大生物資源)
○Takeshi Nikawa[1], Arisa Ochi[1], Marina Takagi[1], Kanako Kitahata[1], Tomoki Abe[1], Ayako Maita[1], Shigetada Kondo[1], Kazuhito Akama[2] ([1]Tokushima Univ., [2]Shimane Univ.)

骨格筋は機械的ストレスに感受性の高い臓器の一つであり、骨格筋の機械的ストレスに対する適応異常は運動機能の低下やインスリン感受性の悪化など全身性疾患の誘因となっている。我々は数回の宇宙実験を通し、寝たきり、無重力などの Unloading により誘導される筋蛋白質代謝異常のメカニズムとその治療方法を研究してきた。その結果、無重力環境において発現の増大するユビキチンリガーゼ Cbl-b が、筋細胞の成長に重要な IGF-1 の細胞内シグナル分子である IRS-1 (insulin receptor substrate-1)をユビキチン化し、その分解を促進することが筋萎縮に通じる IGF-1 抵抗性の大きな原因の一つであることを見出した (Mol Cell Biol, 2009)。このユビキチンリガーゼ Cbl-b の発現調節はとてもユニークで、寝たきりや無重力、炎症性サイトカインにより発現が増大する。したがって、Cbl-b の発現調節機構を解明すれば、無重力などの機械的ストレスの感知機構がわかると考えた。Cbl-b の転写調節領域には、酸化ストレス応答領域が存在し、発現上昇にミトコンドリアの機能異常(酸化ストレス)が関与していることがわかった。一方、Cbl-b による IRS-1 のユビキチン化を阻害することで筋萎縮を予防できうる。そこで、Cbl-b のユビキチン化活性を抑制できる阻害剤を開発した。まず注目したのは、ペプチドである。Cbl-b はリン酸化チロシンを有する分子に結合しやすいので、IRS-1 分子上でリン酸化されるチロシン近傍のペプチドのユビキチン化阻害活性をスクリーニングした。その結果、DGpYMP のペンタペプチドが、試験管内あるいは細胞培養実験で Cbl-b による IRS-1 のユビキチン化を強く抑制することがわかった。そこで、この DGpYMP ペプチドを Cblin (Cbl-b inhibitor)と名付けた。Cbl-b と Cblin の共結晶の X 線結晶解析により、Cblin が Cbl-b の基質結合ドメインと結合している構造が明らかとなった。現在、この Cblin の構造を基に、低分子阻害物や新規の Cbl-b 阻害食材を開発中であり、その一部は Unloading による筋萎縮に有効であった。本講演では、Unloading による筋細胞のシグナルトランスダクションとそれにより引き起こされる筋萎縮に対する治療法について概説したい。

ubiquitin ligase inhibitor, microgravity, skeletal muscle atrophy

講演番号：4SY21-5
講演日時、会場：3 月 29 日 10:41～ A 校舎 37 会場

転写調節因子 PGC-1αおよび FOXO1 と骨格筋機能

PGC-1 alpha and FOXO1 mediated adaptations of the skeletal muscle

○三浦 進司[1]、亀井 康富[2] ([1]静岡県大食品栄養、[2]京都府大生命環境)
○Shinji Miura[1], Yasutomi Kamei[2] ([1]Univ. of Shizuoka, [2]Kyoto Pref. Univ.)

加齢に伴う筋萎縮（サルコペニア）や廃用性筋萎縮は、ロコモーティブシンドロームの原因として社会問題になっている。骨格筋は遅筋（赤筋）と速筋（白筋）から構成されるが、筋萎縮に伴いサルコペニアでは遅筋線維の割合が、廃用性筋萎縮では速筋線維の割合がそれぞれ増加する。運動トレーニングも筋線維の割合を変化させるが、その変化はトレーニングのタイプによって異なるとされている。また、遅筋と速筋は異なる代謝特性を有するため、これら筋線維組成の変化は骨格筋の代謝機能を変化させる。一方、骨格筋は強いメカニカルストレスに暴露される組織であり、運動や不活動などによるメカニカルストレスの変化は、筋線維タイプのみならず代謝適応反応と密接に関係する。

演者らは、運動トレーニングや廃用性筋萎縮に伴う骨格筋特性変化の機序と、それに伴う代謝変化を解明するために、持久的運動トレーニングによって骨格筋で発現増加する転写共役因子 PGC-1α と、廃用性筋萎縮の骨格筋で発現増加する転写因子 FOXO1 に着目し、それらを骨格筋特異的に過剰発現させたマウスを作出し、これら分子による筋線維タイプ変化と代謝変化について検討してきた。

これまでに、PGC-1α が遅筋線維を増加させ、骨格筋ミトコンドリア生合成促進によって脂肪酸利用を増加させることにより、運動持久力を向上させることを明らかにした。一方、FOXO1 が遅筋線維を減少させること、骨格筋萎縮を引き起こすこと、脂質合成および糖取り込み増加を抑制することを見出した。さらに、タンパク質分解酵素遺伝子が FOXO1 によって転写活性化されることを示した。これらの結果は、PGC-1α や FOXO1 が骨格筋での筋線維タイプ変化や栄養素代謝に重要な役割を果たすことを示唆する。最近、PGC-1α が分岐鎖アミノ酸代謝を促進すること、FOXO1 がグルタミン合成酵素発現を増加させることも明らかにし、これら分子が骨格筋でのアミノ酸代謝にも関係することが判明した。さらに、PGC-1α や FOXO1 が骨格筋の脂質組成を変化させ、ある特定のリン脂質が PGC-1α によって増加し、FOXO1 によって減少することを見出しており、骨格筋の膜構成成分の調節にも寄与することが示唆されている。

このように、PGC-1α や FOXO1 は筋線維タイプ変化や代謝調節など骨格筋機能に大きな影響を及ぼしており、これら分子の発現量や活性を調節することは筋機能の維持改善のための一手法となる可能性がある。さらに、メカニカルストレス変化による PGC-1α や FOXO1 の発現および活性調節機序、すなわちメカノトランスダクション機序解明と、その機序を利用した筋萎縮予防法の開発が期待される。

Fiber type, Metabolism, Adaptation

講演番号：4SY21-6
講演日時、会場：3 月 29 日 11:08～ A 校舎 37 会場

ロコモティブシンドロームにおける細胞内スーパーオキサイドの病態生理学的意義

Pathophysiological role of cellular superoxide in locomotive syndrome during aging and under mechanical stress.

○清水 孝彦（千葉大学院医）
○Takahiko Shimizu (Chiba Univ. Grad. Sch. Med.)

酸化−抗酸化バランス破綻による酸化傷害蓄積が疾病要因になることが示唆されている。生理的な酸素代謝で生じた活性酸素の基点物質スーパーオキサイド（O_2^-）は superoxide dismutase （SOD）の触媒作用で速やかに処理される。細胞内には、細胞質に SOD1 が、ミトコンドリアマトリクス内に SOD2 がそれぞれ局在し、細胞内の O_2^-濃度を適切に維持している。最近、我々は細胞内 O_2^-バランス破綻による細胞機能障害が、骨粗鬆症や変形関節症、および筋力減少症を含むロコモティブシンドロームの増悪因子となること、さらにメカニカルストレスによる SOD 発現変化と O_2^-バランス破綻を明らかにした。本発表では、SOD1 および SOD2 欠損マウスの解析から、*in vivo* での細胞内 O_2^-制御破綻が個体レベルで運動器組織にどのような影響を与えるのか実例を紹介したい。

骨組織は、加齢やメカニカルストレス低下（廃用）により、骨量減少や骨質低下が生じ、骨が脆くなる。骨での SOD1 欠損や SOD2 欠損はいずれも細胞内 O_2^-バランスの破綻を引き起こし、異なるメカニズムで加齢依存的に骨量減少を引き起こす。さらにメカニカルストレス低下（廃用）による骨量減少過程で、骨細胞内の O_2^-産生増加とともに SOD1 の代償的な発現増加が認められた。SOD1 欠損による運動器組織の加齢様変化や骨粗鬆症患者血漿での SOD 活性低下の報告から、ロコモティブシンドローム発症過程での SOD1 の保護的役割がわかる。さらに抗酸化剤投与で、メカニカルストレス低下による骨量減少が有意に抑制されることから、骨組織での細胞内 O_2^-バランス維持の重要性が明らかとなった。

一方、関節内の軟骨組織では、加齢やメカニカルストレス負荷による軟骨変性過程で、軟骨細胞内のミトコンドリア O_2^-産生増加とともに SOD2 発現低下が認められた。さらに軟骨細胞での SOD2 選択的欠損が加齢に伴う軟骨変性を自然発症すること、メカニカルストレス負荷のよる軟骨変性を増悪することを明らかにしている。また関節腔内への抗酸化剤投与で、O_2^-バランスが正常化した。並行して変形性関節症ヒト変性軟骨組織での SOD2 酵素減少が報告され、SOD2 の組織保護作用も注目されている。

以上の実例から、SOD1 と SOD2 はそれぞれ細胞質とミトコンドリアでの O_2^-バランス制御を介し、細胞の恒常性維持や病態形成において重要な役割を担うこと、さらにメカニカルストレスによる刺激が O_2^-代謝酵素 SOD 発現を変化させることで O_2^-の恒常性に影響を与えることが明らかとなった。

文献： Nojiri, H. *et al.* JBC (2006), Uchiyama, S. *et al.* JBC (2006), Shimizu, T. *et al.* GGI, (2010), Kuwahara, H. *et al.* FRBM, (2010), Nojiri, H. *et al.* JBMR (2011), Murakami, K. *et al.* JBC (2011), Noda, Y. *et al.* BR (2012), Morikawa, D. *et al.* JBMR (2013), Morikawa, D. *et al.* JSES (2014), Watanabe, K. *et al.* BMRI (2014).

Superoxide, SOD, mechanical stress

講演番号：4SY21-7
講演日時、会場：3 月 29 日 11:35～ A 校舎 37 会場

サルコペニアとアミノ酸
Sarcopenia and Amino Acid

○小田嶋 文彦、小林 久峰（味の素株式会社）
○Fumihiko Odashima, Hisamine Kobayashi (Ajinomoto Co., Inc.)

サルコペニアと呼ばれる加齢に伴う骨格筋量の減少と筋力の低下は、それ自身がロコモティブシンドロームのひとつであるだけでなく、間接的にも骨や関節の障害を介してロコモの原因となる極めて重要な現象である。更にサルコペニアは身体活動能力の低下を引き起こしてフレイル(老衰)の原因にもなるため、介護リスクを減らし健康長寿の延伸を図るためにはその予防対策が必要である。

サルコペニアの原因は複合的であるが、タンパク質代謝の面では、骨格筋タンパク質の分解量が合成量を上回ることによる骨格筋量の減少が生じる。ところが、基礎状態（安静空腹時）においては、筋タンパク質代謝の加齢による変化はあまり顕著でない。筋タンパク質合成を促進する最も重要な因子はタンパク質の摂取であり、特にタンパク質中の必須アミノ酸が重要であるが、実は高齢者では、この必須アミノ酸による骨格筋のタンパク質合成反応が減弱している。

必須アミノ酸の中でロイシンは、mTORC1 の活性化を介し、筋タンパク質合成開始のシグナルとなることが知られているが、必須アミノ酸中のロイシンの割合を 40%に高めた場合、高齢者の骨格筋タンパク質合成をより促進することが判明した。さらに高齢女性において、このロイシン高配合必須アミノ酸(Amino L40)の 3 g の摂取により、20 g のホエイプロテインを摂取した場合と同等の筋タンパク質合成促進を引き起こすことを見出した。またサルコペニア日本人高齢女性を対象とした、12 週間の週２回の中等度の運動とロイシン高配合必須アミノ酸の組合せによる RCT 試験により、筋量、筋力、歩行速度が改善することが確認された。

これらの知見に基づき、必須アミノ酸の苦味を改善する等の配合設計を行った顆粒およびゼリー形態の製品を、昨年から販売を始めている。消費者から高評価をいただいているのみならず、老年医学や整形外科の医師からも関心を寄せられ、現在複数の介入試験が動いている。

Amino L40 がどの程度健康長寿の延伸に貢献できるか、これからの研究に期待されるが、実用化にこぎつけることができたのは、基礎研究のみならずヒトでの RCT 試験や配合設計を含む様々な応用研究を組み合わせたためである。ここ暫くは分子生物学等の基礎研究の発展が目立っているが、農芸化学の本来の中心は応用科学であると思う。例えばロコモティブシンドローム対策に繋がる様々な基礎研究が世の中に実際に役立つ形に仕上がるよう、応用研究を推進することも農芸化学の果たすべき役割の一つではないかと考える。

sarcopenia, leucine, Amino L40

講演番号：4SY22-1
講演日時、会場：3 月 29 日 13:40～ F 校舎 22 会場

複雑微生物系－ひとつの生態系としての理解と利用－
Microbial communities as complex systems

○春田 伸（首都大）
○Shin Haruta (Tokyo Metropolitan Univ.)

組織化された全体を意味する「系」という概念が科学に導入されたのは、19 世紀初頭、物理学者によると言われる。ほぼ同じくして、生物（群）をその生育環境とのかかわりとの関係で理解しようとする「生態学」が確立されてきた。ただし、環境中で多様な個体群（集団）が群落（群集）を形成している全体を考える「生態系」という言葉の登場は、20 世紀になってからである。微生物については、その検出・識別が容易でなかったために、「微生物生態系」が広く認識されるには、時間を要したが、分子生態学的手法をはじめとする解析技術の進展によって、「微生物生態学」にも従来の生態学の考え方・知見・理論が広く取り入れられるようになってきている。

堆肥化過程の微生物生態系は、ヒトの腸内細菌叢と同様に、地球上でもっとも構成個体密度が大きい生態系のひとつである。生物要素と非生物要素が密に相互作用し、空間的に不均一に分布するばかりでなく、時間によって変化する系である。このような複雑な微生物生態系を理解していくのに、まずは次の三つの視点が有効ではないだろうか。

【微生物間相互作用】二種の微生物を混合培養すると、時として、単一では達成できない機能を発揮する。また、競争や捕食といった負の相互作用も知られ、系の安定化に寄与する。これらは、堆肥化の微生物生態系に求められる多機能性に重要な点である。

【低活動状態】休眠等として知られるように微生物は、時として、活動を低く抑え、増殖をほとんどしない状態になる。これは、流入する基質の質・量ともに変動の大きい生態系に対して、機能的な多様性維持および攪乱への柔軟な適応に貢献するだろう。

【エネルギー分配】生態系の形成・維持は、生態系に供給されるエネルギーの分配によって支配される。堆肥化過程において投入される有機物を物質としてだけでなくエネルギー源として捉え、その分配・変換様式を解明することが、系としての特徴の理解に重要だろう。

このように、潜在的機能を含めた機能的多様性のプロファイルから、「系」を特徴づけ・評価することが、複雑系としての微生物生態系の効果的な開発・制御を含めた利用につながるのではないだろうか。発表では、上記、三つの視点で取り組まれた研究事例を紹介し、複雑微生物系の特徴について議論したい。

microbial ecosystems

講演番号：4SY22-2
講演日時、会場：3 月 29 日 14:05～ F 校舎 22 会場

堆肥化施設の苦悩と現場ニーズに対応したシステム開発

System development corresponding to the problem of composting facilities

○宮竹 史仁（帯畜大）
○Fumihito Miyatake (Obihiro Univ.)

堆肥化（コンポスト化）は、家畜ふん尿や食品残さ、有機性汚泥などを有機肥料に変換するリサイクル方法として古くから受け継がれてきた伝統的技術であり、作物生産に欠かせない肥料・資材の供給を担っている。しかし、その堆肥生産現場では今、施設の安定的な稼働を揺るがす２つの難題（悪臭問題を除いて）に直面している。

１つ目は、多大な電力を消費し、温室効果ガスを排出している堆肥化施設の現状である。堆肥化では堆肥材料へ効率的に空気を供給することで堆肥化微生物を活性化させ、堆肥品質の向上と発酵期間の短縮を図る。空気の供給には送風機を用いるが、送風機を動かす為に必要な電気料金が施設管理費の大半を占めており、著しい生産コスト高を招いている。また、電力使用による二酸化炭素排出に加えて、堆肥化反応過程では強力な温室効果ガスである亜酸化窒素やメタンも発生することが問題視されつつあり、その対策が急務となっている。

２つ目は、経験則に依存する堆肥化施設の現状である。堆肥化は農業の伝統的手法であり、その製造はいわば経験に依存するところも多い。しかし、「堆肥化が上手くいかない」という事例が数多く見受けられる。これは、長い歴史上前例がないほど大量の生物系廃棄物が集中的に排出され、伝統的に培った経験だけでは現状の堆肥製造に対応できないからである。しかしその一方で、良質な堆肥を製造するための学術的研究は国内外問わず多数報告されている。それにも関わらず、現場では良質な堆肥生産管理に反映されていないことが極めて多い。つまり、学術的研究成果の蓄積が実際の堆肥生産現場に有機的に繋がっていないことが多いのも事実なのである。

これらを解決するためには、誰にでも大量の生物系廃棄物を安定的に資源化し、且つ、省エネで環境負荷の少ない「科学に裏打ちされた堆肥化システム」を創造することが求められている。

本講演では、当研究室で実用化させた「送風機の省エネ化および温室効果ガスの排出抑制を可能にする堆肥化システム」を中心に実際の現場での稼働例や今後のビジョンを示しながら、施設工学的な観点による堆肥化施設の未来を議論したい。

Composting, Energy saving, Greenhouse gases

講演番号：4SY22-3
講演日時、会場：3 月 29 日 14:30～ F 校舎 22 会場

畜産廃水処理システム由来の固形廃棄物の堆肥化における環境負荷低減化

Reducing environmental impact in composting of solid wastes from livestock wastewater treatment system

○大坪 和香子[1]、上田 英代[2]、上田 裕一[2]、渡辺 昭[3]、宮内 啓介[1]、遠藤 銀朗[1]([1]東北学院大学、[2]有限会社日本ライフセンター、[3]水 ing 株式会社)
○Wakako Ohtsubo[1], Hideyo Ueda[2], Yasuichi Ueda[2], Akira Watanabe[3], Keisuke Miyauchi[1], Ginro Endo[1] ([1]Tohoku Gakuin Univ., [2]Japan Life Center Co., [3]Swing Corporation)

畜産廃水処理プロセスでは、家畜糞尿の固体残渣や反応槽由来の余剰汚泥など、高濃度の窒素化合物を含む固形廃棄物が発生する。これらの固形廃棄物を混合し堆肥化資材として利用することは、資源循環型社会の実現に役立つだけではなく、廃水処理システムの環境負荷低減にも有効である。一方で、堆肥化プロセスにおいて温室効果ガスである亜酸化窒素（N_2O）が発生してしまうことが問題となる。我々の研究グループは、養豚場廃水処理システムからの N_2O 発生抑制を目的としたパイロットプラント実験を行ってきたが、そのプラント由来の固形廃棄物を用いて堆肥化を行うと、堆肥化開始後の極めて早い時期に N_2O が発生することが確認された。一方、我々の以前の研究によりアンモニア臭の削減や肥効成分生成の促進に有効であることが確認されている高温前処理（Hyperthermophilic Pre-treatment Process、HTPRT）を施した固形廃棄物を堆肥化した場合には、堆肥化速度の増大が見られただけではなく、N_2O 発生時期は 3 週間程度遅延しその発生量も減少した。HTPRT の適用の有無と堆肥化プロセスにおける N_2O 発生の関連性を明らかにするために、無機窒素化合物の変化とそれに伴うアンモニア酸化細菌および脱窒細菌の群集構造の変遷を調べたところ、HTPRT を行った堆肥化プロセス（HTPRT 法）では、行わなかった従来法と比較して細菌の存在量や種構成が大きく異なっていた。それぞれの堆肥化プロセスにおけるアンモニア酸化細菌の出現時期は N_2O 発生時期の直前であったことから、従来法の堆肥化プロセスにおける早期 N_2O 発生は、堆肥の原料である固体残渣や余剰汚泥中に存在するアンモニア酸化細菌や脱窒細菌に起因することが考えられた。本研究では、畜産廃水処理システム由来の固形廃棄物の堆肥化において、廃水処理槽由来の硝化脱窒微生物の活性が急速な N_2O 発生の要因となり得ること、また HTPRT 法による高温前処理がそれらの微生物の非活性化に有効であることが明らかになった。将来的には、特定の硝化脱窒微生物が非活性化される温度処理条件を検討することにより、畜産廃水処理汚泥等の堆肥化プロセスにおける N_2O 発生量や発生時期のコントロールが可能になることが期待される。

composting, nitrous oxide, wastewater treatment

講演番号：4SY22-4
講演日時、会場：3 月 29 日 15:10～ F 校舎 22 会場

畜産農家をレスキューする堆肥化促進・消臭資材

Aerobic composting of livestock manure by thermophiles and enzymes

○木邑 敏章（トヨタ自動車 バイオ・緑化研）
○Toshiaki Kimura (Toyota Mortor Corporation)

国内では、約 9000 万トンの畜産廃棄物が、毎年排出されている。2004 年に本格施行された家畜排せつ物法により、野積み・素掘りは禁止され、一定規模以上の多くの農家は、事実上堆肥化を行わないと農場外に持ち出せないようになっている。

堆肥化は、農業・畜産業等から発生する有機物を微生物の働きにより分解し、植物の吸収しやすい状態にする、昔から一般的に行われている技術である。

畜産農家にとっては、減容・減量ができる大変有効な処理技術である一方、堆肥化作業は、多大な労力と時間がかかる骨の折れる作業である。

また、堆肥化は、近隣住民に対しての悪臭問題、硝酸態窒素等の水質問題、メタンガスや亜酸化窒素による温室効果ガスの問題など、環境に大きな負荷を与えている。

近年、政府は、化成肥料の高騰や環境保全の観点から、堆肥の利用を促しており、また、多くのバイオマスタウンにおいて、堆肥センターが設置され運用されている。しかしながら、品質にばらつきがある等の理由で、耕種農家に、畜産廃棄物由来の堆肥が十分に利用されているとは言い難い状況である。

これらの①環境負荷軽減、②畜産農家の負荷軽減、③資源循環の促進という課題解決のために、2006 年から「畜産バイオマス事業」として、堆肥化促進資材「resQ45」シリーズの販売を開始した。

本講演では、同シリーズの中から、「豚レスキュー」、「モーレスキュー」について、含まれる微生物 TAB7 株の特長や、現場での実例を交えて、その評価方法の開発[1)]も含めて報告する。

畜糞処理から「ものづくり」へと変わるために何が必要かを考えたい。

1) におい・かおり環境学会誌 Vol. 45, 29-37 (2014)

composting, livestock, Bacillus

講演番号：4SY22-5
講演日時、会場：3 月 29 日 15:35～ F 校舎 22 会場

家畜ふん堆肥の肥料代替を進めるためのペレット成型と窒素付加

Animal manure compost as a substitute for chemical fertilizer. - Pelletizing and nitrogen enrichment

○荒川 祐介（農研機構・九州沖縄農研）
○YUSUKE ARAKAWA (NARO-KARC)

有機性資源の循環利用は持続可能な循環型社会の形成のために大変重要な課題である。わが国は肥料原料のほぼ全量を海外資源に依存しており，その需給状況に肥料価格は左右されやすく農家経営への影響も大きい。家畜ふん尿等有機性資源に含まれる肥料成分を有効に利用して化学肥料を節減することは肥料自給率を向上させる上で重要である。家畜ふん堆肥は良質な土づくり資材と認識されているが，散布作業は重労働であり農業従事者の高齢化等による労力不足が深刻である。また，総じて家畜ふん堆肥はリン酸・カリ成分に比べて窒素成分が少ない。家畜ふん堆肥を土づくり資材として用いるだけでなく，肥料として有効に使うため広域流通性並びに取扱性の一層の改善が求められている。

家畜ふん堆肥ペレットは家畜ふん堆肥を乾燥し，直径 5 ㎜程度，長さ 10 ㎜程度の円筒状に圧縮成型加工したものである。堆肥のペレット化は取扱性の改善，汎用管理機による施用可能化，成分や肥効の均質化，貯蔵性の改善，流通コストの低減などの多くの利点があり（薬師堂，2002），発酵鶏糞ペレットを中心に全国で生産・流通が進んでいる。堆肥のペレット化は，上記の多くの利点に加えてリン酸肥効の向上についても利点が認められる。作物によるリン酸の吸収量はペレット化により増大し，リン酸の吸収利用率はコマツナで 8.6 %から 12.6 %へ，ソバで 16.3 %から 24.5 %へと大幅に向上した。堆肥ペレットのリン酸利用率は水溶性リン酸を主成分とする過燐酸石灰と同等程度に改善した（荒川，2012）。堆肥をペレット化することで，堆肥中のリン酸の土壌固定が軽減されたためと推定される。

家畜ふん尿の堆肥化過程では，好気的発酵により大量のアンモニアが発生する。このアンモニアを吸引し完熟の牛ふん堆肥を用いて吸着脱臭する技術が開発された（田中，2009）。堆肥に吸着したアンモニアは硝化されるため窒素付加された堆肥はほとんど臭わない。2～3 か月の吸着処理を経ることで，乾物あたり 2 %程度だった牛ふん堆肥の窒素濃度を 4 %まで高めることができる。この窒素付加堆肥に含まれる窒素成分は速効的でありおよそ 7 割が有効であった（荒川，2010）。

家畜ふん堆肥の肥料価値を高めるためのペレット化や窒素付加等により平均的な農家が化学肥料感覚で利用可能な形態・特性を備えた″肥料″として使える資材を開発することは，家畜ふん堆肥の需要を喚起し，資源循環を成立させる一助になる。こうした技術は家畜ふん尿に限らず，都市から生じる食品残さその他の有機性資源から生産される堆肥の流通を進める上でも役立つであろう。

compost, pellet, phosphorus

講演番号：4SY22-6
講演日時、会場：3 月 29 日 16:00～ F 校舎 22 会場

硝酸発酵・・・根と土壌を解明するブレークスルー

Nitrate fermentation - breakthrough for elucidation of roots and soil

○篠原 信（農研機構）
○Makoto Shinohara (NARO)

農学では、重要であることが知られていながら解析が極めて困難だったブラックボックスが二つある。植物の根と土壌である。根は土壌粒子に埋没し、直接観察したりリアルタイムでサンプルを採取したりするのが困難である。このため、植物組織の最重要器官であることが分かっていながら十分な研究が及んでいなかった。また土壌は、サンプル採取の場所が１センチずれただけで鉱物種も微生物種も異なり、あまりに混沌としていて、再現性のあるデータを回収しにくい。食糧生産の要である根と土壌がブラックボックスのままであることは、農学研究において痛恨事であった。最大の問題は、有機質肥料を使おうとすれば土壌を使うしかない、すなわち「人工的に土壌を模倣することができない」ことであった。土壌は有機物を分解し、無機養分を生成して植物を育てる機能を備える。しかし非土壌に有機物を鋤き込んでも腐敗し、植物も根が傷害を受けて育たない。これは、土壌では有機物の分解が２段階（アンモニア化成、硝酸化成）で進むのに対し非土壌では１段階（アンモニア化成）で分解が止まってしまうためである。非土壌で硝酸化成が進まないのは、この反応を触媒する硝化菌が有機成分でダメージを受けやすく、非土壌では容易に活性を失うためである。有機物から硝酸を生成する「硝酸発酵」とも呼ぶべき機能を非土壌で再現できず、雑多な集合体のままである土壌で栽培せざるを得ないことが、根と土壌を解析困難な研究対象としてきた。

筆者は並行複式無機化法と呼ぶ新手法により、土壌微生物を硝化菌ごと培養することに成功し、非土壌（水あるいは人工樹脂などの多孔質素材）による硝酸発酵を実現した。いわば非土壌を「土壌化（Soilization)」する技術である。この技術の成功により、養液栽培（土壌を用いない栽培法）が誕生して１４０年来、不可能とされてきた有機質肥料の養液栽培での利用を可能にした（有機質肥料活用型養液栽培)。高品質、高収量で野菜などの食糧を生産することができる実用的にも有望な栽培技術であり、国内の生産者に普及しつつある。

この栽培技術は研究面でも大きなアドバンテージを有する。栽培装置の蓋を開ければ根を直接観察することができ、根と根圏微生物が相互作用する様子をリアルタイムで解析することができる。また、バーミキュライトやゼオライトなど、特定の鉱物を土壌化することにより、鉱物種ごとの根圏微生物への影響を調べることができる。有機質肥料活用型養液栽培は、根と土壌という二つの巨大なブラックボックスを解析的に研究することを可能にした。根と土壌の解明が進めば、農業技術に飛躍的な革新をもたらすことが期待される。

nitrification, multiple parallel mineralization, biofilm

講演番号：4SY23-1
講演日時、会場：3 月 29 日 9:03～ G 校舎 41 会場

久慈産琥珀と山菜のシドケ（モミジガサ）の生物活性物質のケミカルバイオロジー
Chemical Biology of the biological compounds from Kuji amber and *Cacalia delphiniifolia*

○木村 賢一 (岩手大農)
○Ken-ichi Kimura (Iwate Univ.)

岩手県は首都圏（東京、神奈川、千葉、埼玉）より面積が広く、様々な天然資源や山海の幸が豊富な県である。我々は、地域特有の天然資源から、各種疾病に関わる遺伝子の変異酵母株（病気の酵母）の生育回復活性（病気の予防・治療活性）を指標に、構造や活性が新規の生物活性物質の探索とそのケミカルバイオロジー研究を行い、地域に新産業を興すことを目指している。

久慈産琥珀は、約 8500 万年前の中生代白亜紀後期の植物の樹脂の化石であるが、Ca^{2+}シグナル伝達に関わる遺伝子変異酵母 *Saccharomyces cerevisiae* (*zds1*Δ *erg3*Δ *pdr1/3*Δ)株を用い、アルコール抽出エキスからノルラブダン型の新規物質 kujigamberol [1~3]を見出した。また、山菜のシドケ（モミジガサ）は、北東北と北海道で主に食されているが、がんに関わる遺伝子変異酵母（*cdc2-1 rad9*Δ）株を用い、既知のセスキテルペンエンドパーオキサイド化合物 EDBD を見出した [4]。

Kujigamberol は、ロシア産琥珀（約 4500 万年前）、ドミニカ産琥珀（約 2000 万年前）、並びにミャンマー産琥珀（約 9900 万年前）には含まれていない久慈産琥珀特有の物質で、カルシウムイオノフォア A23187 刺激によるラット好塩基球白血病細胞 RBL-2H3 の脱顆粒と Ca^{2+}流入を、いずれも毒性の無い 10 μM で抑制した。また、オバルブミンと水酸化アルミニウムゲル混合物で感作したモルモットのアレルギー性鼻炎モデルの鼻腔抵抗を、2 μg の点鼻投与で 42%抑制した。さらに久慈産琥珀抽出エキス（kujigamberol を 5～10 mg/g 含有（HPLC 分析））でも、同様の効果が認められた。

一方 EDBD は、ヒト急性前骨髄性白血病細胞 HL60 において Fe^{2+}でラジカル体に変化し、p38 の活性化を介してアポトーシスを誘導すると同時にネクローシスも引き起こし、ヒトメラノーマのゼノグラフトモデルにおいて、25 mg/kg (*iv*)で体重に影響なく腫瘍重量を 38%抑制した。

さらなる機能性の科学的証明のための基礎研究を推進しながら、前者の久慈産琥珀抽出エキスは身体に優しい化粧品、日用品としてのスプレー、家具・建築物の表面加工などとして、また後者のシドケは、加工法を工夫した新たな食品として企業様にご利用頂き、岩手県を中心とした東北地域の活性化につなげていきたい。

【参考文献】

1) K. Kimura, *et al.*, *Fitoterapia*, **14**, 567-574 (2012)、2) 特許第 5590286 号、3) Y.-Q. Ye, *et al*., *Bioorg. Med. Chem. Lett*., **22**, 4259-4262 (2012)、4) K. Kimura, *et al*., *Bioorg. Med. Chem*., **20**, 3887-3897 (2012)

Kuji amber, Kujigamberol, *Cacalia delphiniifolia*

講演番号：4SY23-2
講演日時、会場：3 月 29 日 9:33～ G 校舎 41 会場

ヤマブドウの健康機能性

Health function of Yamabudo (Vitis coignetiae Pulliat)

○長澤 孝志[1]、小浜 恵子[2] ([1]岩手大農、[2]岩手県工業技術センター)
○Takashi Nagasawa[1], Keiko Kohama[2] ([1]Iwate Univ., [2]Iwate Industrial Res. Inst.)

ヤマブドウ（*Vitis coignetiae* Pulliat）は、一般的に生食やワインとして利用されるブドウとは異なり、日本に自生する日本固有の種である。ヤマブドウの果実は１cmほどで、種子が大きく、皮も厚く可食部が少ない。岩手県では以前からヤマブドウの果汁やワインなどの特産品が製造されてきたことから、ヤマブドウの全国生産量の半分（約300t）は岩手県で生産されている。

ヤマブドウ果汁中にはキャンベルなどの黒色系ブドウと同様にポリフェノールが豊富（2,071±534mg/l Folin-Denis 法による没食子酸換算）に含まれている。主要アントシアニン色素はマルビジン-3,5 ジグルコシドである。さらにプロアントシアニジンも多く含まれている。ヤマブドウ独特の強い酸味は酒石酸（1.0g /100mlとリンゴ酸（1.4g/100ml ）で、キャンベル果汁のそれぞれ約３倍及び２倍含む。

私たちは、ヤマブドウ果汁の搾汁後の粕にも相当量のポリフェノールが残存していることから、搾りかすからポリフェノール量が60%含む粉末を製造した。このポリフェノールの構成成分は、プロシアニジンB1、(+)-カテキン、プロシアニジンB2、(-)-エピカテキンが確認され、プロアントシアニジンは平均重合度が４～５（チオール分解による測定）であった。ヤマブドウしぼり粕から抽出したポリフェノール素材（は、「エヴィノール」の商品名でヤエガキ醗酵技研(株)より販売されている。

ヤマブドウポリフェノールは強い抗酸化性を有していると同時に、グリケーション抑制活性も認められた。ヤマブドウポリフェノールを0.5%含む食餌を１か月間与えたストレプトゾトシン誘発１型糖尿病モデルラットにおいて、腎臓や肝臓グリケーション後期段階生成物（AGE）の生成を有意に抑制することが示された。また、AGE生成に関与する反応性の高いα-ジカルボニル化合物の生成も抑制することが認められた。これらの結果は、ヤマブドウポリフェノールが糖尿病合併症の原因となるAGEの蓄積を軽減する可能性を示しており、健康機能性素材としての有用であると考えられる。

加齢とともに皮膚組織においてもAGEなどの生成が進み、皮膚の張りや弾力が無くなると言われている。ヤマブドウポリフェノールは、*in vitro*におけるコラーゲンのグリケーション抑制が示されている。また、東京農工大学の野村教授との共同研究で、皮膚光老化モデルマウス（Hos：HR-1 系ヘアレスマウスUVB 照射）にヤマブドウポリフェノール（ＰＰ）を経口投与した結果、表皮肥厚化の軽減及び皮膚水分量の有意な上昇を見出した。このようにヤマブドウポリフェノールは皮膚老化を軽減することから、今後の美容系の素材としても活用できる可能性がある。

ヤマブドウポリフェノールは、以上のような優れた健康機能性を有しているが、これを利用した商品はまだ多くない。今後、生産者と加工企業、販売企業、消費者全体を見通した販売戦略が必要であろう。

proanthocyanidine, dibaetes, glycation

講演番号：4SY23-3
講演日時、会場：3 月 29 日 10:03～ G 校舎 41 会場

水産物（ナマコ）および農産物（雑穀）の機能成分を活用した地域産業支援

Support of local activities using functional ingredients of sea cucumber and millets.

○矢野 明[1]、岸 光男[2] ([1]岩手生工研、[2]岩手医科大)
○Akira Yano[1], Mitsuo Kishi[2] ([1]IBRC, [2]Iwate Med. Univ.)

東日本大震災時の津波は三陸沿岸の各種施設を破壊したが、その中には稚ナマコの増殖施設も含まれていた。中国の経済発展に伴い、ナマコ漁は北東北から北海道沿岸漁業における収益源の一つとなっていたが、震災による漁獲停止と風評被害が重なった結果販路が失われ、岩手県からの輸出は震災前の状況には戻っていない。我々は、国内向けに新たなナマコ販路創出をめざし、高齢者向け抗真菌食品の開発研究を実施してきた。

現在、介護食等の高齢者向け食品開発は一つのトレンドとなっている。中国におけるナマコは典型的な高齢者食の一つであり、日本国内においても介護食として活用できる可能性が考えられた。コラーゲンに富むナマコは高齢者向けの良質のタンパク質源として有用であり、さらに抗真菌成分も活用できる。認知度は低いが、真菌は高齢者や要介護者において対処すべき問題の一つであり、口腔真菌（カンジダ）の増殖が報告されている。カンジダは口腔常在菌の一種であるが、強いストレスへの暴露や免疫力低下などに伴い舌表面や頬粘膜で増殖し、口腔カンジダ症を発症する。実際、震災後の仮説住宅居住者では、カンジダ検出率が同年代の高齢者と比較し有意に高い。口腔は食を担う重要な器官であり、舌を含む粘膜は繊細な感覚器である。カンジダから口腔を守るために、ナマコの持つ強い抗真菌活性は有用である。我々は、地域企業とナマコを原料とした抗真菌活性のある美味しいゼリーを試作し、要介護高齢者を対象とした介入試験を実施した。その結果、ナマコ摂取群において口腔内のカンジダが有意に減少することを確認した。抗真菌活性を持つ高齢者向け食品は、今後有望な新しい機能性食品と考えられ、ナマコの国内需要の喚起につながると考えている。

一方、震災後の風評被害は、岩手県内陸の特産品である雑穀生産にも影響を与えた。安全安心な健康食品として認知されている国産雑穀であるがゆえに、被災地域で生産される雑穀の使用を避ける企業が多く、販路が閉ざされた。岩手県ではアワ新品種の投入によりイメージの刷新を図り、状況の打開を目指しており、我々は成分分析や機能研究により普及支援を実施している。

雑穀は、多品種のブレンドを白米に混ぜて食べるスタイルが定着しているが、使用される個々の穀物について、その品種や生産地等が注目される事は無かった。岩手県のアワ新品種「ゆいこがね」は黄金色の精白粒を特徴としているが、この黄色素がルテインとゼアキサンチンであることを確認した。特にゼアキサンチン含量はトウモロコシを越え、目の健康維持に有益な品種と考えられる。

Sea cucumber, Millets, Candida

講演番号：4SY23-4
講演日時、会場：3 月 29 日 10:33～ G 校舎 41 会場

理論に基づく水産加工食品の製造方法の開発

Development of the processing method of the fisheries processed foods based on principles

○三浦 靖（岩手大農）
○Makoto Miura (Iwate Univ.)

2011 年 3 月 11 日に発生した東北地方太平洋沖地震と余震，津波により発災した東日本大震災によって東北地方沿岸部は甚大な被害を受けた。岩手大学では，同年 10 月に岩手大学三陸復興推進本部を立ち上げ，釜石サテライトを設置して三陸沿岸の被災自治体に対して情報の収集・提供を行った。2012 年４月１日からは，全学組織の「岩手大学三陸復興推進機構」に改組し，教育支援部門，生活支援部門，水産業復興推進部門，ものづくり産業復興推進部門，農林畜産業復興推進部門，地域防災教育研究部門を編制して専任教員・研究員等を配置した。水産業復興推進部門は，水圏環境部門，水産・養殖部門，新素材・加工技術部門，マーケティング戦略部門から構成され，東京海洋大学および北里大学と連携して，『SANRIKU（三陸）水産研究教育拠点形成事業』を推進している。その後，久慈，宮古および大船渡にエクステンションセンターを設置した。2013 年 4 月には，三陸沿岸地域等の復興支援，水産海洋分野に係る研究開発・教育拠点として釜石サテライト棟を竣工して「岩手大学三陸水産研究センター」を設置した。一般社団法人国立大学協会・平成 23・24 年度震災復興・日本再生支援事業，いわて産学連携推進協議会・平成 24 年度研究開発事業化育成資金，公益財団法人さんりく基金・平成 25 年度研究開発シーズ事業化事業の研究開発費を得て，乾製品の前処理法と低温除湿乾燥法を確立し，2014 年 7 月末から「潮騒の一夜干し」を販売開始した。独立行政法人科学技術振興機構・平成 24～26 年度復興促進プログラム マッチング促進「風味豊かな岩手県産乾燥食品の製造方法，製造装置及び競争力のある新商品の開発」の研究開発費を得て，固体食品用ブランチング・殺菌・減圧乾燥装置の試験機とプロトタイプ機を製作し，サケ切り身とスライストマトに対するブランチング・殺菌と減圧乾燥の機能評価と運転条件の最適化を行っている。液体窒素噴霧式バッチフリーザー（日本エア・リキード株式会社より寄贈）を用いた品質保持型凍結・解凍法の普及を進めている。独立行政法人科学技術振興機構・平成 24～26 年度復興促進プログラム マッチング促進「低酸素気流を利用した粉体殺菌の研究および連続式殺菌装置の開発」の研究開発費を得て，粉体用閉回路型低酸素気流連続式殺菌装置の試験機，プロトタイプ機と実機レベルを製作し，ソバ粉等の殺菌機能の評価と運転条件の最適化を行っている。文部科学省・平成 24～27 年度東北マリンサイエンス研究拠点形成事業「三陸沿岸域の特性やニーズを基盤とした海藻産業イノベーション」の研究開発費を得て，藻体，多糖およびカロテノイドについて，安全性の検討，成分分析，食品加工素材として機能評価を行っている。また，脳血管障害の因子である高血圧の予防に向けて当該素材を用いた減塩食品の開発を進めている。

Sanriku Fisheries Research Center, processed foods, food engineering

講演番号：4SY23-5
講演日時、会場：3 月 29 日 11:03～ G 校舎 41 会場

サメの丸ごと利用で震災復興を

To recovery of the earthquake disaster with using of shark whole body

○野村 義宏[1]、上原 一貴[1]、渡部 睦人[1]、今井 直也[2]、高橋 滉[2] ([1]農工大農、[2]中華・高橋)
○Yoshihiro Nomura[1], Kazuki Uehara[1], Mutsuto Watanabe[1], Naoya Imai[2], Akira Takahashi[2] ([1]Tokyo Univ. A & T, [2]Chu-Taka)

サメは気仙沼港に集約的に水揚げされ、中華食材であるフカヒレ、練り製品の原料である肉、コンドロイチン硫酸の原料である軟骨と、全てが利用されている。先の東日本大震災により気仙沼のサメ加工業者が甚大な被害を受けており、当研究室で行ってきたサメの丸ごと利用に関する研究を進めることで、サメ加工業の再生の一助としたいと考えている。本シンポジウムでは、サメの肉、軟骨、皮を原料とした以下の研究を纏め紹介する。

① サメ肉の骨密度改善効果

17 週齢の卵巣摘出ラットにタンパク源としてサメ肉を 10%および 50%置き換えた食餌を 8 週間与え、後肢大腿骨の骨密度を DEXA で測定した結果、骨密度の上昇を認めた。また、破骨細胞分化誘導実験の結果、RANKL のみで刺激した群に比べサメ肉加水分解物を添加した群では、30%程度分化を抑制する効果が確認できた[*1]。

② コンドロイチン硫酸による変形性膝関節症(OA)の改善効果

コンドロイチン硫酸(CS)は、軟骨の主成分であるアグリカンの構成糖鎖である。コンドロイチン硫酸は、OA 症状を緩和する機能性素材として認知されているが、その効果に関する基礎的な研究が十分ではない。そこで、自然発症型 OA モデルである Str/ort マウスに CS を経口投与することで OA の改善効果を検証した。膝関節部の組織を解析した結果、軟骨組織構造の改善、炎症性細胞の減少が顕著であった。また、ウサギ滑膜細胞 HIG-82 に CS を添加することで、ヒアルロン酸（HA）合成酵素の遺伝子発現量の増加および産生する HA の高分子化が認められた。CS 摂取により滑膜細胞が産生する HA の高分子化により OA 症状が改善する可能性が示唆された[*2]。

③ サメ皮由来コラーゲンによる皮膚改善効果

紫外線暴露により誘導した光老化ヘアレスマウスに対し、コラーゲンおよび加水分解コラーゲンを塗布した結果、シワの改善および皮膚水分量が改善した。また、光老化ヘアレスマウスに対し加水分解コラーゲンを投与した結果、皮膚状態が改善する事も明らかとなった。

以上の結果から、サメ肉は骨粗鬆症改善が、軟骨は OA 改善が皮由来のコラーゲンは光老化の改善が期待できる機能性食品として利用が可能であり、これらの製造・販売を復活させることで、気仙沼の復興の一助になればと考えている。

*1, Uehara et al, Nutrition (2014); *2, 野村義宏 他, グルコサミン研究 9 (2014)

shark, collagen, chondroitin sulfate

講演番号：4SY23-6
講演日時、会場：3 月 29 日 11:33～ G 校舎 41 会場

サケ氷頭由来プロテオグリカンの機能性食品への応用

Application to functional foods of the proteoglycan derived from salmon head cartilage

○加藤 陽治（弘前大教）
○Yoji Kato (Hirosaki Univ.)

プロテオグリカンは，分子量数万から数十万のコアタンパク質と呼ばれる 1 本のタンパク質鎖に糖鎖グリコサミノグリカンが数本から数十本結合した生体高分子であり，コラーゲンやヒアルロン酸とともに動物組織における細胞外マトリックスの重要な構成成分である。このプロテオグリカンは，軟骨，骨，皮膚，腱，脳，血管壁などに多く含まれる。その役割として，皮膚の水分保持，関節の潤滑作用や緩衝作用などが知られている。

弘前大学および青森県では，文部科学省の各種事業の支援を受け，酢酸を抽出溶媒としたサケ鼻軟骨（氷頭：ヒズと呼ばれ，昔からヒズナマスとして食に供されてきた）からのプロテオグリカンの大量精製・生産技術を活用し，国内外に先駆け，機能性食品，アンチエイジング介護改善素材・スキンケア製品・オーラルケア製品・化粧品，医薬品及び医療素材等の開発をターゲットとする研究を進めてきた。プロテオグリカンの効果効能に関しては，培養細胞系やモデル動物における抗炎症作用や骨粗しょう症改善作用，炎症性腸疾患の改善作用，上皮細胞増殖因子様作用などが報告されている。現在，数多くのプロテオグリカン入り製品が市販されている。

われわれは，これまでの酢酸抽出法とは別に，新たな食品用プロテオグリカンの抽出・製造方法の開発に取組むと共に，抽出物の機能性評価を試みた。新たな抽出方法（水脱脂粉末化法や熱水抽出法）で得られる高分子量領域（500 万以上）に分布するヒアルロン酸及びコラーゲンと複合体を形成しているプロテオグリカン画分に高い光老化抑制効果（ヘアレスマウスに連日経口投与し，紫外線（UV-B）を連日照射する光老化の実験）があることがわかった。さらに，変形性関節症モデルマウスへの摂取実験において，分子量 180 万以上の高分子量プロテオグリカンは，変形性関節症の予防・治療効果があることが示唆されている。最近，熱水抽出法で得られた高分子量プロテオグリカンを豊富に含む食品原料（ヒアルコ PG®）を開発した。ヒアルコ PG®飲用のヒト臨床試験においても，有意な日焼け予防効果が確認されている。ヒアルコ PG®は美容・健康分野で機能性の高い食品原料として期待でき，ヒアルコ PG®を応用した商品開発が進められている。

Proteoglycan, Salmon nasal cartilage, Functional foods

ランチョンシンポジウムプログラム

本大会でのランチョンシンポジウムのチケットは，岡山大学津島キャンパス大学会館(受付と同じ場所)で開催日当日，27 日(金)は8:15 より，29(日)は 8:30 より配布します．チケットを受け取り，開始 5 分前までに会場にお越しください．空席がある場合は，チケットがなくても入場できます．

2LS01　男女共同参画ランチョンシンポジウム「仕事と子育て，ただいま生き生き奮闘中の先輩の話を聴いてみよう」

後　援：男女共同参画学協会連絡会
3 月 27 日（金）12:30〜13:20　E11 会場（一般教育棟 E 棟　1 階）
世話人：裏出令子（京大院農），越阪部奈緒美（芝浦工業大），川向　誠（島根大農），合谷祥一（香川大農），鈴木義人（茨城大農）
座　長：越阪部奈緒美（芝浦工業大），裏出令子（京大院農），鈴木義人（茨城大農）

12:30　2LS01–1　一食品メーカー社員をとりまく子育て・就業環境の実際……◦古川育代（江崎グリコ㈱）
　　2LS01–2　「大学での責任ある教育・研究活動」と「愛情をかけた子育て」の両立をめざして
……◦山根久代（京大院農）
　　2LS01–3　男性研究者の育児休業取得とその後……◦佐々木啓介（㈱農研機構 畜産草地研）
13:05　フリーディスカッション

4LS01　**JABEE** ランチョンシンポジウム「グローバル人材育成と教育改革 」

3 月 29 日（日）12:30〜13:20　E11 会場（一般教育棟 E 棟　1 階）
世話人：江坂宗春（広島大院生物圏，JABEE 対応委員会委員長）
座　長：金沢和樹（吉備国際大地域創成農），浅野行蔵（北大院農）

12:30　4LS01–1　グローバル人材育成と **JABEE**……◦江坂宗春（広島大院生物圏）
12:40　4LS01–2　乾燥地を利用したグローバル人材育成……◦本名俊正（鳥取大 学長顧問）
13:00　4LS01–3　グローバル時代の博士人材のキャリア選択機能
……◦三須敏幸（広島大(前科学技術・学術政策研究所)）

講演番号：4LS01-1
講演日時、会場：3 月 29 日 12:30～ E 校舎 11 会場

グローバル人材育成と JABEE

Development of global human resources and JABEE

○江坂 宗春（広島大 副学長）
○Muneharu Esaka (Hiroshima Univ.)

日本技術者教育認定機構 JABEE（Japan Accreditation Board for Engineering Education）は、1999 年に、技術者教育の振興、国際的に通用する技術者の育成を目的に設立され、大学や高専の技術者教育プログラムの審査・認定を行う一般社団法人である（http://www.jabee.org を参照）。JABEE は、2005 年にワシントンアコードへの加盟が認められ、国際的にも認知された技術者教育認定機関になり、従って、JABEE 認定プロプログラムは技術者教育の国際同等性が確保・保証されている。

JABEE 修了生は、技術士の第一次試験が免除され、登録を行えば、すぐに技術士補となれる。実務経験（通常 4 年間）を経た後、第二次試験に合格すれば、正式に技術士になることができる。

昨年までに、169 教育機関、474 プログラムが JABEE 認定を受け、修了生の累計は約 20 万人になる。認定・審査分野は 16 分野あるが、農芸化学会は「農学一般関連分野」に所属し、農学系 17 学会が加盟する農学会技術者教育推進委員会のもとで、「生物工学および生物工学関連分野」とも連携しながら、審査、普及、指導等の活動を行っている。農芸化学領域が含まれる JABEE プログラムは 6 プログラムのみであるが、生物工学および生物工学関連分野でも 6 プログラムが認定されており、広い意味では、12 プログラムが農芸化学系の JABEE プログラムと考えられる。

日本農芸化学会では、JABEE 対応委員会を組織し、JABEE 対応の活動を行うとともに、全国大会時に、以下のような JABEE・教育シンポジウムを開催してきている。

・2007 年度　「日本農芸化学会と JABEE」
・2008 年度　「農芸化学における魅力ある大学教育と JABEE」
・2009 年度　「農芸化学分野の大学院における技術者、研究者養成教育の改革」
・2010 年度　「農芸化学における教育改革と分野別質保証」
・2011 年度　「JABEE とキャリア教育」（東日本大震災で中止）
・2012 年度　「農芸化学における人材育成」
・2013 年度　「大学・大学院での教育改革と人材養成」
・2014 年度　「農学系人材養成に関する最近の取り組みについて」

最近、大学・大学院におけるグローバル人材育成の重要性が叫ばれ、教育改革が進展している。今回、農学分野において特徴的なグローバル人材育成のためのプログラムを紹介するとともに、グローバル時代における博士人材にも焦点をあてながら、農学系における人材育成について議論したい。

JABEE, global human resources, education

講演番号：4LS01-2
講演日時、会場：3 月 29 日 12:40～ E 校舎 11 会場

乾燥地を利用したグローバル人材育成

Developing globally competent human resources in arid land sciences

○本名 俊正（鳥取大農）
○Toshimasa Honna (Tottori Univ.)

鳥取大学は、「教育理念」である「知と実践の融合」の下に策定した「教育目標」や「教育グランドデザイン」が目指す人材像に加えて、これまで、「持続性ある生存環境社会の構築に向けて―沙漠化防止国際戦略―」を国際戦略に掲げ、農学部と乾燥地研究センターを中心に、乾燥地を中心とした開発途上国、新興国へ比較的長期間学生を派遣し、異文化、多言語、異環境下においてフィールド重視の実践教育を行うことにより、多様な文化を受容できる国際感覚及び厳しい自然、社会環境での高い国際活動能力も兼ね備えた心身ともにタフで国際通用性のある人材を育成してきた。

このような背景のもと、乾燥地における農業開発と環境保全の研究を基盤として、これまで実施してきた海外実践教育の実績と教育成果を「グローバル人材」の育成に広く世界展開しようとするものであり、「今後 50 年にわたりアジア・アフリカ・ラテンアメリカ等の開発途上国・新興国が国際社会に果たす役割の重要性を認識し、これらの国々の厳しい自然・社会環境に耐え、日本人としてそこに生きる人々と価値観を同化しながら、開発途上国・新興国の発展に貢献し、併せて心身ともにタフで実践的な能力と卓越したマネジメント能力を有し、深い専門知識(理論)と高い技術力(実践力)を体系的に修得することにより、進展しつつあるグローバル社会の中核として活躍できる人材の育成」を目指している。

乾燥地の研究の出発点は「不毛の地・鳥取砂丘」の農業利用である。江戸時代から様々な取組みが行われてきたが、防風林もなく、強風による飛砂のため、長い間文字通り不毛の地であった。昭和になり，鳥取大学の前身、鳥取高等農業学校の時代から、砂丘造林の試験が始まり、戦後、防風林の研究が進み、安定した防風林の内側が農地として利用されることが始まった。さらにスプリンクラーの導入により、飛躍的に生産性の高い豊かな農地として生まれ変わった。人口増とともに食料の増産が求められる時代であり、この技術は全国各地の砂丘地の農業開発に活用され発展した。長年にわたる研究、創意工夫と努力により、不毛の地「負」を豊かな農地「富」に変えたのである。その後、「不毛の地」であること、「水」の管理が困難なこと等の共通課題である世界各地の乾燥地において，農業開発，砂漠化防止，緑化保全の研究に発展し、多くの成果を上げてきた。

その成果の一つが人材育成である。乾燥地は不便な地域であり、生活そのものが大変である。研究には万全の準備が必要であり、現場ではさらに創意工夫が必要である。現地の方々の協力も不可欠であり、言葉も重要である。不便を創意工夫と協力で乗り越えた時、自立した人材が育成される。

Arid Land Regions, Global Human Resources, Tottori University

講演番号：4LS01-3
講演日時、会場：3 月 29 日 13:00～ E 校舎 11 会場

グローバル時代の博士人材のキャリア選択
Career Options for Doctorates in Globalized Society

○三須 敏幸（広島大学）
○Toshiyuki Misu (Hiroshima Univ.)

グローバル化が進展し、科学技術が日々高度化・複雑化する知識基盤社会においては、労働市場は益々流動化し、職業選択も多様化していくと考えられる。同様に、ポスドク等博士人材も任期付雇用や年俸制の導入に伴い、複数機関で研究活動に従事したり、URA などの研究職以外のキャリアを選択する機会も増えていくことが予想される。しかし、現状では、産業界における博士人材の知識・能力の活用は未だ十分に進んでおらず、また、我が国の研究者は国際的な頭脳循環から取り残されているといった認識がある中、グローバルに活躍できる博士人材の育成も急務となっている。

本発表では、博士人材の社会的好循環の構築とキャリアパス多様化を促進していく観点から、我が国の博士課程修了者のキャリアパスの多様性や国際流動性の現状を概観する。特に農学分野については、他分野に比べて、アジア諸国から留学生を集め、養成し、送り出すといった、国際的な頭脳循環のハブとしての特徴も有している。このような農学系博士人材のキャリアパスの特徴を踏まえた上で、今後の農学分野における研究活動及び人材養成が果たす役割について議論する。さらに、このようなグローバルな環境下においては、変化に柔軟に適応し、自身の能力と専門性を異なる分野や業種にも応用できる能力が益々重要となってくる。グローバル時代を生き抜くために必要なキャリア選択の在り方についても、キャリア理論の観点から考察を加える。

Career, Doctorates, Education

ランチョンセミナー　プログラム

本大会のランチョンセミナーのチケットは，当日の朝に岡山大学津島キャンパス大学会館（受付と同じ場所）にて配布します．
3 月 27 日（金）8：15～10：00，28 日（土）・29 日（日）8：30～10：00　チケット配布は，定員に達した時点で終了します．
参加証をカードリーダーで認証したうえでチケットを配布いたしますので，参加登録がお済みでない方は，まずは当日参加登録をお済ませください．　チケットは 12 時 30 分を過ぎると無効になります．その後は，チケットをお持ちでない方と同等の扱いとなりますのでご注意ください．　チケットをお持ちでない方は，ランチョンセミナー・ランチョンシンポジウムに参加できません．ただし，空席がある場合はこの限りではありません．

3 月 27 日（金）12：30～13：20

LS1　日東薬品工業株式会社　　A21 会場（一般教育棟 A 棟 2 階 A21 教室）

コーディネーター：小川　順（京都大学大学院農学研究科　教授）

腸内細菌，活かし活かされ

田辺 創一（広島大学大学院生物圏科学研究科　教授）
米島 靖記（日東薬品工業株式会社　菌研究課）

LS2　アジレント・テクノロジー株式会社　　A41 会場（一般教育棟 A 棟 4 階 A41 教室）

座長：榎本 俊樹（石川県立大学　生物資源環境学部　教授）

食品の機能性成分の効能と分析～北陸の農作物を例に～

鈴木 信孝（金沢大学大学院　医薬保健学総合研究科　特任教授）
滝埜 昌彦（アジレント・テクノロジー株式会社）

LS3　サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社　　B41 会場（一般教育棟 B 棟 4 階 B41 教室）

Orbitrap 質量分析計が可能とする広範囲な低分子化合物の検出・同定・定量～既知化合物から未知化合物まで～

高原 健太郎（サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社）

LS4　株式会社島津製作所　　B33 会場（一般教育棟 B 棟 3 階 B33 教室）

司会：奥村　毅（株式会社島津製作所　分析計測事業部）

トリプル四重極型質量分析計 **LC-MS／MS** を用いた食事由来ペプチドの検出と定量

佐藤 健司（京都大学大学院農学研究科　応用生物科学専攻）

LS5　株式会社林原　　E21 会場（一般教育棟 E 棟 2 階 E21 教室）

座長：辻　英明（岡山県立大学　学長）

「糖質と健康－糖尿病予備軍から高齢者まで－」
2 型糖尿病の発症・進展を抑えるためには，生活習慣への介入が重要である

松木 道裕（倉敷スイートホスピタル　院長）

トレハロースによる糖尿病リスクの低減　―美味しく健康的な食生活の提案―

新井 紀恵（株式会社林原 研究開発本部 応用研究部 食品・ヘルスケア素材課）

LS6　サントリーウエルネス株式会社　　G41 会場（教育学部本館 4 階 401 教室）

座長：柴田 浩志（サントリーウエルネス株式会社　健康科学研究所長）

時間栄養学における最新の研究動向

柴田 重信（早稲田大学先進理工学研究科 教授）

3月28日(土) 12:30〜13:20

LS7　タカラバイオ株式会社　A21会場（一般教育棟A棟2階A21教室）

CRISPR/Casシステムを利用した高効率なゲノム編集ツールのご紹介

井上 晃一（タカラバイオ株式会社　CDMセンター）

LS8　ダッソー・システムズ・バイオビア株式会社　A41会場（一般教育棟A棟4階A41教室）

「バイオ研究を支援するBIOVIAのソリューション」
コンピューターでタンパク質をデザインする

髙岡 雄司（ダッソー・システムズ・バイオビア株式会社）

簡単導入・簡単操作・低コストの電子実験ノートのご紹介

花岡 幸史（ダッソー・システムズ・バイオビア株式会社）

LS9　バイオ・ラッド ラボラトリーズ株式会社　B41会場（一般教育棟B棟4階B41教室）

ウェスタンブロッティングのトラブルシューティングフロー

佐藤　元（バイオ・ラッド ラボラトリーズ ライフサイエンス事業部 プロダクトサポート）

効率的なウェスタンブロッティング実験を支える製品ソリューション

中田 宣之（バイオ・ラッド ラボラトリーズ ライフサイエンス事業部 マーケティング）

LS10　ブルカー・ダルトニクス株式会社　B33会場（一般教育棟B棟3階B33教室）

超高分解能(UHR-)QToF質量分析装置が拓く新しいアプリケーションの可能性

瀧浪 欣彦（ブルカー・ダルトニクス株式会社　営業部　アプリケーション）

LS11　極東製薬工業株式会社　E11会場（一般教育棟E棟1階E11教室）

進行：白石 卓夫（極東製薬工業株式会社・バイオサイエンス部）

「分析をベースとした生物生産のための培地と培地原料」
液体クロマトグラフ質量分析計による培養プロファイリング解析

鈴木　崇（株式会社島津製作所）

ペプトン・エキス類の多面的成分分析

戸高　眠（極東製薬工業株式会社・製品開発部）

LS12　メルク株式会社 メルクミリポア事業本部　E21会場（一般教育棟E棟2階E21教室）

生体成分の分離精製に必ず役立つ！ HILICカラム・モノリス型カラムの特長と便利な使い方

深澤 三恵子（メルク株式会社メルクミリポアラボ・ジャパン事業本部マーケティング部）

LS13　株式会社明治　G41会場（教育学部本館4階401教室）

座長：杉浦 克己（立教大学　コミュニティ福祉学部　スポーツウエルネス学科　教授）

スポーツ栄養最前線〜乳たんぱく質のパワーを探る〜

藤田　聡（立命館大学　スポーツ健康科学部　教授）

3 月 29 日(日) 12:30〜13:20

LS14　味の素株式会社　　A21 会場（一般教育棟 A 棟 2 階 A21 教室）

独自のタンパク質発現系 CORYNEX®によるバイオ医薬品製造技術

松田 吉彦（味の素，バイオ・ファイン研究所）

LS15　天野エンザイム株式会社　　A41 会場（一般教育棟 A 棟 4 階 A41 教室）

座長：柴田 克己（滋賀県立大学　人間文化学部　生活栄養学科　教授）

オリゴ糖生成酵素による美味しい健康法

佐々木 誠人（愛知医科大学消化器内科（消化管部門）教授）

LS16　株式会社山田養蜂場　　B41 会場（一般教育棟 B 棟 4 階 B41 教室）

座長：中村 宜督（岡山大学大学院環境生命科学研究科　教授）

ブラジル産プロポリスの糖尿病発症予防効果
—脂肪細胞中の免疫細胞をターゲットとした予防メカニズムの検証—

北村　浩（酪農学園大学獣医学群　教授）

LS17　SPring-8／(公財)高輝度光科学研究センター　　B33 会場（一般教育棟 B 棟 3 階 B33 教室）

大型放射光施設 SPring-8 を利用したタンパク質結晶構造解析

熊坂　崇（(公財)高輝度光科学研究センタータンパク質結晶解析推進室　室長代理）

LS18　株式会社ファーマフーズ　　G41 会場（教育学部本館 4 階 401 教室）

「たまごが人類を救う！　たまご発バイオビジネス「着想の原点」に迫る !」

1）ヒナを護る生体防御物質“鶏卵抗体(IgY)”の機能性食品への応用　山下 裕輔

2）ヒナの誕生に隠された毛髪科学の発掘　原田 清佑

3）生命のゆりかご“卵殻膜”の神秘と化粧品への応用　青笹 正義

4）鶏足に秘められたヒアルロン酸産生物質“HA–Ⅱ”のパワー　丸　勇史

日本農芸化学会2015年度大会
日東薬品工業株式会社ランチョンセミナー

「腸内細菌、活かし活かされ」

2015年3月27日(金) 12:30～13:20
A21会場

コーディネーター：小川　順　先生
（京都大学大学院農学研究科　教授）



講演者：田辺　創一　先生
（広島大学大学院生物圏科学研究科　教授）

講演者：米島　靖記
（日東薬品工業株式会社　菌研究課）

ヒトは多生物からなる超生命体である、との新たな生命観が浸透してきています。実際に、腸内細菌の数は、ヒトの体細胞数60兆に対し500兆を超えるとされ、その種も500種を超えると言われています。このことからも、腸内細菌を活かすこと、腸内細菌と上手く付き合うことが、健康生活にとって大切であるという意識が高まっています。

腸内細菌の代謝産物により、ヒトの様々な生理機能が制御を受けているとの報告もあります。また、腸内細菌の一種である乳酸菌に関して、整腸効果、免疫賦活、アレルギー抑制などの様々な機能が見いだされ活用されるにいたっています。

本セミナーでは、乳酸菌機能の機構解明や機能性食品素材開発への応用に関する話題を、乳酸菌脂質代謝研究に端を発する新たな機能性脂質の開発例をまじえ紹介し、健康増進に向け腸内細菌を活かすこと、そして、腸内細菌に活かされることでもたらされる豊かな生活に思いを馳せてみたいと思います。

NITTO PHARMA
日東薬品工業株式会社

日本農芸化学会 2015 年度大会

アジレント・テクノロジー ランチョンセミナー LS2

共催： 日本農芸化学会 2015 年度大会 / アジレント・テクノロジー株式会社

食品の機能性成分の効能と分析
～北陸の農作物を例に～

座長：榎本 俊樹 先生（石川県立大学 生物資源環境学部 教授）

演者：鈴木 信孝 先生（金沢大学大学院 医薬保健学総合研究科 特任教授）
滝埜 昌彦（アジレント・テクノロジー株式会社）

厚生労働省は、「健康日本 21」、「スマート・ライフ・プロジェクト」、「健康な食事の普及マーク」など「健康長寿」に向けた様々な施策を開始しています。さらに、消費者庁も規制改革実施計画に基づき、「企業の責任において科学的根拠をもとにした食品の新たな機能性表示制度」を検討しています。新制度の対象食品は、安全性の確認と機能性関与成分の主要なものを分析しておくことが求められています。

本ランチョンセミナーでは、北陸の農産物の一つである「ハトムギ」をとりあげ、ハトムギの機能性および産官学連携による研究開発について講演します。また、アジレント LC/Q-TOF によるハトムギ成分を分析と網羅的解析についてもご紹介します。

- 農商工等連携事業としてのハトムギエキスの研究開発
- ハトムギエキスを用いた 2 重盲検臨床試験
- ハトムギ抽出物中の分析と網羅的解析

日時：2015 年 3 月 27 日（金） 12：30 ～ 13：20
会場：岡山大学 津島キャンパス 教養 A 棟 4 階 A41

アジレント・テクノロジー株式会社
〒192-8510 東京都八王子市高倉町 9-1
Tel. 0120-477-111 / email_japan@agilent.com
http://agilent.com/chem/jp

The Measure of Confidence

Agilent Technologies

日本農芸化学会2015年度岡山大会 LS3　教養B棟4F B41　3月27日(金) 12:30–13:20

Orbitrap質量分析計が可能とする広範囲な低分子化合物の検出・同定・定量
～既知化合物から未知化合物まで～

サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社

演者：高原 健太郎

研究対象となる化合物は、アルコール、アミノ酸、糖、脂質、二次代謝物など非常に多岐にわたります。特に生体試料を測定する場合、多様な化合物の混合物の分析が求められるため、標的対象化合物をいかに特異的に検出できるかが分析の鍵となります。近年、実用的となってきた精密質量分析計は、化合物が普遍的に持つ性質である質量を正確に観測することで検出の特異性を高めることができます。特に弊社独自の技術であるOrbitrap質量分析計は、わずかな質量の違いを識別できるため、*m/z*により混在する化合物から標的対象化合物を識別できます。同じ組成式を持っていても化学構造が異なる異性体は、質量で識別できません。その場合、質量分析計の前段の分離部が選択性に大きく寄与します。対象化合物の化学性質に応じて最適な分離技術が異なるため、本発表では液体クロマトグラフィーとイオンクロマトグラフィーを中心に、化合物群ごとに適切な解析例をご紹介します。メタボロミクス研究に代表されるように、標的対象化合物は必ずしも既知化合物ではなく、未知化合物であることもあります。Orbitrap質量分析計は、未知化合物の構造同定に寄与する精密質量情報と高分解能MS^nによる構造情報を高精度で取得できます。さらにOrbitrapアナライザーの実測の多段階MS^nデータを収載したmzCloudライブラリは、未知化合物の構造解析に有益な情報をもたらします。

本セミナーでは、これから質量分析計で生体低分子を測定する研究者に、どのような分析装置を採用あるいは導入すべきかについてご提案いたします。



●問い合わせ先
サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社　〒221-0022 横浜市神奈川区守屋町 3-9
フリーコール Tel.0120-753-670　Fax.0120-753-671
E-mail.Analyze.jp@thermofisher.com　www.thermoscientific.jp

Thermo SCIENTIFIC

SHIMADZU
Excellence in Science

日本農芸化学会2015年度大会

ランチョンセミナーのご案内

LS4　トリプル四重極型質量分析計 LC-MS/MSを用いた食事由来ペプチドの検出と定量

日時　2015年3月27日（金）12:30～13:20

会場　岡山大学 津島キャンパス 教養B棟3F B33

演者　佐藤 健司 先生　（京都大学大学院農学研究科　応用生物科学専攻　教授）

従来の栄養学の考え方では、食事で摂取したタンパク質・ペプチドは消化管および、小腸上皮細胞内でアミノ酸に分解されると考えられていた。一方、ペプチドの摂取により健康増進機能が報告されている。そのため、一部のペプチドは標的組織に移行して、生体で有益な作用を発揮していると考えられている。しかし、血液、組織抽出物は非常に多くの成分を含み、その中から食事由来ペプチドを同定し、定量するのは大変困難であった。我々はこの問題を解決するため、ペプチドをAccQ試薬（6-aminoquinolyl-*N*-hydroxysuccinimidyl carbamate）を用い、アミノ基を誘導化し、疎水性を増すことで逆相HPLCでの分離を向上させ、さらにMS/MSによるフラグメント解析により構造を決定できることを見いだした。ひとたび、構造が明らかになればmultiple reaction monitoring（MRM）により血液や組織抽出物中に食事由来、または内因性のペプチドを特異的に検出し定量が可能となる。従来、食事由来ペプチドのヒト血中濃度は数nM程度と考えられていたが、数十nM～μM程度のかなりの含量が存在することが明らかとなった。さらにLC-MS/MSは分子量1の差を十分識別できるため、グルタチオンのように内因性のペプチドが大量に存在しても、安定同位体^{13}Cでラベルした食事由来グルタチオンが、吸収され肝臓に取り込まれることが実証可能である。

誘導化技術を使うとアルデヒドや糖、有機酸の様に逆相HPLCで分離しにくい成分も分離可能となり、さらに誘導化によりイオン化しにくい糖やアルデヒドもLC-MS/MSで検出が可能となる。さらにMS/MSにより誘導化試薬由来のフラグメントイオンが検出できるため、特定のフラグメントを生じる親イオンを検出することで特定のグループの化合物を選択的に検出できる。

生体内での食品成分・生体成分の代謝経路の解明とその量的な変動を明らかにするためにLC-MS/MSは、必須のツールとなっている。

司会：奥村　毅　（株式会社 島津製作所　分析計測事業部）

お問合せ

（株）島津製作所　分析計測事業部　グローバルマーケティング部
〒604-8511 京都市中京区西ノ京桑原町1　TEL：075-823-1352

日本農芸化学会 2015 年度大会
LS5　株式会社林原　ランチョンセミナー

日時　2015 年 3 月 27 日（金）　12：30 ～ 13：20

場所　岡山大学 津島キャンパス 教養 E 棟 2F E21
（岡山市北区津島中 1 丁目 1 番 1 号）

糖質と健康
−糖尿病予備軍から高齢者まで−

●座長

岡山県立大学　学長　　**辻 英明** 先生

◆お弁当◆
トレハロース配合の
オリジナル弁当とお菓子を
ご用意しています

●講師

倉敷スイートホスピタル　院長

松木 道裕 先生

「2 型糖尿病の発症・進展を抑えるためには、
生活習慣への介入が重要である」

2 型糖尿病患者数は増加の一途をたどり、 2012 年には 950 万人を超え、 肥満者の増加がその要因の1つと考えられている。 特に内臓型肥満はインスリン抵抗性を助長し、 糖尿病や心血管疾患を発症する。 糖尿病予備軍の時期から生活習慣へ介入することで糖尿病の発症は抑制される。 また、 糖質摂取量の制限は血糖の改善や体重の減量に有効であるとする報告が散見されるが、 日本人での臨床データはなく、 新たなエビデンスが待たれる。

●講師

株式会社林原 研究開発本部 応用研究部 食品・ヘルスケア素材課 研究員

新井 紀恵

「トレハロースによる糖尿病リスクの低減
− 美味しく健康的な食生活の提案 −」

我が国では、 メタボリックシンドロームや糖尿病等の生活習慣病が増加しており、 美味しく健康的な食生活が望まれている。 トレハロースは澱粉の老化抑制や矯味・矯臭の効果があり、食品に広く利用されている。 最近、 我々は肥満傾向のヒトに毎食時 3.3 g のトレハロースを 12 週間摂取させ、 耐糖能が有意に改善することを見出した。 本セミナーでは、 この興味深い知見を中心に、 トレハロースの「美味しさと健康」に関わる最新のトピックスを紹介する。

日本農芸化学会2015年度大会ランチョンセミナー
LS６　サントリーウエルネス株式会社

時間栄養学における最新の研究動向

演者：柴田 重信
（早稲田大学先進理工学研究科 教授）

座長：柴田　浩志
（サントリーウエルネス株式会社
健康科学研究所長）



日時 2015年3月27日（金）
場所 岡山大学津島キャンパス
教育本部棟401（G41会場）

時計遺伝子の発見以来、体内時計の研究が盛んになってきています。体内時計と食物・栄養は相互作用する可能性が高いと思われます。つまり、食や栄養を考えるときに、摂取時刻やタイミングといった「時間栄養学」の発想が重要になってきます。「日本人の食事摂取基準2015年版」にも、時間栄養学的発想が総論に取り上げられました。本セミナーでは時間栄養学の最新の研究動向を紹介し、食や栄養との関連について考えたいと思います。

日本農芸化学会2015年度大会

Clontech TaKaRa cellartis

タカラバイオ株式会社

ランチョンセミナー　LS7

3月28日(SAT) 12:30 ~ 13:20

教養A棟2F　A21

CRISPR/Casシステムを利用した高効率なゲノム編集ツールのご紹介

演者：タカラバイオ株式会社　CDMセンター　井上　晃一

RGENは、バクテリアの獲得免疫システムであるCRISPR/Cas システム由来のRNA誘導型人工ヌクレアーゼです。従来型の人工ヌクレアーゼとは異なり、ガイドRNA とエンドヌクレアーゼであるCas9タンパク質の二つの異なる分子が、標的DNA配列の認識とDNA二本鎖切断の働きをそれぞれ別々に担っています。これにより、従来型人工ヌクレアーゼに比べ、RGENは設計が比較的容易であり、一方で従来技術と同等のゲノム編集効果が得られること、ならびに、複数箇所の同時ゲノム編集が容易に行えることなどから、新たなゲノム編集法として注目を集めています。

本セミナーでは、CRISPR/Casシステムの原理や特徴、従来のゲノム編集技術との違い、本システムを利用した実験例、さらに、関連する受託サービスメニューおよびゲノム編集ツール関連製品についてご紹介します。

タカラバイオ株式会社　http://www.takara-bio.co.jp

東京支店　TEL 03-3271-8553　FAX 03-3271-7282
関西支店　TEL 077-565-6969　FAX 077-565-6995
TaKaRaテクニカルサポートライン　TEL 077-543-6116　FAX 077-543-1977

that's GOOD science!

DASSAULT SYSTEMES

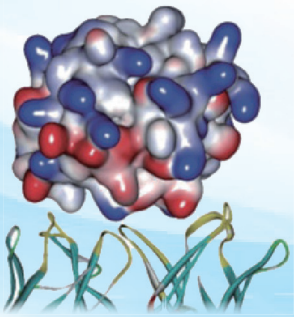
BIOVIA

日本農芸化学会 2015 年度大会 ランチョンセミナー LS8

ダッソー・システムズ・バイオビア株式会社

3/28 (土)
12:30-13:20
A 棟 4F A41

バイオ研究を支援する BIOVIA のソリューション



コンピューターでタンパク質をデザインする

髙岡 雄司　ダッソー・システムズ・バイオビア（株）

BIOVIA Discovery Studio は、アミノ酸置換によるタンパク質の安定性や基質認識能、凝集性向等の変化をパソコン上で簡単に計算、解析できる Modeing&Simulation パッケージです。本セミナーでは短時間でこれらの解析を行う様子をご覧頂く予定です。



簡単導入・簡単操作・低コストの電子実験ノートのご紹介

花岡 幸史　ダッソー・システムズ・バイオビア（株）

BIOVIA Notebook は、低いコストで簡単に電子実験ノートを導入することができるソフトウェアです。

情報の共有と一元管理により、研究開発の効率化とコラボレーションの促進に貢献し、また知的財産の保護に役立ちます。

本セミナーでは、デモを通して本製品のシンプルな操作性とパワフルな機能をご覧頂きます。



3DEXPERIENCE®

お問い合わせ
03-4321-3900（代表）
post-japan@accelrys.com

3DS.COM/Ja/BIOVIA

日本農芸化学会2015年度大会

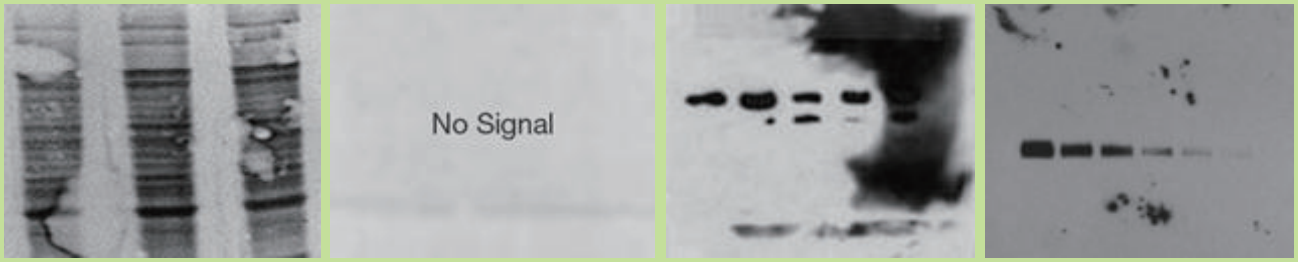
ランチョンセミナー　LS9　バイオ・ラッド ラボラトリーズ

ウェスタン ブロッティング の トラブルシューティング フロー

日 時: 3月28日(土)　12:30〜13:20

会 場: B41会場(教養B棟4F B41)

こんな結果になってしまったら….



1. ウェスタンブロッティングのトラブルシューティングフロー

演者:佐藤 元 (バイオ・ラッド ラボラトリーズ ライフサイエンス事業部 プロダクトサポート)

2. 効率的なウェスタンブロッティング実験を支える製品ソリューション

演者:中田 宣之 (バイオ・ラッド ラボラトリーズ ライフサイエンス事業部 マーケティング)

実験工程が多いウェスタンブロッティングでは、トラブルが発生した時に原因を絞り込むことが難しい場合があります。

〈トラブル例〉
- バンドやレーンが歪む / バンドが不明瞭
- 検出シグナルが弱い、バンドが検出されない / 非特異的バンドが多い
- バックが高い / バックに汚れがある
- 定量性が無い

定性的・半定量的(もしくは比較定量的)なデータを得るためのウェスタンブロッティング実験を成功させるためには、できるだけきれいなデータで定量性を最大限確保した状態で得ることが重要となります。本ランチョンセミナーでは、これまで培った豊富な経験やノウハウをもとに、どのようなポイントに注目してトラブルシューティングを行っていけば良いかをご紹介いたします。

BIO-RAD　**バイオ・ラッド　ラボラトリーズ株式会社**
www.bio-rad.com

日本農芸化学会
2015年度大会

BRUKER

ランチョンセミナー　LS10（ブルカー・ダルトニクス株式会社）

日時：3月28日（土）12:30～13:20
会場：教養B棟 3F B33

超高分解能(UHR-) QToF 質量分析装置が拓く新しいアプリケーションの可能性

低分子化合物の構造研究のみならず、メタボロミクス研究やプロテオミクス研究において、質量分析の果たす役割はますます大きく、また多様になりつつあります。 このような状況の中で、単に高感度なだけ、あるいは高分解能なだけの質量分析計は、もはや誰も必要としていません。

弊社は昨年、高感度かつ超高分解能なだけではなく、さらに広いダイナミックレンジを併せ持つ UHR (Ultra High Resolution) –QToF 質量分析計2機種（impact II および maXis II）をリリースさせていただきました。
弊社はこれまでも、マススペクトルの質に徹底的にこだわり、高いクオリティーのマススペクトルから最大限の情報を読み取ることを旨としてきました。
今回リリースさせていただいた UHR-QToF 質量分析計では、マススペクトルの質を一切落とすことなく、世界最高レベルの高感度と、これまでの常識を超える超高分解能、さらに5桁にもおよぶ広いダイナミックレンジを同時に満足する事に成功しました。

本ランチョンセミナーでは、この新しい UHR-QToF 質量分析計による最新のアプリケーション・データを紹介させていただき、その性能をご確認いただくばかりでなく、これら UHR-QToF 質量分析計が拓く新しいアプリケーションの可能性について、会場の皆様方とご議論させていただきたいと考えております。



Innovation with Integrity

詳しくは、<http://www.bruker.jp/> をご訪問ください

ブルカー・ダルトニクス株式会社
- 営業本部・テクニカルサポートセンター
〒221-0022 横浜市神奈川区守屋町 3-9
TEL:045-440-0471　FAX:045-453-1827
- 大阪営業所
〒532-0004 大阪市淀川区西宮原 1-8-29 テラサキ第2ビル 2F
TEL:06-6396-8211　FAX:06-6396-1118

日本農芸化学会　2015年度大会
ランチョンセミナー（LS11）のご案内

分析をベースとした生物生産のための培地と培地原料

日時：　2015年度3月28日（土）12:30～13:20

会場：　岡山大学津島キャンパス会場
教養Ｅ棟　１Ｆ　Ｅ１１

【発表１】液体クロマトグラフ質量分析計による培養プロファイリング解析

鈴木 崇　様（株式会社島津製作所）

【発表２】ペプトン・エキス類の多面的成分分析

戸高 眠　（極東製薬工業株式会社・製品開発部）

（進行）　白石卓夫　（極東製薬工業株式会社・バイオサイエンス部）

細胞・微生物を問わず、生物を利用した物質生産系では、目的物質の産生能を効率的に高めることが重要となる。培地は重要なキーファクターの１つであり、培養中の培地成分の動態を把握し、培地原料の特性を知ることによって、初めてその検討が可能となる。

本ランチョンセミナーでは、島津製作所様と共同で開発した液体クロマトグラフ質量分析計による培地成分一斉分析手法、及びそれを利用した培養プロファイリング解析例を紹介するとともに、培地の主原料であるペプトン・エキス類製品を多方面から分析した結果について紹介する。ぜひ今後の培養最適化検討の参考として頂きたい。

共催　極東製薬工業株式会社

メルクミリポア
ランチョンセミナーのご案内

LS12

生体サンプルの分離精製に必ず役立つ！ HILIC カラム・モノリス型カラムの特長と便利な使い方



日 程 3 月 28 日（土）12：30 ～ 13：20

会 場 一般教育棟　E 棟　E21

一般的な微粒子充填型 ODS カラムでは達成できないパフォーマンスを発揮する、特長的なカラム 2 種に関する技術やノウハウについて御紹介します。HPLC の分析条件検討に、お役に立つ情報満載です。
ぜひご参加ください！

講演内容

1. 押さえておきたい HPLC カラム選択のポイント
2. 高極性化合物の分離に最適！ HILIC カラムの特長と条件検討の鉄則
3. 夾雑物の多いサンプルの分析に最適！ 耐久性抜群のモノリス型カラムの特長と便利な使用方法

親水性相互作用クロマトグラフィー（HILIC）カラム

親水性相互作用クロマトグラフィー（HILIC/Hydrophilic interaction liquid chromatography）カラムは、逆相カラムでは分析が困難な親水性化合物に適した分離モードであり、アミノ酸、核酸、有機酸といった生体関連物質の分析にも広く使用されています。誘導体化やイオンペア試薬を使用することなく親水性化合物を分析することが可能で、有機溶媒比率の高い移動相が使用できることから、質量分析装置の感度を向上できることもメリットの一つであり、LC/MS の有効な分離手法として期待できます。

モノリス型カラム

一般的な微粒子充填型カラムとは異なり、多孔質のシリカゲル連続体を担体に用いたカラムです。その空隙率の高さから背圧が非常に低く、流速をあげることによる高速分析を可能にします。また、目詰まりが起こりにくく高耐久性であることから、生体サンプルなど夾雑物の多いサンプルの分析にも適しています。

メルク株式会社
メルクミリポア事業本部 バイオサイエンス営業部 アナリティクスセールスグループ
〒153-8927 東京都目黒区下目黒1-8-1 アルコタワー5F
製品の最新情報はこちら www.merckmillipore.jp
お問合せ▶On-Line:www.merckmillipore.jp/jpts Tel: 0120-633-358 Fax: 03-5434-4859

Merck Millipore is a division of MERCK

Merck Millipore and the M mark are trademarks of Merck KGaA, Darmstadt, Germany.

明日をもっとおいしく
meiji

LS13　日本農芸化学会2015年度大会

株式会社 明治　ランチョンセミナー

スポーツ栄養最前線~乳たんぱく質のパワーを探る~

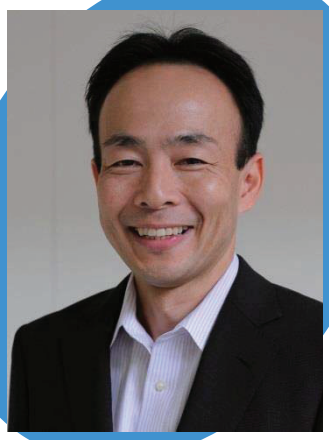
2015年3月28日（土）　12:30-13:20

岡山大学津島キャンパス　教育本部棟4階 401　G41会場

座長

杉浦 克己先生

（立教大学　コミュニティ福祉学部
スポーツウエルネス学科　教授）



講演者

藤田　聡先生

（立命館大学　スポーツ健康科学部　教授）

●1993年ノースカロライナ州ファイファー大学スポーツ医学・マネジメント学部卒、2002年南カリフォルニア大学大学院博士号終了　●博士（運動生理学）　●2006年テキサス大学医学部内講師、2007年東京大学大学院新領域創成科学研究科特任助教を経て、2009年より立命館大学　●米国生理学会（APS）や米国栄養学会（ASN）より学会賞を受賞　●専門は運動生理学、特に運動や栄養摂取による代謝系の変化　●著書に、「スポーツサイエンス入門」（丸善）など　●財団法人日本テニス協会・普及本部・副本部長

2020年オリンピックに向けてスポーツへの関心が高まる中、アスリートのみならず多くの運動実施者にとって有益な情報やスポーツ栄養食品への期待も高まっている。本講演では、運動と栄養の相乗効果について、筋肉を中心としたカラダづくりにおける最新の研究成果を解説する。たんぱく質の種類や摂取タイミングについて、競技力向上や運動の効果を最大限に引き出す観点から、また、乳たんぱく質由来のプロテインや牛乳を活用した栄養戦略についても紹介する。

牛乳から得られる乳たんぱく質はたんぱく質の合成を直接刺激する必須アミノ酸全てを含んでいる。そのため、レジスタンス運動後に乳たんぱく質を摂取すると、血中の必須アミノ酸濃度が有意に上昇し、運動後の筋たんぱく質合成速度を顕著に増加させる。

本講演では、これらの機能性食品のたんぱく質代謝における生理的メカニズムと、筋肥大を促すレジスタンス運動との組み合わせによる効果について、最新の研究成果に基づいて解説する。

Eat Well, Live Well.
AJINOMOTO®

日本農芸化学会 2015 年度大会
LS14 味の素株式会社ランチョンセミナー
発表日：2014 年 3 月 29 日（日）12:30-13:20
会場： 教養 A 棟 2F A21

独自のタンパク質発現系 CORYNEX®による バイオ医薬品製造技術

松田 吉彦（味の素、バイオ・ファイン研究所）

1957 年に木下らによってグルタミン酸生産菌として分離されたグラム陽性細菌である *Corynebacterium glutamicum* は、グルタミン酸はじめとする多くのアミノ酸の工業的生産菌として 50 年にわたり利用されてきた。そのため、アミノ酸の生産性を向上させる目的から、数多くの基礎的研究がなされてきており、全ゲノム配列も既に決定されている。しかしながら、アミノ酸の重合体であるタンパク質の生産に関する研究はほとんど報告されていたかった。そこで我々は、*C. glutamicum* を用いた新しいタンパク質分泌系の開発を行ってきた。

C. glutamicum のタンパク質分泌系の特徴としては、分泌している宿主由来タンパク質がほとんど無く発現させた異種タンパク質が高純度で蓄積する点、菌体外プロテアーゼ活性がほとんど無く分泌させたタンパク質が分解されない点、複雑なジスルフィド結合を有するタンパク質に関しても正常な構造を有する活性体での分泌発現が可能である点を挙げている。

またこの系の汎用性を高める手段として、これまでの General secretion pathway (Sec 系)とは異なる新しいタンパク質分泌経路である Twin-arginine translocation pathway (Tat 系)の利用、*C. glutamicum* のメジャーな菌体外タンパク質である CspB との融合法、*C. glutamicum* が有している 154 のシグナル配列を利用できるシグナル配列ライブラリーの構築、さらにはターゲットタンパク質に適した変異株を取得する手法を開発してきた。分泌発現が困難であったタンパク質の高分泌発現に成功している例もある。

我々はこの新しいタンパク質分泌生産系を用い、CORYNEX®と名付けたタンパク質受託発現サービスを、主として日米欧の製薬企業を顧客として開始している。その結果、これまでの大腸菌をはじめとする既存のタンパク質生産系において発現させることが困難であったタンパク質に関し、それらを効率よく発現させる事に成功している。本セミナーでは、これら CORYNEX®の技術概要に関して発表する。

CORYNEX®
CORYNEX® Expresses (Secretes) Target Proteins
・Directly into Media → No need for Cell Disruption
・With High Purity → Simple Purification
・In Active Form → No Need for Refolding

ALTHEA®

お問い合せ先：味の素株式会社 製薬カスタムサービス部
URL：www.corynex.jp Mail: corynex@ajinomoto.com

日本農芸化学会2015年度大会
天野エンザイム株式会社ランチョンセミナー

オリゴ糖生成酵素による美味しい健康法

2015年3月29日（日）12:30～13:20
A41会場（岡山大学津島キャンパス教養A棟4F A41）



演者：佐々木　誠人先生
（愛知医科大学消化器内科　教授）

1989年　名古屋市立大学医学部卒業
2000年　米国ルイジアナ州立大学医学部分子細胞生理学教室研究員
2003年　名名古屋市立大学大学院医学研究科臨床消化器内科学助手
2004年　同上　病院講師
2005年　同上　医学研究科消化器・代謝内科代謝学講師
2009年　愛知医科大学消化器内科准教授
2013年　同上　教授



座長：柴田　克己先生
（　滋賀県立大学 人間文化学部　教授）

日本人の三大死因（がん，心臓病，脳卒中）には生活習慣が寄与する．中でもメタボリックシンドローム（内臓脂肪症候群）はその代表であり，予防・改善には運動や食事といった生活習慣の改善が必要である．過食を避け，バランスの良い食事を摂取することが推奨されているが，飽食時代の今日においては容易ではない．そのため，健康食品などの補助食品類を利用した健康法などが考案され普及している．オリゴ糖もその一つで，コレステロールや中性脂肪の低下，アレルギー疾患であるアトピー性皮膚炎を改善する効果，さらには免疫力を高める作用など健康を維持する様々な作用を有することが明らかとなった．しかし，オリゴ糖単独では，メタボリックシンドロームの予防・改善に十分とはいえず，過食によるカロリーオーバーをいかに抑えるかといった問題が未解決である．

この解決策として，酵素パワーを活用することで無理な食事制限を行わずに，美味しく食べて健康を維持する方法を考案した．オリゴ糖は酵素により生成させることが可能であるが，ヒトはオリゴ糖を生成する酵素を備えていない．ある種のオリゴ糖生成酵素を食事と一緒に摂取すれば，腸管内で摂取した食物からオリゴ糖を生成することが可能となる．これにより健康に良いオリゴ糖を摂取した状態を作り出すのと同時に，摂取した食物がオリゴ糖に変換された分だけ摂取カロリーが抑制されることになる．即ち，オリゴ糖による健康維持効果と摂食制限とが自然に行えることになる．

この方法を確立するため，動物やヒトにオリゴ糖生成酵素を実際に投与して，その効果の検証を進めている．本セミナーではこれらの検証研究の結果を紹介し、メタボリックシンドロームの予防・改善効果の可能性、更に腸内細菌叢の改善を介した各種疾患の予防効果の可能性について考察する．

AMANO 天野エンザイム
酵素ー無限の可能性を求めて

日本農芸化学会2015年度大会
株式会社山田養蜂場　ランチョンセミナー

LS-16

ブラジル産プロポリスの糖尿病発症予防効果

ー脂肪細胞中の免疫細胞をターゲットとした予防メカニズムの検証ー

3月29日(日)12:30 - 13:20

会場:岡山大学津島キャンパス　教養B棟4階　B41会場



講師

北村 浩 先生

酪農学園大学獣医学群
教授



座長

中村　宜督 先生

岡山大学大学院環境生命科学研究科
教授

近年、2型糖尿病の大きな要因であるインスリン抵抗性の獲得メカニズムに、免疫細胞の役割が注目されています。

本講演では、ブラジル産プロポリスの2型糖尿病の病態に対する抑制効果の作用メカニズムについて、脂肪組織内の免疫細胞に着目した検証結果を報告頂きます。

本研究は、山田養蜂場みつばち研究助成基金の採択研究であり、本セミナーでは研究助成基金やミツバチ産品や素材についても紹介します。

山田養蜂場 みつばち研究助成基金
Yamada Research Grant

≪山田養蜂場　みつばち研究助成基金≫

山田養蜂場の研究開発は、創業者である現会長 山田政雄が、先天性の心臓疾患を持って生まれてきた娘の健康を願って始めたローヤルゼリーの研究を起源としています。創業以来ミツバチ研究と予防医学的研究の発展に貢献するために、2008年、創業60周年を機にみつばち研究助成基金を設立しました。当基金では過去7年間で182件の研究を助成、「ローヤルゼリーの筋力低下予防」や「プロポリスの認知症予防効果」、「蜂の子の聴力改善効果」など、論文発表41報、学会発表53件の成果を得て、一般向け健康セミナーを開催するなど予防医学を啓蒙しています。



≪助成対象テーマ≫

ミツバチ産品(ローヤルゼリー、プロポリス、蜂蜜、蜂の子、花粉荷など)をはじめとする有用天然素材に関する予防医学的研究、ミツバチに関する基礎研究、養蜂技術開発研究でこれまでに報告されていない研究テーマに限ります。

≪応募方法≫

「山田養蜂場　みつばち研究助成基金」WEBサイト(http://www.bee-lab.jp/grant/)の応募フォームよりご応募ください。
※2015年度応募は2015年5月頃を予定しています。

アピセラピーを追究する
山田養蜂場
YAMADA BEE FARM

≪お問い合わせ先≫
株式会社山田養蜂場本社　みつばち健康科学研究所　みつばち研究助成基金事務局
〒708-0393　岡山県苫田郡鏡野町市場194
TEL:0868-54-1199　　FAX:0868-54-3211　　E-mail:research-grant@yamada-bee.com

日本農芸化学会2015年度大会

SPring-8 ランチョンセミナー

日 時：2015年3月29日（日） 12:30～13:20

会 場：B33会場（教養B棟3F B33）

大型放射光施設SPring-8を利用したタンパク質結晶構造解析

講演者： 熊坂　崇
SPring-8／（公財）高輝度光科学研究センター
タンパク質結晶解析推進室　室長代理

大型放射光施設SPring-8は、世界最高性能の放射光を利用することができる大型の実験施設であり、国内外の研究者等に広く開かれた共同利用施設として、幅広い分野の研究に用いられています。例えば生命科学の研究分野では、タンパク質結晶構造解析をはじめ、タンパク質の溶液中の構造を調べる小角散乱法、タンパク質のダイナミクス研究のための時分割散乱・回折法、金属元素などの局所構造や電子状態を調べるX線吸収分光法(XAFS)、微結晶を利用した１分子計測などに利用されています。

タンパク質結晶構造解析には、BL41XU（アンジュレーター光源）、BL38B1（偏向電磁石光源）の2本の共用ビームラインの他、BL32XU（アンジュレーター光源）、BL26B1、BL26B2（共に偏向電磁石光源）の3本の理研ビームラインが共同利用に供されています。原則年２回(例年6月および12月)の課題募集において採択された実験課題にビームタイムを配分し、来所の上で実験していただきます。ただし、測定に慣れた利用者向けに来所しなくても測定のできる遠隔測定システムも用意しています。また、大学院生が主体的に行う実験課題に旅費の援助を行う萌芽的研究支援制度もあります。

今回、SPring-8の運転・維持管理及び利用支援を行っている公益財団法人高輝度光科学研究センター(JASRI)では、SPring-8をタンパク質結晶構造解析にさらに活用していただくため、施設の取り組み・研究内容・利用方法などをご紹介するランチョンセミナーを開催します。特に、タンパク質結晶解析の課題については、利便性を高めるために運用制度の大幅な変更を来年度から実施しますが、この内容についてもご紹介いたしますので、奮ってご参加ください。

SPring-8
公益財団法人高輝度光科学研究センター
http://www.spring8.or.jp/ja

PHARMA FOODS INTERNATIONAL CO.,LTD.

たまごが人類を救う！

日本農芸化学会２０１５年度大会
株式会社ファーマフーズ ランチョンセミナー



3月29日(日)
12:30〜13:20

教育本部棟 4F

401会場

たまご発バイオビジネス
「着想の原点」に迫る

たまごを温めると、わずか２１日間でヒナが誕生する。この間、たまごの中では劇的な生命現象が繰り広げられる。この生命力を科学で読み解き、人々の健康を育む機能性食品を創出した着想の原点とは？

	演者
1. ヒナを護る生体防御物質 “鶏卵抗体(IgY)” の機能性食品への応用	山下裕輔
2. ヒナの誕生に隠された毛髪科学の発掘	原田清佑
3. 生命のゆりかご “卵殻膜” の神秘と化粧品への応用	青笹正義
4. 鶏足に秘められたヒアルロン酸産生物質 “HA-II” のパワー	丸　勇史

本書の内容の一部または全部を無断で複写複製(コピー)及び転載することは、法律で認められた場合を除き、権利の侵害となりますので、あらかじめ本会あて許諾を求めてください。
Copyright © 2015 by Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry

日 本 農 芸 化 学 会 2015 年 度 大 会 講 演 要 旨 集 (オンライン)
Proceedings (online) of the Annual Meeting 2015 Okayama of
Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry
2015 年 3 月 5 日公開　　Published online 5 March 2015　　ISSN 2186-7976

発行者　　公益社団法人日本農芸化学会　　JSBBA　　http://www.jsbba.or.jp/
PUBLISHER　113-0032 東京都文京区弥生 2-4-16 学会センタービル 2 階　　Phone 03-3811-8789

データ作成者 株式会社ダイナコム　　DYNACOM　　http://www.dynacom.co.jp/
ASSISTS　　261-7125 千葉県千葉市美浜区中瀬 2-6-1WBG マリブイースト 25 階　　Phone 043-213-8131
小宮山印刷工業株式会社　　COMOIYAMA PRINTING　　http://www.kopas.co.jp/